



Atração de adultos de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) à vinhaça da cana-de-açúcar e identificação dos seus compostos voláteis

Lizandra de Fátima Martins

Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
Instituto Biológico
Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no
Agronegócio

Atração de adultos de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae)
à vinhaça da cana-de-açúcar e identificação dos seus compostos voláteis

Lizandra de Fátima Martins

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio. Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

São Paulo
2018

Lizandra de Fátima Martins

**Atração de adultos de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae)
à vinhaça da cana-de-açúcar e identificação dos seus compostos voláteis**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em
Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no
Agroecossistema.

Orientador: Professor Dr. Luís Garrigós Leite

**São Paulo
2018**

Eu, **Lizandra de Fátima Martins**, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico, de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela internet desde que citada a fonte.

Assinatura: _____ Data ___/___/___

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Martins, Lizandra de Fátima.

Atração de adultos de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) à vinhaça da cana-de-açúcar e identificação dos seus compostos voláteis. / Lizandra de Fátima Martins. - São Paulo, 2018.
63 p.

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Linha de pesquisa: Manejo integrado de pragas e doenças em ambientes rurais e urbanos.

Orientador: Luis Garrigós Leite.

Versão do título para o inglês: Attraction of adults of *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) to the vinasse of sugarcane and identification of its volatile compounds.

1. Resposta olfativa 2. Semioquímicos 3. GC-MS 4. Subprodutos. I. Martins, Lizandra de Fátima II. Leite, Luis Garrigós III. Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

IB/Bibl./2018/003

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Lizandra de Fátima Martins

Título: Atração de adultos de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) à vinhaça da cana-de-açúcar e identificação dos seus compostos voláteis

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Aprovada em: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. Luís Garrigós Leite

Instituição: Instituto Biológico/APTA

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Adalton Raga

Instituição: Instituto Biológico/APTA

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. José Eduardo M. de Almeida

Instituição: Instituto Biológico/APTA

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico aos profissionais e estudantes da área. Que de alguma forma eu possa contribuir com a pesquisa científica em uma das culturas mais importantes para o nosso país.

“Mas aqueles que esperam no Senhor renovam as suas forças. Voam alto como águias; correm e não ficam exaustos, andam e não se cansam.”

Isaías 40: 31

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre guiar os meus passos, me proteger e me amar infinitamente.

Ao Instituto Biológico e ao Programa de Pós-graduação, pela oportunidade de ter sido aluna em uma Instituição de pesquisa qualificada e reconhecida.

À Fundação CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo financiamento da bolsa de mestrado.

Ao Dr. Luís Leite Garrigós, pela orientação, acolhimento, confiança e ensinamentos. Também lhe agradeço a oportunidade por ter participado diariamente de um ambiente multidisciplinar e dinâmico.

Ao Me. Mateus Tonelli, por sua ajuda desde o início, suas colaborações nas análises e sugestões no trabalho foram essenciais e indispensáveis. Dessa forma, também agradeço ao Laboratório de Ecologia Química da ESALQ- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” que disponibilizou o espaço e equipamentos para análise cromatográfica.

As Usinas de cana-de-açúcar Abengoa Bioenergia e Raízen, por providenciarem os materiais necessários para os bioensaios, e disponibilizarem as áreas para os estudos e coletas dos insetos.

A todos do “Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde Animal- CAPSA”, em especial aos pesquisadores e membros do Laboratório de Controle Biológico pela disponibilidade do espaço e materiais, acolhimento, convivência, colaboração e ensinamentos diários.

À Galera do alojamento, Ester Marques, Bruna Migotto, Elaine Batista, Sara Braga, Léo Rodrigo e Leonardo Galdino, pelo apoio e companheirismo. Foi muito importante conviver com vocês, compartilhando as alegrias e também os desesperos nos momentos difíceis.

Aos professores Jamil e Verônica, pelo carinho que me acompanham desde o TCC em Inconfidentes- MG.

À minha família e amigos, pelo eterno apoio e por acreditarem na minha capacidade.

A todos de uma forma geral que conheci durante a trajetória do mestrado, pois tive o prazer de vivenciar novas culturas, adquirir novos conhecimentos e novas experiências para a minha carreira profissional e meu crescimento pessoal.

RESUMO

MARTINS, Lizandra de Fátima. **Atração de adultos de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) à vinhaça da cana-de-açúcar e identificação dos seus compostos voláteis.** 2018. 63 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2018.

A vinhaça, um resíduo da produção do etanol a partir da cana-de-açúcar, é empregada na fertirrigação para o desenvolvimento dessa mesma cultura. A expansão de novas áreas para o cultivo da cana-de-açúcar no Brasil tem provocado o crescimento populacional de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae), praga primária e limitante da cultura. Além disso, suspeita-se que a vinhaça aplicada nos campos de cana pode liberar compostos voláteis que sejam atrativos para este inseto, porém poucos estudos foram realizados até o momento. Objetivou-se investigar a resposta olfativa de adultos de *S. levis* à vinhaça. Para isso foram realizados os seguintes estudos em condições de laboratório: Avaliação da resposta olfativa à vinhaça, melação, colmo de cana e água residuária; avaliação da resposta olfativa à vinhaça em diferentes volumes, comparada ao colmo de cana em comprimentos variados; avaliação da resposta olfativa aos compostos da vinhaça em três diluições, ambos com o uso de olfatômetros de duas vias; e identificação da estrutura química dos compostos voláteis da vinhaça por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Também foram realizados dois estudos em campo para avaliação da atração de *S. levis* à vinhaça em hidrogel, vinhaça *in natura* e colmo de cana. As respostas olfativas dos insetos machos e fêmeas apresentaram as mesmas tendências para os diferentes atrativos testados. A vinhaça foi atrativa para *S. levis* em condições de laboratório. O uso da vinhaça em hidrogel não foi atrativo para os insetos em campo, mas a vinhaça *in natura* foi atrativa, de acordo com os resultados obtidos em laboratório. O colmo foi mais atrativo que a vinhaça em condições de campo, e colmo + vinhaça não diferiu significativamente do colmo testado isoladamente. Os voláteis detectados na vinhaça foram ácidos orgânicos carboxílicos, álcoois primários e terpeno. O ácido propanoico foi o composto volátil de maior intensidade presente na vinhaça. O Mix 1000 ppm de componentes químicos foi atrativo para *S. levis*. O estudo é o primeiro a confirmar a atratividade da vinhaça para adultos de *S. levis* e os compostos voláteis atrativos, destacando ainda mais esse subproduto como um dos responsáveis pelas maiores infestações do inseto no campo. Pode-se sugerir novos estudos em laboratório e campo visando avaliar combinações entre feromônio, isca tradicional de cana-de-açúcar e compostos voláteis na busca de novas tecnologias para monitoramento e controle de *S. levis*.

PALAVRAS-CHAVE: Resposta olfativa. Semioquímicos. GC-MS. Subproduto.

ABSTRACT

MARTINS, Lizandra de Fátima. **Attraction of adults of *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) to the vinasse of sugarcane and identification of its volatile compounds.** 2018. 63 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2018.

The vinasse, a residue from ethanol production from sugarcane, is employed in the fertirrigation for the development of this same crop. The expansion of new areas for the cultivation of sugarcane in Brazil has caused the population growth of *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae), primary and limiting pest of the crop. In addition, it is suspected that vinasse applied in sugarcane fields may release volatile compounds that are attractive to this insect, but few studies have been conducted so far. The objective was to investigate the olfactory response of *S. levis* adults to vinasse. For this the following studies were carried out under laboratory conditions: Evaluation of the olfactory response to vinasse, molasses, cane stalk and wastewater; evaluation of the olfactory response to vinasse in different volumes, compared to cane stalk in varied lengths; evaluation of the olfactory response to vinasse compounds in three dilutions, both with the use of two-way olfactometers; and identification of the chemical structure of volatile vinasse compounds by Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS). Two field studies were also carried out for the evaluate the attraction of *S. levis* to vinasse in hydrogel, vinasse *in natura* and cane stalk. The olfactory responses of the male and female insects showed the same tendencies for the different attractives tested. Vinasse was attractive for *S. levis* under laboratory conditions. The use of the vinasse in hydrogel was not attractive for the insects, but the vinasse *in natura* was attractive, according to the results obtained in the laboratory. The stalk was more attractive than the vinasse in field conditions, and stalks + vinasse did not differ significantly from stalk tested alone. The volatiles detected in the vinasse were organic carboxylic compounds, primary alcohols and terpene. Propanoic acid was the highest volatile compound present in the vinasse. The 1000 ppm chemical component mix was attractive for *S. levis*. The study is the first to confirm the attractiveness of vinasse to adults of *S. levis* and attractive volatile compounds, further highlighting this byproduct as one of the responsible for the largest infestations of the insect in the field. New laboratory and field studies can be suggested to evaluate combinations of pheromone, traditional sugarcane bait and volatile compounds in the search for new technologies for monitoring and control of *S. levis*.

KEYWORDS: Response olfactive. Semiochemicals. GC-MS. Byproduct.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ovos de <i>Sphenophorus levis</i> . (A) Ovo de postura recente. (B) Ovo próximo à eclosão da larva.....	19
Figura 2. Larva de <i>Sphenophorus levis</i>	20
Figura 3. Pupa de <i>Sphenophorus levis</i>	20
Figura 4. Adultos de <i>Sphenophorus levis</i>	22
Figura 5. Adulto de <i>Metamasius hemipterus</i>	23
Figura 6. Adulto de <i>Cosmopolites sordidus</i>	23
Figura 7. Região ventral de <i>Sphenophorus levis</i> . (A) Região ventral fêmea, destacando o formato do pigídio. (B) Região ventral macho, destacando o formato do pigídio e região pilosa.	33
Figura 8. Olfatômetro de duas vias	34
Figura 9. Olfatômetros utilizados no bioensaio.	35
Figura 10. Olfatômetros utilizados nos bioensaios de diferentes volumes de vinhaça e tamanhos variados de colmos.....	36
Figura 11. Tratamentos avaliados em campo para captura de <i>Sphenophorus levis</i> . (A) Colmo. (B) Colmo + Vinhaça em hidrogel. (C) Vinhaça em hidrogel.	38
Figura 12. Croqui da área experimental de cana-de-açúcar onde foram instaladas as iscas () para avaliação da atratividade para <i>Sphenophorus levis</i> (São João da Boa Vista- SP).....	39
Figura 13. Tratamentos avaliados em campo para captura de <i>Sphenophorus levis</i> . (A) Colmo. (B) Colmo + Vinhaça <i>in natura</i> . (C) Água. (D) Vinhaça <i>in natura</i>	40
Figura 14. Cuba de vidro.....	41
Figura 15. Coleta e eluição dos compostos da vinhaça. (A) Equipamento de Fluxo de ar para coleta dos compostos. (B) Aplicação de solvente para eluição dos compostos no polímero.	42
Figura 16. Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massas (GC-MS).....	42
Figura 17. Resposta olfativa de machos adultos de <i>Sphenophorus levis</i> em olfatômetro a odores produzidos de Vinhaça vs Água (Controle); Vinhaça vs Melaço; Vinhaça vs Colmo; Vinhaça vs Água residual; Água (Controle) vs Água (Controle). As barras representam a resposta inicial dos insetos (quando o inseto alcançou em 25 minutos um dos braços do olfatômetro). Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos de acordo com o teste binomial (* $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$) N = 20. .	45
Figura 18. Resposta olfativa de fêmeas adultas de <i>Sphenophorus levis</i> em olfatômetro a odores produzidos de Vinhaça vs Água (Controle); Vinhaça vs Melaço; Vinhaça vs Colmo; Vinhaça vs Água residual; Água (Controle) vs Água (Controle). As barras representam a resposta inicial dos insetos (quando o inseto alcançou em 25 minutos um dos braços do olfatômetro). Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos de acordo com o teste binomial (* $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$) N = 20. .	46

Figura 19. Resposta olfativa de machos adultos de *Sphenophorus levis* em olfatômetro a odores produzidos de 100 mL de Vinhaça vs 100 mL de Água (Controle); 100 mL de Água (Controle) vs 30 cm de colmo; diferentes volumes de vinhaça comparados com 30 cm de colmo; e 2 mL de Vinhaça comparados com diferentes comprimentos de colmo. As barras representam a resposta inicial dos insetos (quando o inseto alcançou em 25 minutos um dos braços do olfatômetro). Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos de acordo com o teste binomial (* $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$) N = 20 47

Figura 20. Resposta olfativa de fêmeas adultas de *Sphenophorus levis* em olfatômetro a odores produzidos de 100 mL de Vinhaça vs 100 mL de Água (Controle); 100 mL de Água (Controle) vs 30 cm de colmo; diferentes volumes de vinhaça comparados com 30 cm de colmo; e 2 mL de Vinhaça comparados com diferentes comprimentos de colmo. As barras representam a resposta inicial dos insetos (quando o inseto alcançou em 25 minutos um dos braços do olfatômetro). Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos de acordo com o teste binomial (* $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$) N = 20. 47

Figura 21. Número de adultos de *Sphenophorus levis* atraídos para os seguintes tratamentos em campo: (i) Colmo; (ii) Colmo + Vinhaça em hidrogel; (iii) Vinhaça em hidrogel. As barras representam a média de insetos capturados por iscas (tratamentos). Médias com mesma letra minúscula nas barras não diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey..... 48

Figura 22. Número de adultos de *Sphenophorus levis* atraídos para os seguintes tratamentos em campo: (i) Colmo; (ii) Colmo + Vinhaça *in natura*; (iii) Água; (iv) Vinhaça *in natura*. As barras representam a média de insetos capturados por iscas (tratamentos). Médias com mesma letra minúscula nas barras não diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey..... 49

Figura 23. Compostos voláteis da vinhaça detectados pela análise cromatográfica (GC-MS). Os picos indicam a intensidade em microvolts de cada composto identificado. 50

Figura 24. Resposta olfativa de machos adultos de *Sphenophorus levis* em olfatômetro a odores produzidos de Mix 1000 ppm vs Óleo mineral; Mix 100 ppm vs Óleo mineral; Mix 10 ppm vs Óleo mineral; Óleo mineral (Controle) vs Óleo mineral (Controle). As barras representam a resposta inicial dos insetos (quando o inseto alcançou em 25 minutos um dos braços do olfatômetro). Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos de acordo com o teste binomial (* $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$) N = 20. Mix = mistura de todos os compostos identificados na vinhaça. 51

Figura 25. Resposta olfativa de fêmeas adultas de *Sphenophorus levis* em olfatômetro a odores produzidos de Mix 1000 ppm vs Óleo mineral; Mix 100 ppm vs Óleo mineral; Mix 10 ppm vs Óleo mineral; Óleo mineral (Controle) vs Óleo mineral (Controle). As barras representam a resposta inicial dos insetos (quando o inseto alcançou em 25 minutos um dos braços do olfatômetro). Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos de acordo com o teste binomial (* $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$) N = 20. Mix = mistura de todos os compostos identificados na vinhaça. 51

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 A cultura da cana-de-açúcar.....	17
3.2 Aspectos bioecológicos de <i>S. levis</i>	19
3.2.1 Ovo.....	19
3.2.2 Larva.....	19
3.2.3 Pupa.....	20
3.2.4 Adulto.....	21
3.2.5 Espécies semelhantes e hospedeiros alternativos.....	22
3.2.6 Distribuição geográfica.....	24
3.2.7 Danos causados em cana-de-açúcar.....	24
3.2.8 Monitoramento e Controle.....	25
3.3 Vinhaça da cana-de-açúcar.....	28
3.4 Água residuária da cana-de-açúcar.....	29
3.5 Ecologia química de insetos.....	30
3.6 Estudos de quimiotropismo de insetos.....	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Coleta dos insetos.....	32
4.2 Caracterização morfológica dos adultos.....	32
4.3 Resposta olfativa a vinhaça, colmo, melaço e água residuária.....	33
4.4 Resposta olfativa a vinhaça em diferentes volumes e diferentes comprimentos de colmos.....	35
4.5 Estudos de campo.....	36
4.6 Análise Cromatográfica de voláteis.....	40
4.7 Resposta olfativa aos componentes químicos da vinhaça em laboratório.....	43
4.8 Análise estatística.....	44
5. RESULTADOS	45
5.1 Resposta olfativa a vinhaça, colmo, melaço e água residuária.....	45
5.2 Resposta olfativa a vinhaça em diferentes volumes e diferentes comprimentos de colmos.....	46
5.2 Estudos de campo.....	48
5.3 Análise Cromatográfica de voláteis.....	49
5.4 Resposta olfativa aos componentes químicos da vinhaça em laboratório.....	50
6. DISCUSSÃO	52
7. CONCLUSÃO	56
8. REFERÊNCIAS	57

1. INTRODUÇÃO

O setor sucroenergético do Brasil representa o atual cenário da atividade canavieira, com grande importância para o agronegócio brasileiro e para a economia mundial. Segundo a CONAB (2018) o país se destaca como o maior produtor mundial da cana-de-açúcar, com uma estimativa de produção para a safra 2018/19 de 625,96 milhões de toneladas e área colhida de 8,61 milhões de hectares. Dispõe de um altíssimo nível de investimentos tecnológicos para a produção e processamento da cana, devido à demanda nacional e internacional por seus subprodutos, principalmente açúcar e etanol.

As usinas de açúcar e etanol são as grandes responsáveis por todo beneficiamento, desde produção inicial a comercialização dos subprodutos. Existem aproximadamente 411 unidades produtoras distribuídas em 23 Estados brasileiros, sendo o Estado de São Paulo o maior produtor nacional em área plantada e colhida de cana-de-açúcar. Para São Paulo, a estimativa de produção é de 337,24 milhões de toneladas, onde 172 usinas estão situadas em seu território, equivalente a 41,8% (NOVACANA, 2018).

A produção do etanol brasileiro oriundo da cana-de-açúcar tem se expandido, visto que é uma alternativa de biocombustível favorável para o meio ambiente, onde a produção de maior relevância foi na safra 2015/16 atingindo 30,46 bilhões de litros. Para a safra 2018/19 há uma estimativa de redução para 28,16 bilhões de litros, devido uma preferência de mercado pelo açúcar (CONAB, 2018).

Em relação ao processo industrial do etanol, uma das etapas para a sua obtenção denomina-se “destilação fracionada do caldo de cana-de-açúcar”. Nesta etapa, especificamente é gerado um efluente líquido, conhecido como vinhaça, de aspecto marrom escuro com um odor forte e característico, rica em nutrientes e matéria orgânica. A cada litro de etanol produzido, em média 13 litros de vinhaça são gerados (PAULINO *et al.*, 2011). A vinhaça é empregada no setor agrícola através da fertirrigação para o desenvolvimento da própria cana-de-açúcar. Essa prática compreende-se um destino adequado para este resíduo, além da minimização do consumo de água e fertilizantes em campo (ROBLES-GONZALEZ *et al.*, 2010; VIEIRA, 1986). Além disso, a fermentação da vinhaça junto com a matéria orgânica do solo tem promovido melhorias na atividade microbiana do solo (Wei *et al.* 2015).

A expansão de novas áreas com cultivos da cana-de-açúcar proporciona o aumento populacional de pragas agrícolas, entre elas, *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae), inseto de solo conhecido popularmente como bicudo-da-cana ou

gorgulho da cana-de-açúcar. É uma praga primária e limitante da cultura, onde a fase larval compromete todo o desenvolvimento da planta com construções de galerias no rizoma, ocasionando perdas de até 25 t.ha⁻¹. ano⁻¹ (PRECETTI; ARRIGONI, 1990). A ocorrência inicial dessa espécie no Brasil foi catalogada no ano de 1978 em Curitiba, PR e no ano de 1983 a praga foi encontrada em cana-de-açúcar na região de Piracicaba, SP (VAURIE, 1978).

De acordo com Stingel *et al.* (2010) o inseto se encontra em mais de 124 municípios paulistas, além de outros estados brasileiros. Provavelmente, a ocorrência em novas áreas e aumento de infestações do *S. levis* se deve a dispersão de mudas retiradas de locais infestados. Além disso, Precetti e Arrigoni (1990) observaram que em áreas de cana com aplicação de vinhaça há um aumento da ocorrência do *S. levis*, levantando questionamentos e hipótese de que a fermentação da vinhaça possa liberar compostos químicos voláteis que são atrativos para o inseto.

Para o estudo desta hipótese, olfatômetros de duas vias podem ser utilizados para determinar a resposta olfativa de adultos de *S. levis* para os semioquímicos (compostos voláteis) liberados pela vinhaça. Além disso, as estruturas químicas dos compostos voláteis responsáveis pela resposta do inseto podem ser determinadas através de técnicas de espectrometria de massas acopladas a cromatografia gasosa (GC-MS) (ZHAO *et al.*, 2013).

Assim, o presente estudo buscou investigar a resposta olfativa de adultos de *S. levis* à vinhaça em laboratório, avaliar a resposta olfativa também à diferentes volumes de vinhaça e diferentes comprimentos de colmo, avaliar em campo o efeito de combinações envolvendo a vinhaça formulada em hidrogel e *in natura* com o colmo de cana, identificar os compostos voláteis da vinhaça por GC-MS e além disso, avaliar a resposta olfativa à mistura dos compostos da vinhaça. Dessa forma, permitindo compreender a razão para maiores infestações de *S. levis* em áreas com aplicações de vinhaça, ainda auxiliando na descoberta de semioquímicos com potenciais para uso no monitoramento, captura ou controle de *S. levis* em campo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a resposta olfativa de adultos de *Sphenophorus levis* à vinhaça da cana-de-açúcar.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a resposta olfativa de adultos de *S. levis* à vinhaça, melão, colmo de cana-de-açúcar e água residuária, em condições de laboratório;
- Avaliar a resposta olfativa de adultos de *S. levis* à vinhaça em diferentes volumes, comparada ao colmo de cana em comprimentos variados, em condições de laboratório;
- Avaliar a atração de *S. levis* à vinhaça, em condições de campo;
- Identificar a estrutura química dos compostos voláteis da vinhaça;
- Avaliar a resposta olfativa de *S. levis* aos componentes químicos identificados na vinhaça, em condições de laboratório.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A cultura da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar pertence ao grupo das gramíneas, da família Poaceae e gênero *Saccharum* que abrange várias espécies, os cultivos geralmente são com plantas híbridas. Existem muitas teorias da origem da cana-de-açúcar, acredita-se que ela seja nativa das ilhas do arquipélago da Polinésia e que tenha se expandido com o desenvolvimento humano, na qual foi trazida para o Brasil logo após a chegada dos portugueses, em 1520 (MIRANDA, 2008; FIGUEIREDO, 2008). O Brasil é considerado o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e de seus derivados, seguido pela Índia e China (FAO, 2015).

A cana-de-açúcar é uma cultura semi-perene, podendo produzir de cinco a sete anos, com até três safras anuais, fácil de ser implantada, com baixo custo de manutenção e de propagação vegetativa por meio de colmos que contém gemas axilares, onde se dá a formação de uma nova planta (SCARPARI; BEAUCLAIR, 2008). O colmo é formado por nó e entrenós, cada entrenó acumula seu próprio açúcar, com valores de sacarose mais elevados na direção do centro do colmo (ALEXANDER, 1973). A cana possui uma característica muito significativa para a sua produtividade, um processo de perfilhamento que emite brotações, colmos ou hastes laterais que são denominadas de perfilhos (SUGITANI; MATSUOKA, 2001).

Os fatores indispensáveis para o desenvolvimento da cultura como luz, temperatura, umidade do solo e nutrientes devem ser manejados corretamente com um conjunto de práticas que incluem espaçamento, profundidade, época de plantio, época de corte e controle de pragas (ALEXANDER, 1973). O primeiro plantio do canavial recebe o nome de cana-planta, após os sucessivos cortes recebe o nome de cana-soca até completar o ciclo da cana plantada, posteriormente, realiza-se a reforma do canavial com um novo plantio ou rotação de culturas (BOLONHEZI; PEREIRA, 1999).

A canavicultura no Estado de São Paulo passou por transição de colheita da cana queimada para a colheita da cana crua, regulamentada pela lei estadual nº 11.241/2002 que proíbe a queima do canavial pré-colheita (RIBEIRO; FICARELLI, 2010). A queima da palhada era uma prática que facilitava os trabalhadores no corte manual para a colheita da cana queimada e com o aumento de áreas com a cana crua aumentou também a colheita mecanizada. Porém, a permanência da palhada no campo criou-se um ambiente propício para o desenvolvimento e aumento populacional de pragas de solo (DINARDO-MIRANDA; FRACASSO, 2013).

Embora o Brasil seja o maior produtor da cana-de-açúcar, há uma queda de produtividade entre as safras. Dentre os fatores de afetação, as pragas agrícolas são as que causam dano econômico para a cultura, com a capacidade de comprometer índices quantitativos como TCH (Tonelada de Cana por Hectare) e índices qualitativos como ATR (Açúcar Total Recuperado). Conforme o aumento de áreas para o plantio de cana ocorre o aumento proporcional de problemas relacionados com pragas, visto uma maior disponibilidade de alimento para estes insetos (ALMEIDA, 2005).

No país, existem diversas espécies de insetos associadas à cultura da cana-de-açúcar, as mais conhecidas são as que trazem severos prejuízos à cultura quando não manejados. Alguns exemplos encontra-se a broca-da-cana *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) e broca-gigante *Telchin licus* (Drury, 1773) (Lepidoptera: Castniidae), ambas se alimentam do colmo, causando perda de peso e facilitando a infecção por microrganismos (BOTELHO; MACEDO, 2002; VILLAS BOAS; ALVES, 1988). Cigarrinha-das-raízes *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae) que ataca raízes e folhas, se alimentando da seiva da planta, refletindo em perdas na produtividade e qualidade da matéria-prima (ALMEIDA; STINGEL; ARRIGONI, 2008).

Os insetos de solo que atuam na cultura são considerados importantes e necessitam de uma atenção maior, de maneira geral são difíceis de serem controlados. Não há uma visualização direta desses insetos no campo, por se desenvolverem no solo, mas a presença se nota pelos danos e sintomas que a planta apresenta (DINARDO-MIRANDA, 2008). Os principais insetos com hábitos subterrâneos são: cupins dos gêneros *Heterotermes* (Isoptera: Rhinotermitidae), *Procornitermes* (Isoptera: Termitidae) e *Neocapritermes* (Isoptera: Termitidae); besouro da raiz da cana-de-açúcar *Migdolus fryanus* (Westwood, 1986) (Coleoptera: Cerambycidae); e bicudo-da-cana *S. levis* (Coleoptera: Curculionidae).

Em geral, as pragas da cana-de-açúcar ocorrem em mais de 14,9 mil hectares em todo território brasileiro e ocasionam prejuízos anuais para o setor sucroenergético no total de R\$ 6,7 bilhões (Palestra) ¹.

¹ ALMEIDA, L. C. Pragas de solo da cultura da cana-de-açúcar, Jaboticabal, 14 jul 2017. Palestra ministrada no XI Curso de Inverno em Entomologia Agrícola – UNESP.

3.2 Aspectos bioecológicos de *S. levis*

3.2.1 Ovo

As fêmeas adultas ovopositam na base das brotações ou no nível do solo, após perfurarem a casca do colmo com as mandíbulas. Geralmente ovopositam 40 a 70 ovos ao longo do ciclo, sendo um ovo por dia ou até mesmo por semana, onde 75% são depositados na primeira metade da vida. No momento da postura os ovos possuem uma coloração branco-leitosa e quando estão próximos à eclosão das larvas tornam-se amarelo-escuros, são de forma elíptica e com aproximadamente $0,27 \text{ mm} \pm 0,004 \text{ mm}$ de comprimento e $0,10 \text{ mm} \pm 0,012 \text{ mm}$ de largura (Figura 1). O período de incubação está entre 7 a 12 dias (DEGASPARI *et al.*, 1987; PRECETTI; ARRIGONI, 1990).

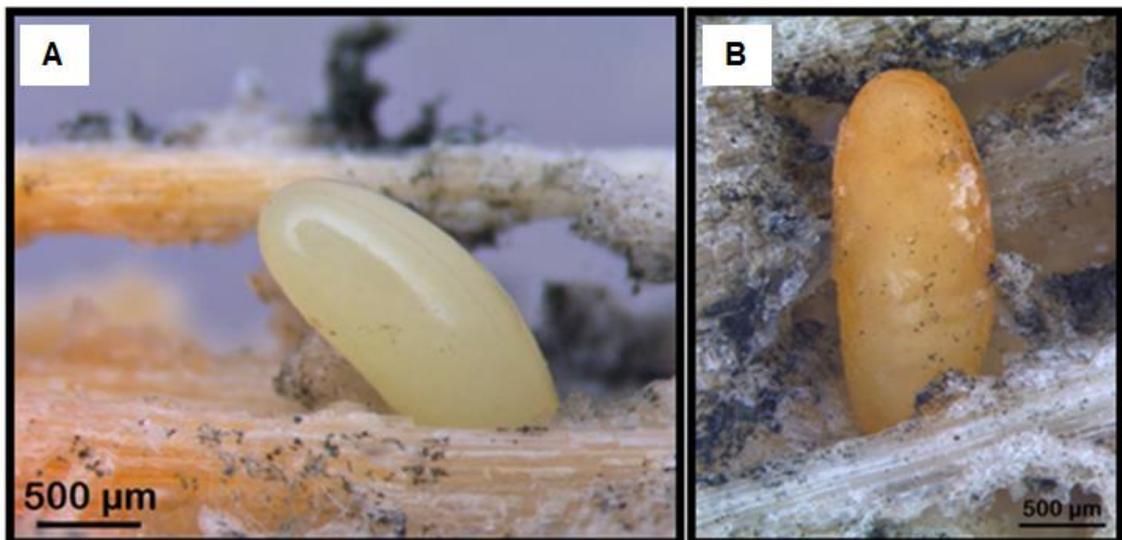


Figura 1. Ovos de *Sphenophorus levis*. (A) Ovo de postura recente. (B) Ovo próximo à eclosão da larva.
Fonte: Costa, V. A.

3.2.2 Larva

As larvas se desenvolvem no interior dos colmos, são ápodas, possuem mandíbulas desenvolvidas e se locomovem apoiando nas galerias abertas para se alimentarem. Em campo, as larvas podem ser encontradas nos meses de maio a julho (DEGASPARI *et al.*, 1987). Apresentam manchas castanho-escuros sobre o dorso e no primeiro segmento torácico ligado a cabeça, além de visíveis espiráculos no abdome (Figura 2). O período larval de *S. levis* varia de 30 a 60 dias, geralmente com uma média de 50 dias. Quando o fim do período larval se aproxima, as larvas ampliam a galeria com a finalidade de preparar a câmara pupal,

fase denominada pré-pupa. Posteriormente, cessam os seus movimentos e alimentação, dessa forma diminuem de tamanho e peso e passam para o estágio de pupa (DEGASPARI *et al.*, 1987; PRECETTI; ARRIGONI, 1990).

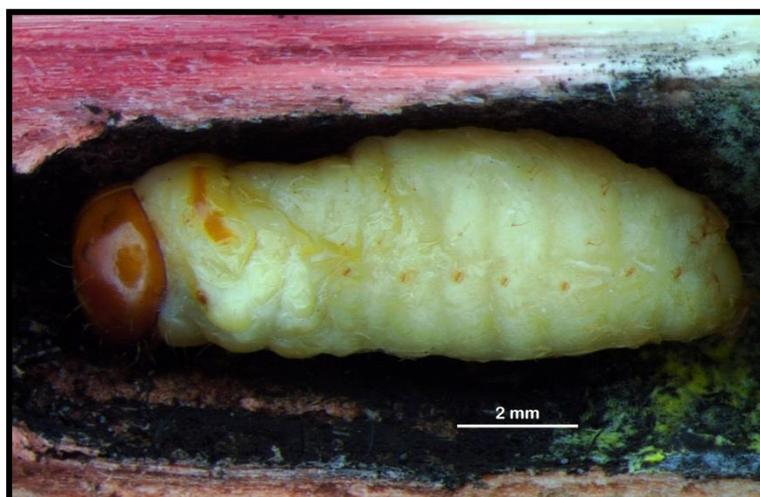


Figura 2. Larva de *Sphenophorus levis*.
Fonte: Costa, V. A.

3.2.3 Pupa

No início do estágio as pupas possuem uma coloração branco-leitosa e ao final do estágio, quando se aproxima a emergência dos adultos, adquirem uma coloração castanha, podendo ser encontradas em um casulo friável feito com serragem fina (Figura 3). Em condições de laboratório, o período pupal de *S. levis* pode ter uma duração de 5 a 13 dias, com média de 10,5 dias (DEGASPARI *et al.*, 1987).



Figura 3. Pupa de *Sphenophorus levis*.
Fonte: Costa, V. A.

3.2.4 Adulto

Os adultos se encontram abaixo do nível do solo, podendo também permanecer nos restos vegetais ou entre os perfilhos na base da touceira. Têm hábitos noturnos, poucos ágeis, possuem um comportamento denominado tanatose que simulam estar mortos quando são tocados (PRECETTI; TERAN, 1983; PINTO; GARCIA; DE OLIVEIRA, 2006). No Brasil, apresentam-se dois picos populacionais, o principal é na estação do verão, entre os meses de fevereiro e março e o outro em menor intensidade na primavera, meses de outubro e novembro (DEGASPARI *et al.*, 1987).

O inseto no estágio adulto possui coloração castanho-escuro com manchas pretas no dorso do tórax e listras longitudinais sobre os élitros. A fêmea mede em média 11,90 mm \pm 0,10 mm de comprimento, variando entre 10,50 mm e 13,30 mm e normalmente o macho é menor, mede 9,70 mm \pm 0,10, variando entre 7,70 mm até 11,20 mm (Figura 4). A longevidade em campo do adulto pode ser menor, visto que o inseto se alimenta da cana-de-açúcar e quando há o corte da cana, o alimento torna-se indisponível. Em condições de laboratório a longevidade do adulto pode ser de até 249 dias (PRECETTI; ARRIGONI, 1990).

Barreto-Triana *et al.* (2007) avaliaram que o melhor período para a reprodução e acasalamento dos adultos varia entre os 21 e 35 dias depois de emergido, podendo ocorrer o acasalamento em qualquer horário.

Em relação à dispersão no campo, apesar do adulto apresentar asas, possui capacidade restrita de voo, apresentando um voo irregular. Basicamente o seu deslocamento é realizado por caminhamentos, o deslocamento do macho pode chegar a 3 m/dia¹ e a fêmea até 5 m/ dia¹, com capacidade de infestar 167,4 hectares por ano (PRECETTI; TERAN, 1983). Provavelmente o principal meio de disseminação da praga para novas áreas é através do carregamento de mudas de cana-de-açúcar contendo formas biológicas do inseto como ovos, larvas, pupas e adultos (DINARDO-MIRANDA, 2000).

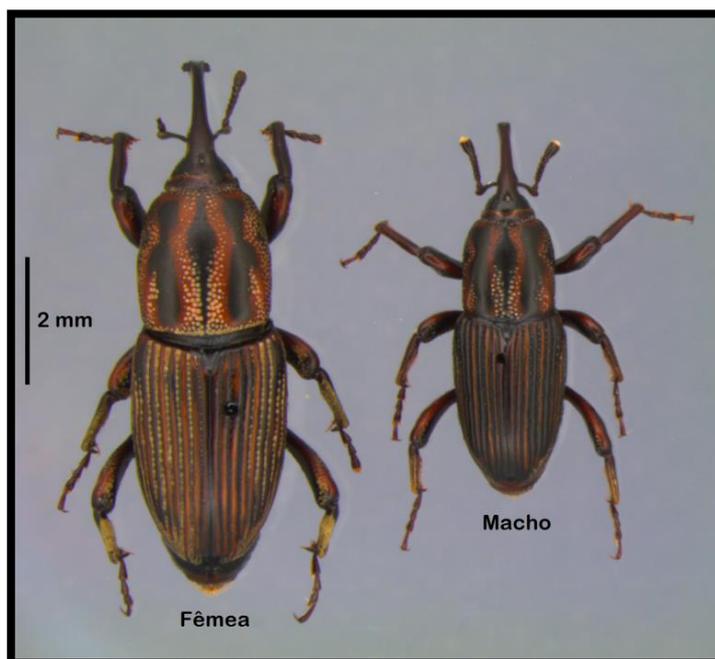


Figura 4. Adultos de *Sphenophorus levis*.

Fonte: Costa, V. A.

3.2.5 Espécies semelhantes e hospedeiros alternativos

As formas biológicas dos adultos *S. levis* se assemelham à algumas espécies também da família Curculionidae. Entre os produtores é muito comum haver dúvidas com *S. levis* e *Metamasius hemipterus* (Linnaeus, 1758), que além de possuir um padrão de machas no pronoto a espécie também ocorre em canaviais, considerado uma praga secundária, pois incide apenas em colmos previamente danificados (DINARDO-MIRANDA, 2014) (Figura 5). Segundo Garcia (2013b) as duas espécies foram inicialmente separadas pela coloração no pronoto, sendo alaranjado para *M. hemipterus* e castanho-avermelhado em *S. levis*, porém a coloração do corpo pode gerar erros. Existem insetos que possuem policromatismo, variação na coloração, devido fatores alimentares e geográficos, entre outros.



Figura 5. Adulto de *Metamasius hemipterus*.

Fonte: Costa, V. A.

Outro inseto que se assemelha morfológicamente à *S. levis*, porém não ocorre em cana-de-açúcar, é *Cosmopolites sordidus* (Germar, 1924), conhecido popularmente como moleque-da-bananeira (Figura 6). Segundo Fancelli *et al.* (2015) *C. sordidus* é considerada uma praga de grande importância em todas as regiões produtoras de banana do mundo. As larvas atacam o rizoma e a base do pseudocaule da planta prejudicando a absorção de água e nutrientes e porta de entrada para patógenos. Este inseto possui coloração escura, sem um padrão de manchas definidas.



Figura 6. Adulto de *Cosmopolites sordidus*.

Fonte: Costa, V. A.

A cana-de-açúcar é a principal espécie hospedeira do inseto *S. levis*, sendo relatado com maior ocorrência e dispersão na cultura, porém, outras espécies de plantas podem servir de abrigo para o inseto, ou seja, hospedeiros alternativos. O milho, uma gramínea pertencente à família Poaceae é uma planta hospedeira de *S. levis*, cultura em qual consegue completar o seu ciclo. Algumas informações de que a presença do inseto já foi relatada em bromeliáceas (VAURIE, 1978). Também em *Cynodon dactylon* L. (grama-seda), *Digitaria horizontalis* Willd. (capim-colchão) e *Brachiaria plantaginea* (capim-marmelada), ambas as espécies são plantas daninhas (PRECETTI; ARRIGONI, 1990; BARRETO-TRIANA, 2007).

3.2.6 Distribuição geográfica

O gênero *Sphenophorus* abrange um complexo de espécies que estão amplamente distribuídas em diferentes continentes, atacam culturas de importância econômica, especialmente do grupo das gramíneas. Acredita-se que o gênero seja originário da América do Norte, onde ocorrem setenta e cinco espécies. Há também ocorrência de dezoito espécies na América do Sul, onde quatorze espécies encontradas no Brasil; seis na Europa, na África do Norte e na Ásia; e vinte e seis em demais regiões da África e da região do Pacífico (CSIKI, 1936). Nos países da América do Sul, Vaurie (1978) relatou *S. levis* na Argentina, Uruguai e Brasil; Zarbin *et al.* (2003) relataram a presença do inseto no Paraguai.

No Brasil, *S. levis* foi catalogado em Curitiba, no Estado do Paraná, no ano de 1978 e no ano de 1983 foi encontrado em canaviais na região de Piracicaba, no Estado de São Paulo (VAURIE, 1978; PRECETTI; ARRIGONI, 1990). Além desses dois Estados, o inseto já foi encontrado em Minas Gerais e Santa Catarina (GIOMETTI *et al.*, 2011); Mato Grosso do Sul (MORAES; ÁVILA, 2013); Mato Grosso e Goiás (GARCIA, 2013a). Estudos conduzidos por Stingel *et al.* (2010) em canaviais pertencentes às usinas paulistas, concluíram que a presença de *S. levis* já foi assinalada em 124 municípios do Estado de São Paulo, evidenciando o Estado como o maior em áreas infestadas pela praga, além disso, estima-se que no ano de 2014 a ocorrência do inseto tenha se expandido por mais 60 municípios.

3.2.7 Danos causados em cana-de-açúcar

Antes, *S. levis* era considerada apenas uma praga secundária da cana-de-açúcar, entretanto, hoje a espécie se destaca como uma das principais pragas de solo da cultura em algumas regiões do Brasil, sendo considerada uma praga primária, refletindo em grandes perdas econômicas aos produtores. De acordo com Precetti e Arrigoni (1990), as larvas do

bicudo são as responsáveis em causar dano direto nos tecidos dos colmos de cana, ocorrendo morte das touceiras e conseqüentemente falhas na rebrota; podendo ocorrer uma diminuição do diâmetro, tamanho e número de colmos.

As larvas se alimentam do interior dos colmos, constroem galerias circulares e longitudinais, com um comprimento em média de 7,5 cm e no máximo de 21 cm acima do nível do solo. Essa destruição dos colmos realizada pelas larvas se reflete em amarelecimento das folhas, secagem e morte do perfilho. Muitas vezes o amarelecimento das folhas pode ser confundido com fitotoxidez, estresse hídrico e até excesso de aplicação de vinhaça, sendo necessária a constatação da presença de larvas no interior dos colmos para confirmação do dano pelo inseto (PRECETTI; ARRIGONI, 1990).

Alguns aspectos considerados por Almeida; Stingel e Arrigoni (2008), a respeito da presença de *S. levis* em cana crua, destaca o agravamento dos danos, por exemplo, a disseminação da praga em ritmo mais acelerado, aumento da população em relação as condições de abrigo providenciado pela palhada e principalmente quando há aplicações de vinhaça em área de cana crua.

Segundo Dinardo-Miranda e Fracasso (2010) os danos provocados pelas larvas de *S. levis* equivalem a uma redução de 33% na produtividade. Se não houver um controle efetivo da praga pode ocasionar uma diminuição severa da produtividade e prejudicar a longevidade do canavial.

3. 2.8 Monitoramento e Controle

O manejo integrado de pragas (MIP) é um sistema baseado em princípios ecológicos, considerações econômicas e sociais para tomada de decisões buscando o controle de uma praga. Através de uso de métodos integrados de forma compatível para manter os níveis populacionais da praga abaixo daqueles capazes de causar danos econômicos (KOGAN, 1998).

O monitoramento permite verificar e quantificar a presença de formas biológicas do inseto na cultura e conseqüentemente estabelecer medidas de controle que sejam eficazes. O monitoramento de *S. levis* pode ser realizado por meio do levantamento populacional nos estágios de larva e pupa ou adultos. Para monitorar as larvas e pupas no canavial, recomenda-se a abertura de trincheiras (0,5 m x 0,5 m x 0,3 m de profundidade) em dois pontos por hectare, coletando as formas biológicas presentes nas touceiras em cada ponto de amostragem (ALMEIDA; STINGEL; ARRIGONI, 2008).

O emprego de iscas tóxicas no campo proposto por Precetti e Arrigoni (1990) é uma alternativa tecnicamente viável para avaliação da população de adultos e também visando ao controle. Foi muito utilizada no final da década de 80 e início da década de 90. As iscas são confeccionadas com toletes de cana de 30 cm cortados longitudinalmente e imersos por 24 horas em uma solução contendo inseticida. Aconselha distribuir 500 iscas/ha na base das touceiras e cobrir com palha por um período consecutivo de 21 dias no campo.

O monitoramento passou por adaptações pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), visto que a metodologia considerada inviável pelo alto custo e grande demanda por mão de obra. Para avaliação de adultos, são distribuídas iscas de cana fresca por talhões e o tempo máximo de avaliação foi reduzido para até três dias, posteriormente realizado a contagem de adultos presentes nas iscas. Dessa forma, tem-se um resultado rápido do nível de infestações e permite-se programar para futuras aplicações de inseticidas, reduzindo o uso de inseticida e custos (DINARDO-MIRANDA *et. al.*, 2006).

Entre as ações de controle para *S. levis* mais aplicadas na cultura da cana-de-açúcar estão o controle cultural, controle químico, controle biológico e recentemente o controle genético, que se encontra ainda em estudo.

O controle cultural da área com a Eliminação Mecânica de Soqueira (EMS) destrói as soqueiras afetadas na reforma do canavial, especialmente nas épocas secas do ano, impede que adultos emergidos das soqueiras mortas ocorram nos novos brotos em formação. É considerada uma prática importante, porém, pode ser insuficiente para o manejo da praga no canavial. O CTC recomenda um método importante nas áreas que são destinadas a novos plantios de cana-de-açúcar, que seja realizado inspeções das mudas, elas deverão estar totalmente isentas de qualquer forma biológica de *S. levis* (DINARDO-MIRANDA, 2005).

O controle químico é uma alternativa para o combate ou diminuição dos níveis de população do bicudo-da-cana, apesar de adotar certas medidas o controle do inseto é muito difícil, pois ainda há o aumento de populações e novas áreas infestadas. Segundo Dinardo-Miranda (2014) para o bicudo-da-cana não há um nível de dano econômico definido, devido o alto dano causado em áreas que possuem histórico de ocorrência. Alguns produtos químicos estão registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para controle de *S. levis*, com os seguintes ingredientes ativos: lambda-cialotrina + tiametoxam (Engeo Pleno[®]), imidacloprido (Imidacloprid Nortox[®]), alfa-cipermetrina + fipronil (Regente Duo[®]), bifentrina + carbosulfano (Talisman[®]) (AGROFIT, 2017). Para obter uma melhor eficiência no controle químico, tem sido realizadas aplicações no sulco do plantio (DINARDO-MIRANDA, 2005).

O controle biológico inclui o uso de agentes biológicos que são seguros e seletivos, entretanto, condições adequadas no ambiente para o crescimento e ação desses agentes é extremamente necessária (CANASSA, 2014).

O controle biológico de larvas de *S. levis* utilizando nematoides entomopatogênicos (NEPs) tem obtido resultados satisfatórios. Os nematoides entomopatogênicos (Nematoda: Steinernematidae e Heterorhabditidae) são parasitas obrigatórios de inseto, possuem a capacidade de infectar várias pragas, especialmente as pragas que completam parte do ciclo no solo, possuem uma característica bastante específica de associação simbiótica com bactérias patogênicas do gênero *Photorhabdus e Xenorhabdus*. O juvenil infectivo (JI), fase do “NEP” de vida livre no solo, tem a capacidade de busca hospedeira, infectar o inseto e liberação das bactérias que são as responsáveis por causar septicemia e a morte do inseto dentro de 48 horas, dessa forma ele completa o seu ciclo no interior do inseto e se alimenta das próprias bactérias (DOLINSKI, 2006).

Segundo Leite *et al.* (2005) estudos conduzidos em laboratório mostraram que as larvas de *S. levis* foram susceptíveis aos NEPs *Heterorhabditis indica* e *Steinernema* sp. Obteve mortalidade acima de 70% na dosagem de 2,4 juvenis infectivos/cm² equivalente a 1×10^8 . Experimento em casa de vegetação próximo as condições de campo, avaliaram os NEPs contra larvas alojadas dentro do rizoma, as larvas demonstraram estarem infectadas. Os resultados evidenciam que são agentes promissores para controle da praga em canavial, visto que possui busca ativa do hospedeiro percorrendo pelo solo. No Brasil há registro de um único produto biológico para controle de *S. levis* com formulação de nematoides entomopatogênicos, cuja espécie é *Steinernema puertoricense* (Bio Nep Steinernema SC[®]). Outra característica relevante do uso de controle biológico com nematoides entomopatogênicos é a respeito da compatibilidade com a maioria dos produtos químicos, apresentando efeitos sinérgicos na mortalidade de insetos. Tavares *et al.* (2009) testaram a mistura de *Steinernema* sp. (60 JI/cm²) e fipronil (62,5g p.c/ha) no controle de adultos de *S. levis* e obtiveram 76,60% de mortalidade dos adultos, mortalidade acima dos tratamentos testados isoladamente.

Os fungos entomopatogênicos também são alternativas biológicas de controle, entre eles se destaca *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill (Ascomycota: Hypocreales). Os conídios deste fungo são eficientes no combate de diversas pragas, encontra-se naturalmente em muitos inseto-pragas, mas também pode ser isolado diretamente do solo. Diversos países utilizam *B. bassiana* em escala comercial na produção de inseticidas biológicos (BUTT; WALDEN, 2000). Em laboratório, Badilla e Alves (1991) avaliaram o efeito de isolados de *B.*

bassiana sobre adultos de *S. levis*, dentre os isolados avaliados, o isolado 447 obteve maior eficiência. Já no campo, utilizaram toletes de cana de 25 cm contaminados com o fungo, a uma dosagem recomendada de $4,9 \times 10^{11}$ conídios por toletes que proporcionou aproximadamente 93% de mortalidade dos adultos.

Estudos utilizando organismos entomopatogênicos indicam que *Bacillus thuringiensis* var. *Londrina* também tem ação sobre as larvas de *S. levis*. Segundo Lereclus (1988) *B. thuringiensis* é uma bactéria naturalmente encontrada no solo, durante sua fase de esporulação, sintetiza proteínas que se acumulam na periferia dos esporos na forma de cristais em um dos polos da célula. Estes cristais são compostos por uma ou várias proteínas *Cry*, também chamadas de d-endotoxinas ou Insecticidal Crystal Proteins (ICPs). Em estudos com o gene *Cry3* de *B. thuringiensis*, demonstraram que a proteína provocou uma redução no número de larvas desenvolvidas de *S. levis* (ABREU, 2006).

Recentemente foi avaliada uma planta de cana-de-açúcar geneticamente modificada resistente à *S. levis*. O desenvolvimento de plantas transgênicas de cana-de-açúcar que expressam o inibidor de cisteína peptidase 1 da cana-de-açúcar (CaneCPI-1) tem potencial para o controle de larvas de *S. levis*, afetando o seu desenvolvimento no interior dos colmos ao se alimentarem (SCHNEIDER *et al.*, 2017).

3.3 Vinhaça da cana-de-açúcar

A vinhaça é um subproduto da destilação do álcool para a fabricação do etanol, o produto inicial para a destilação se obtêm de três origens possíveis: mosto de caldo, mosto de melaço ou mosto misto (ELIAS NETO, 1988).

Primeiramente, a cana-de-açúcar após a sua maturação, com pelo menos 13% de sólidos solúveis (Brix), é colhida e transportada até a unidade produtora, passa por lavagem e moagem para a extração do caldo. Este caldo é de coloração escura, contém principalmente sacarose, glicose, leveduras e matéria nitrogenada; em seguida é submetido a um processo de clarificação com adição de produtos químicos, concentração e centrifugação para a obtenção do açúcar comercial (parte sólida) e mel (parte líquida). O mel recebe um cozimento a vácuo para obtenção do açúcar de segunda, e se transforma em mel pobre ou melaço. O mosto de melaço é fermentado e resulta-se em líquido chamado de vinho que é levado para colunas de destilação para produção do etanol, gerando como resíduo a vinhaça ou vinhoto, como é conhecido (SALOMON, 2007).

A vinhaça é composta em sua maioria por água e sua fração sólida por matéria orgânica e elementos minerais. A sua composição química é bastante variável dependendo do

processo industrial da matéria-prima (mosto), métodos de fermentação adotados e tipos de equipamentos empregados, qualidade e composição do vinho submetido para a destilação. Entre os minerais químicos presentes, o potássio é o elemento principal em maior quantidade, além de cálcio, magnésio, sulfato, fósforo, manganês e nitrogênio orgânico, sua relação Carbono e Nitrogênio (C/N) é igual a 17, caracteriza um bom material rico em proteínas (ALMEIDA, 1952). Com estas propriedades a vinhaça passou a ser empregada como fertilizante e como corretivo do solo na cultura da cana. Sua aplicação é através da fertirrigação, um conjunto da irrigação e adubação, que tem a utilização da própria água, podendo ser aplicada em qualquer sistema de irrigação. Esta prática é baseada em métodos de irrigação e principalmente acompanhada com uma análise química de solo periódica, na qual se almeja a nutrição da planta e melhoria do solo. Há uma desvantagem que encarece esta prática relacionada aos custos com transportes para descarregar a vinhaça no campo (SALOMON, 2007).

O uso indiscriminado da vinhaça no solo acarreta resultados negativos na produção, pela grande saturação de nutrientes, afeta também a qualidade final do açúcar na indústria, pois eleva teores de potássio e amido no caldo (CESAR *et al.*, 1978). Além disso, a vinhaça é altamente prejudicial para os cursos d'água, exige uma elevadíssima taxa de oxigênio para redução da matéria orgânica, o oxigênio este retirado da água; resíduo extremamente ácido e corrosivo; afeta os micros e macros invertebrados aquáticos; impossibilita os usos da água para consumo humano e animal (ALMEIDA, 1952).

A irrigação com a vinhaça necessita de monitoramento pelas usinas, pois há possibilidade de acumulação sobre o solo e a formação de grandes poças de vinhaça estagnadas, enfatizando o seu mau cheiro no ambiente e decomposição da matéria orgânica, sendo propício para atração e desenvolvimento de larvas de moscas (LEITE; CARVALHO; BITTENCOURT, 2013). A Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) estabeleceu a Norma Técnica P4. 231/2005 “Vinhaça – Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola”, para regulamentação do uso da vinhaça pelas Usinas de cana-de-açúcar, visto que estavam utilizando a vinhaça no solo sem o devido controle e manejo, muitas vezes apenas como um descarte do resíduo no solo.

3.4 Água residuária da cana-de-açúcar

O uso da água no setor sucroenergético é relativamente alto considerando os processos industriais da produção do açúcar e etanol e também o cultivo da cana-de-açúcar. Isso se deve principalmente pelos números de produção e moagem da cana e em regiões

naturalmente secas ou até mesmo em regiões que enfrentam anos severamente secos por conta das mudanças climáticas (COSTA, 2011).

Na indústria a quantidade de água a ser usada para a lavagem da cana que vem do campo será determinada pelo volume de cana e a quantidade de sólidos que esta cana carrega. Algumas usinas tomam certas medidas para diminuir a demanda de água na indústria através do reuso da própria água de lavagem após passar por tratamentos (OMENA *et al.*, 2004). Em campo a irrigação é uma etapa importante que influenciará na boa produtividade do canavial e na qualidade da matéria prima. Algumas medidas também são adotadas pelas usinas quando se trata de complementar a irrigação da cultura com a irrigação natural proveniente das chuvas. Além disso, existem sistemas de captação da água residuária do processo industrial, em que esta água passa por um procedimento relativamente simples de decantação para eliminar os sólidos grosseiros e é utilizada junto com a vinhaça na irrigação da cultura (COSTA, 2011).

3.5 Ecologia química de insetos

A ecologia química estuda as substâncias químicas envolvidas nas interações entre os organismos da mesma espécie ou espécies diferentes. Essas substâncias químicas são denominadas de semioquímicos (origem grega *semêion* = sinais), capazes de influenciar no comportamento e de regular as interações entre insetos (acasalamento, local de ovoposição, alimento, etc.) e entre insetos e plantas (defesa contra predadores, atração de inimigos naturais, etc.) (NORDLUND; LEWIS, 1976; VILELA; DELLA LUCIA, 2001). Os semioquímicos são classificados em dois grupos principais, dependendo do tipo de interação, sendo os feromônios responsáveis pela interação intraespecífica e os aleloquímicos com atuação interespecífica (VILELA; DELLA LUCIA, 2001).

Os feromônios relatados em curculionídeos são produzidos pelos machos e atraem ambos os sexos para um local específico em busca de alimentação e/ou acasalamentos. Por isso são conhecidos como feromônios de agregação. Além disso, existem também feromônios sexuais, sinais químicos para atração de indivíduos do sexo oposto para acasalamento. Foi identificado por Zarbin *et al.* (2003; 2004) um feromônio de agregação de *S. levis*, denominado isômero (S)-2-metil-4-octanol, de promover um comportamento de agregação entre insetos adultos em laboratório. Atualmente existem alguns estudos utilizando o feromônio sintetizado em iscas para atração de *S. levis* em campo.

Os aléloquímicos se classificam conforme o indivíduo se beneficia, denomina-se cairomônios os compostos que beneficia o indivíduo receptor, por exemplo, cairomônios,

liberados por plantas que são atrativos para insetos; alomônios, que beneficia o emissor, por exemplo, plantas que emitem voláteis que são repelentes ou tóxicos para predadores; e sinônimos quando ambos são beneficiados (ZARBIN; RODRIGUES; LIMA, 2009).

Os semioquímicos podem ser utilizados na agricultura especialmente no manejo de insetos-pragas, sendo administrados como atraentes ou repelentes das pragas, podem estimular ou inibir a alimentação, o acasalamento e o voo dos insetos. No Manejo Integrado de Pragas (MIP) o ferômonio sexual e de agregação estão entre as substâncias mais ativas e conhecidas atualmente, já empregados em manejo de várias pragas, através de armadilhas para monitoramento massal, controle das pragas e confusão sexual. De um modo geral, é uma tecnologia eficiente para o manejo e contribui para um manejo sustentável e seletivo, sem agredir o meio ambiente (ZARBIN; RODRIGUES; LIMA, 2009).

3.6 Estudos de quimiotropismo de insetos

Em estudos comportamentais visando uma investigação de quimiotropismo, reação a substâncias químicas pelo odor ou olfato (resposta olfativa) de insetos caminhadores e voadores é apropriada utilização de sistemas fechados, como olfatômetros, câmaras-teste e túneis de vento. Nesses sistemas os indivíduos são expostos as semioquímicos e através de seus órgãos sensoriais, principalmente as antenas, onde estão presentes os receptores sensoriais denominados de sensilas, conseguem detectar os compostos e comprovar a existência de quimiotropismo positivo (atratividade) ou quimiotropismo negativo (repelência), (CARLSON; SCHRECK; BRENNER, 1992; LOGAN & BIRKETT, 2007).

Para obter resultados nem sempre se faz necessário o uso de equipamentos sofisticados, mas é preciso levar em consideração a escolha do equipamento com as características do inseto em estudo. Indispensável o controle dos fatores ambientais como luz, temperatura e umidade relativa (VIANA, 1992). Existem variados modelos de olfatômetros, desde uma simples caixa quadrada ou retangular, com tubos de inserção até modelos mais sofisticados com várias vias de estímulos ou em formato de “Y”, com sistemas controlados na liberação de odor, temperatura e umidade e filtragem de ar no sistema, a fim de evitar interferências do ambiente na resposta do inseto. No caso de curculionídeos, que possuem um comportamento de defesa se fingindo de mortos quando atacados, o equipamento mais adequado para resposta olfativa é utilização do olfatômetro de duas vias (VIANA, 1992).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta dos insetos

Os adultos de *S. levis* foram coletados semanalmente em campos de cana-de-açúcar em épocas de picos populacionais. Primeiramente, em uma área pertencente ao Grupo Raízen Energia S/A- Unidade Costa Pinto, Piracicaba- SP, no período de outubro de 2016 a janeiro de 2017. Após este período, os insetos foram coletados em uma nova área pertencente à Usina Abengoa Bioenergia, São João da Boa Vista- SP, no período de fevereiro de 2017 a fevereiro de 2018.

Para a coleta dos insetos, em ambas as áreas foram distribuídas iscas formadas por colmo de cana com 30 cm cortados longitudinalmente, sendo cada isca constituída de duas metades do colmo, colocadas na base das touceiras com as faces cortadas voltadas para o solo e cobertas com palha. As iscas eram mantidas no campo por 3-7 dias, posteriormente, os insetos eram coletados e levados para o Laboratório de Controle Biológico no “Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde Animal- CAPSA” pertencente ao Instituto Biológico, Campinas- SP. Mantidos em frascos acondicionados a 25°C e alimentados por colmos de cana que eram trocados a cada 7 dias.

4.2 Caracterização morfológica dos adultos

A fim de separar os insetos adultos quanto ao sexo, foram determinadas características morfológicas que auxiliam no dimorfismo sexual, identificados conforme características descritas por Vaurie (1978) e Zorzenon; Bergmann e Bicudo (2000). Inicialmente, o tamanho dos insetos é a característica mais relevante que pôde ser observada a olho nu, pois normalmente as fêmeas apresentam maior tamanho corporal que os machos. Com auxílio de um microscópio estereoscópico observou-se a presença de manchas no pronoto, pois os machos apresentam um padrão de manchas mais definido que as fêmeas. Outra característica é a região pilosa: há abundância de pelos nos machos em toda a parte ventral do abdome e nas fêmeas os pelos são escassos, restringindo-se a região apical. Além disso, os machos apresentam o pigídio arredondado e curvado e as fêmeas apresentam o pigídio truncado (Figura 7).

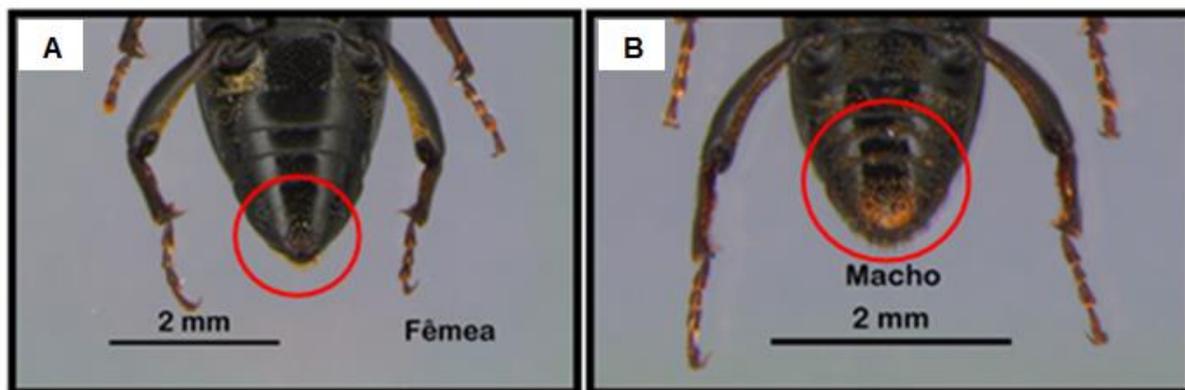


Figura 7. Região ventral de *Sphenophorus levis*. (A) Região ventral fêmea, destacando o formato do pigídio. (B) Região ventral macho, destacando o formato do pigídio e região pilosa.

Fonte: Costa, V. A.

4.3 Resposta olfativa a vinhaça, colmo, melaço e água residuária

Os bioensaios de resposta olfativa foram conduzidos no Laboratório de Controle Biológico no “Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde Animal- CAPSA” pertencente ao Instituto Biológico, Campinas- SP, no período de 2016 a 2018.

Este primeiro estudo teve por objetivo avaliar a atração de adultos de *S. levis* à vinhaça da cana-de-açúcar em laboratório, comparando-se a vinhaça com o colmo de cana, o melaço, a água residuária e a água (controle). Os testes comparativos foram realizados em dupla: (i) vinhaça vs colmo de cana-de-açúcar; (ii) vinhaça vs melaço; (iii) vinhaça vs água; (iv) vinhaça vs água residuária; (v) água vs água (determinado como controle, para demonstrar que o inseto não tem tendência de escolha para um determinado lado). A resposta olfativa em cada teste foi avaliada em olfatômetro de duas vias (95 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro), confeccionado com tubos de PVC seguindo protocolo adaptado de Filgueiras *et al.* (2016). As respostas olfativas foram avaliadas separadamente para insetos adultos machos e fêmeas, estabelecendo 20 repetições com insetos machos adultos e 20 repetições com insetos fêmeas adultas, a fim de investigar se há diferença na resposta entre os sexos.

Foram construídos 5 (cinco) olfatômetros, sendo necessário para cada um: 1 (um) “Tubo” DN 40 de 80 cm, 2 (duas) “Luvas de correr” DN 40, 1 (um) “Tê” DN 40 e 2 (dois) “Cotovelos” 90° DN 40. O “Tubo” foi dividido em 4 (quatro) partes com auxílio de uma serra manual, cada parte com 20 cm. As quatro partes foram conectadas com as duas “Luvas de correr” nas laterais e com um “Tê” no meio para liberação dos insetos. Em cada

extremidade foi encaixado um “Cotovelo” para liberação dos tratamentos, havendo um “tecido voal” para impedir os insetos de alcançarem os atrativos (Figura 8).

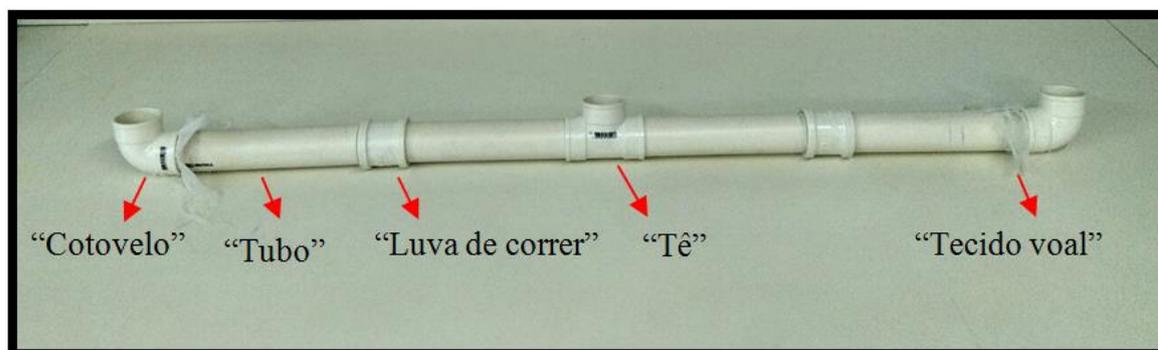


Figura 8. Olfatômetro de duas vias
Fonte: Elaborada pela autora.

Para as comparações, os tratamentos foram colocados nas extremidades dos olfatômetros, pelas aberturas do “Cotovelo” que se mantiveram abertos. Para os tratamentos vinhaça, água residuária e água, 2 mL de cada produto foi aplicado com auxílio de uma pipeta sobre um algodão odontológico de aproximadamente 4 cm de comprimento. Para o tratamento melaço, 40 g do produto foi aplicado sobre o algodão. O colmo foi retirado da base de uma planta de cana-de-açúcar da variedade CV66S4, cortado ao meio longitudinal e apenas uma fatia de 5 cm com a casca foi usada para cada repetição. A vinhaça, o melaço, a água residuária e o colmo de cana-de-açúcar foram obtidos da Unidade Costa Pinto do Grupo Raízen, Piracicaba- SP.

Os insetos eram liberados individualmente nos olfatômetros, com auxílio de uma pinça. Cada inseto foi inserido no centro do olfatômetro pela abertura do “Tê”. Após a liberação, uma folha de alumínio foi colocada sobre a abertura para evitar entrada de luz, que poderia interferir na escolha do inseto (Figura 9). Foi realizado um pré-teste no olfatômetro para definir o tempo máximo de avaliação de cada bioensaio, concluindo-se que 25 minutos foi tempo suficiente para o inseto responder olfativamente a um determinado tratamento.

Após cada repetição realizada, foi utilizado um novo inseto e os tratamentos eram substituídos por novos. O olfatômetro e o tecido voal eram higienizados com água corrente e a posição do olfatômetro invertida, a fim de não haver tendências de escolha somente para um lado. Os insetos que não se deslocaram após as liberações ou que não alcançaram os 40 cm de distância do ponto de partida após 25 minutos não foram considerados nas análises dos resultados. Os testes foram conduzidos no período diurno matutino e vespertino, sob temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e ausência de luz.



Figura 9. Olfatômetros utilizados no bioensaio.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.4 Resposta olfativa a vinhaça em diferentes volumes e diferentes comprimentos de colmos

Este segundo estudo teve por objetivo comparar a vinhaça em diferentes volumes com o colmo em diferentes comprimentos, quanto à atratividade dos substratos para adultos de *S. levis* em laboratório. Os testes comparativos foram realizados em dupla, conforme a seguir: (i) 2 mL de vinhaça vs 10 cm de colmo; (ii) 2 mL de vinhaça vs 15 cm de colmo; (iii) 2 mL de vinhaça vs 20 cm de colmo; (iv) 2 mL de vinhaça vs 25 cm de colmo; (v) 2 mL de vinhaça vs 30 cm de colmo; (vi) 6 mL de vinhaça vs 30 cm de colmo; (vii) 12 mL de vinhaça vs 30 cm de colmo; (viii) 25 mL de vinhaça vs 30 cm de colmo; (ix) 50 mL de vinhaça vs 30 cm de colmo; (x) 100 mL de vinhaça vs 30 cm de colmo; (xi) 100 mL de água vs 30 cm de colmo; (xii) 100 mL de vinhaça vs 100 mL de água. As respostas olfativas foram avaliadas separadamente para insetos adultos machos e fêmeas, estabelecendo 20 repetições para cada sexo, a fim de investigar se há diferença na resposta entre os sexos.

Para os bioensaios, foram utilizados olfatômetros de duas vias (1,65 cm e 3 cm de diâmetro) (Figura 10), os mesmos utilizados nos bioensaios anteriores, porém com modificações para se adequar aos tratamentos, seguindo protocolo adaptado de Filgueiras *et al.* (2016). Nas extremidades, os dois “cotovelos” foram substituídos por dois “tubos” de 40 cm cada, encaixados nas “Luvas de correr” com um “tecido voal” para impedir que os insetos alcançassem os atrativos. Com o auxílio de pipetas, a vinhaça foi aplicada no volume de 2 mL

sobre um chumaço de algodão odontológico de 4 cm de comprimento, no volume de 6 mL sobre um chumaço de 6 cm, no volume de 12 mL sobre um chumaço de 12 cm, e nos volumes de 25, 50 e 100 mL sobre um chumaço de 30 cm, este último no mesmo comprimento do colmo de cana recomendado para uso no campo. Os colmos de cana foram testados nos comprimentos de 10, 15, 20, 25 e 30 cm. Para isso os colmos foram retirados da base de uma planta de cana, cortados nos diferentes comprimentos e divididos longitudinalmente ao meio, sendo apenas uma fatia com a casca usada em cada bioensaio.

Os tratamentos foram colocados nas extremidades do olfatômetro dentro dos tubos, mantendo-se as extremidades abertas. Apenas um inseto era inserido no centro do olfatômetro pela abertura do “Tê”. Após a liberação, uma folha de alumínio foi colocada sobre a abertura para evitar entrada de luz e evitar interferências na resposta. O tempo para avaliação da resposta olfativa do inseto também foi após 25 minutos da sua liberação. Após cada repetição realizada, foi utilizado um novo inseto e os tratamentos eram substituídos por novos. O olfatômetro e o tecido voal eram higienizados com água corrente e a posição do olfatômetro invertida, a fim de não haver tendências de escolha somente para um lado. Os insetos que não se deslocaram após as liberações ou que não alcançaram os 40 cm de distância do ponto de partida após 25 minutos foram excluídos das análises. Os testes foram conduzidos no período diurno matutino e vespertino, sob temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e ausência de luz.



Figura 10. Olfatômetros utilizados nos bioensaios de diferentes volumes de vinhaça e tamanhos variados de colmos.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.5 Estudos de campo

Um primeiro estudo de campo foi realizado como o objetivo avaliar o efeito de combinações envolvendo o colmo de cana (isca tradicional) com a vinhaça em poliacrilamida gel, conhecido como hidrogel (Forth[®]), na atratividade para adultos do *S. levis*. O experimento foi instalado no dia 03/02/2017, em uma área de cana-de-açúcar (variedade

RB86) na Usina Raízen Energia S/A- Unidade Costa Pinto, Piracicaba- SP, após 1 ano do seu terceiro corte, com 3 metros de altura e com histórico de infestação da praga.

Foram avaliados três tratamentos: (i) Colmo; (ii) Colmo + Vinhaça em hidrogel; (iii) Vinhaça em hidrogel (Figura 11). Para cada tratamento foram estabelecidas 10 repetições de 6 metros de linha de cana cada repetição, distribuídas em blocos ao acaso. Os blocos foram enfileirados em 2 linhas de cana, distanciados em 6 metros entre blocos e 6 linhas entre fileiras. Cada repetição foi representada por uma isca conforme os tratamentos descritos a seguir.

O tratamento (i) Colmo foi formado por um colmo de cana fresca (variedade CV0618) com 30 cm de comprimento, cortado longitudinalmente ao meio e colocado ao lado da linha da cana com as duas faces cortadas voltadas para o solo e cobertas com palha. O tratamento (ii) Colmo + Vinhaça em hidrogel foi formado pelo mesmo colmo do tratamento anterior, adicionado ainda da mistura da vinhaça com hidrogel na proporção de 100 mL de vinhaça + 20 g de hidrogel. A mistura em consistência gelatinosa foi distribuída sobre a casca das duas partes do colmo colocadas juntas ao lado da linha. Após a distribuição da mistura, a isca foi coberta com palha. O volume de 100 mL da vinhaça foi escolhido por ser o volume gerado por uma fatia/parte de 30 cm de colmo, considerando-se que o volume de vinhaça gerado por 1 tonelada de cana é de 980 litros. O tratamento (iii) Vinhaça em hidrogel foi constituído somente da mistura da vinhaça mais hidrogel, distribuída sobre o solo ao lado da linha de cana, coberta com palha.

Foram realizadas duas avaliações, a primeira 3 dias após a instalação (06/02/2017) e a segunda 6 dias após (09/02/2017). Em cada avaliação, os adultos do inseto encontrados nas iscas foram coletados, separados por isca e levados ao laboratório para quantificação.



Figura 11. Tratamentos avaliados em campo para captura de *Sphenophorus levis*. (A) Colmo. (B) Colmo + Vinhaça em hidrogel. (C) Vinhaça em hidrogel.

Fonte: Elaborada pela autora.

Um segundo estudo de campo foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de combinações entre o colmo de cana e a vinhaça *in natura* na atratividade para adultos do *S. levis*. Para isso, um experimento foi instalado no dia 22/11/2017 em uma área de cana-de-açúcar (variedade CTC09), no segundo corte, na Usina Abengoa Bioenergia, São João da Boa Vista- SP (Figura 12), com aproximadamente 3 metros de altura e com histórico de infestação da praga.



Figura 12. Croqui da área experimental de cana-de-açúcar onde foram instaladas as iscas (●) para avaliação da atratividade para *Sphenophorus levis* (São João da Boa Vista- SP).

Fonte: Google Earth (imagem aérea).

Foram avaliados quatro tratamentos: (i) Colmo; (ii) Colmo + Vinhaça *in natura*; (iii) Água; (iv) Vinhaça *in natura* (Figura 13). Para cada tratamento foram estabelecidas 12 repetições de 6 metros de linha de cana cada repetição, distribuídas em blocos ao acaso. Os blocos foram enfileirados em 6 linhas de cana, distanciados em 6 metros entre blocos e 6 linhas entre fileiras. Cada repetição foi representada por uma isca conforme os tratamentos descritos a seguir.

O tratamento (i) Colmo foi formado por um colmo de cana fresca (variedade RB867515) com 30 cm de comprimento, cortado longitudinalmente ao meio e colocado ao lado da linha da cana com as duas faces cortadas voltadas para o solo e cobertas com palha. O tratamento (ii) Colmo + Vinhaça *in natura* foi formado pelo colmo descrito no tratamento anterior, sobre um pote plástico de 1000 mL (15 x 9 cm) enterrado com a sua abertura no nível do solo, contendo 100 mL de vinhaça *in natura* e tampado com uma tela de malha (2 x 2 mm). O volume de 100 mL da vinhaça foi escolhido por ser o volume de vinhaça gerado por um colmo de 30 cm, considerando-se que o volume de vinhaça gerado por 1 tonelada de cana é de 980 litros. O colmo foi colocado com as duas faces cortadas sobre o pote tampado colocado ao lado da linha da cana, sendo posteriormente cobertos com palha. O tratamento (iii) Água foi formado pelo pote enterrado ao lado da linha da planta, contendo água no volume de 100 mL e coberto com palha para evitar a secagem do líquido. O tratamento (iv) Vinhaça *in natura* foi formado pelo pote enterrado ao lado da linha da planta, contendo

somente vinhaça *in natura* no volume de 100 mL e coberto com palha para evitar a secagem do líquido.

O experimento foi avaliado após 3 dias da instalação. Para isso, os adultos do inseto encontrados nas iscas foram coletados, separados por isca e levados ao laboratório para quantificação. O mesmo estudo foi repetido em uma área próximo do primeiro experimento, no mesmo talhão de cana com instalação no dia 22/02/2018 e avaliação após 3 dias da instalação. Assim, o 1º e o 2º experimento totalizaram 24 repetições.

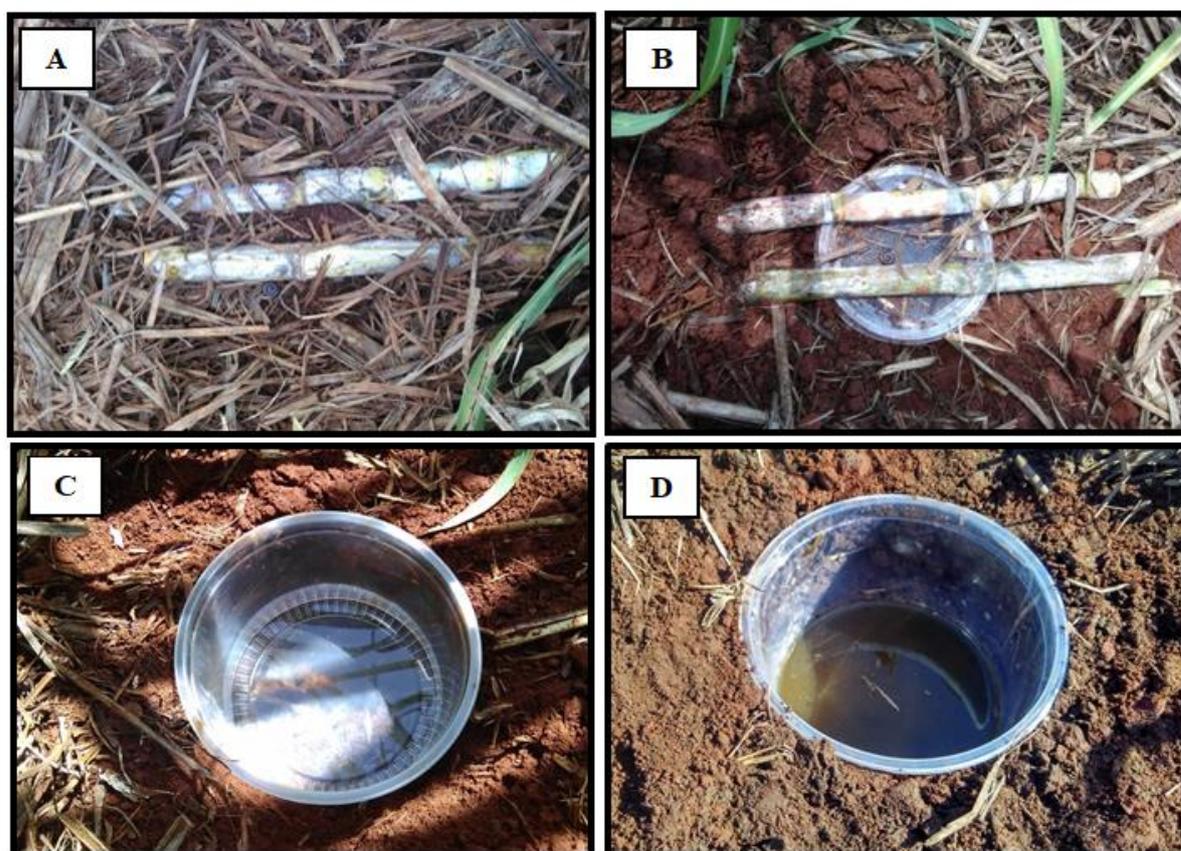


Figura 13. Tratamentos avaliados em campo para captura de *Sphenophorus levis*. (A) Colmo. (B) Colmo + Vinhaça *in natura*. (C) Água. (D) Vinhaça *in natura*.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.6 Análise Cromatográfica de voláteis

A análise cromatográfica de voláteis foi realizada em 2017 no Laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia - Semioquímicos na Agricultura, na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), Piracicaba- SP.

Para a coleta dos voláteis foram usados 2 mL de vinhaça líquida e aplicada sobre um rolete de algodão odontológico dentro de uma cuba de vidro (Figura 14). No momento da coleta, foi realizada aeração por duas horas com um fluxo de ar de 0.6 litros/minuto. Foram usados 30 gramas de polímero adsorvente Super Q[®] e após a aeração o polímero foi eluído com 500 µl do solvente diclorometano. A solução final foi concentrada para 200 µl (Figura 15).

Foi realizada uma análise de quantificação dos compostos da vinhaça em um cromatógrafo gasoso não acoplado a espectrometria de massa (GC-2010 *PLUS*). Posteriormente, a análise de identificação dos compostos da vinhaça foi realizada injetando 1 µl da solução em um cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massas (GC-MS, modelo Varian 4000) contendo uma coluna capilar HP5-MS (J&W Scientific, Folsom, Califórnia, EUA; 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) e hélio como gás de arraste. A temperatura do injetor estava a 240 °C. A temperatura da coluna foi mantida a 60 °C por 1 minuto, aumentada a uma taxa de 15 °C por um 1 minuto até 320 °C e mantida a essa temperatura por 10 minutos. A identificação dos compostos presentes na vinhaça foi feita pela comparação do tempo de retenção e o espectro de massas obtido nos cromatogramas com aqueles disponíveis na biblioteca NIST 98 (Mass Spectral Library) (Figura 16).



Figura 14. Cuba de vidro.

Fonte: Elaborada pela autora.

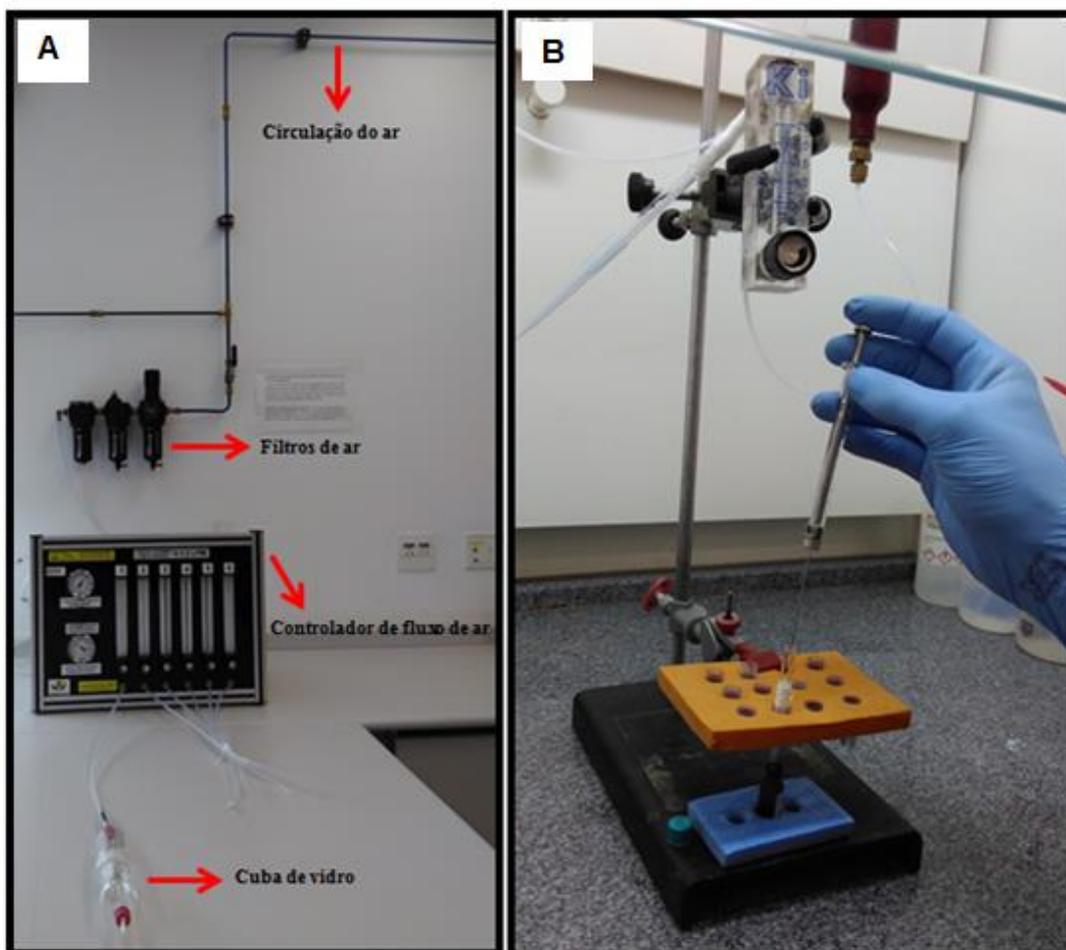


Figura 15. Coleta e eluição dos compostos da vinhaça. (A) Equipamento de Fluxo de ar para coleta dos compostos. (B) Aplicação de solvente para eluição dos compostos no polímero.

Fonte: Elaborada pela autora.



Figura 16. Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massas (GC-MS).

Fonte: Elaborada pela autora.

4.7 Resposta olfativa aos componentes químicos da vinhaça em laboratório

Este estudo teve por objetivo avaliar em laboratório a resposta olfativa de adultos de *S. levis* à mistura dos compostos químicos voláteis da vinhaça identificados anteriormente: ácido propanoico, ácido butanoico, 1-pentanol, D-limonene, ácido hexanoico, ácido pentanoico, acetato de isobutila e cyclohexanemethanol. A mistura foi testada em três concentrações e comparada com óleo mineral em testes comparativos em dupla: (i) Mix 1000 ppm vs óleo mineral; (ii) Mix 100 ppm vs óleo mineral; (iii) Mix 10 ppm vs óleo mineral; (iv) Óleo mineral vs óleo mineral (determinado como controle).

Os padrões sintéticos foram testados nas diluições de 1000 ppm (1 μ L do produto para 1 mL de solvente), chamada de solução estoque, 100 ppm (100 μ L de solução estoque para 900 μ L de solvente) e 10 ppm (10 μ L da solução estoque para 990 μ L de solvente). As diluições foram realizadas com auxílio de uma pipeta no volume de 2 a 20 μ L, e pipeta no volume de 1 a 10 mL, utilizando uma capela de exaustão. O solvente utilizado foi óleo mineral.

Para a preparação do tratamento “Mix 1000 ppm” foi realizado uma diluição de todos os componentes químicos com óleo mineral, sendo 20 μ L de cada componente diluído com um volume 159,8 mL de solvente (óleo mineral). Dessa forma foi obtido um volume final de 160 mL de solução Mix 1000 ppm, volume suficiente para a realização dos bioensaios. A primeira diluição de 1000 ppm foi considerada como “solução estoque” para obtenção das demais diluições.

Para a preparação do tratamento “Mix 100 ppm”, foi adicionado 16 mL de solução estoque no volume de 144 mL de solvente (óleo mineral). Dessa forma, foi obtido um volume final de 160 mL de solução Mix 100 ppm.

Para a preparação do tratamento “Mix 10 ppm” foi adicionado 1,6 mL de solução estoque no volume de 158,4 mL de solvente (óleo mineral). Dessa forma, foi obtido um volume final de 160 mL de solução Mix 10 ppm.

As respostas olfativas foram avaliadas separadamente para insetos adultos machos e fêmeas, estabelecendo-se 20 repetições com insetos machos adultos e 20 repetições com insetos fêmeas adultas, a fim de investigar se há diferença na resposta entre os sexos. Para isso, foram utilizados olfatômetros de duas vias (95 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro). Para cada repetição, 2 mL de cada solução foi aplicada em um chumaço de algodão odontológico.

Os tratamentos foram colocados nas extremidades do olfatômetro, pelas aberturas do “Cotovelo” que se mantiveram abertos. Os insetos eram liberados individualmente nos olfatômetros, com auxílio de uma pinça. Cada inseto foi inserido no centro do olfatômetro pela abertura do “Tê”. Após a liberação, uma folha de alumínio foi colocada sobre a abertura para evitar entrada de luz e evitar interferências na resposta.

Após cada repetição realizada, foi utilizado um novo inseto e os tratamentos eram substituídos por novos. O olfatômetro e o tecido voal eram higienizados com água corrente e a posição do olfatômetro invertida, a fim de não haver tendências de escolha somente para um lado. Os insetos que não se deslocaram após as liberações ou que não alcançaram os 40 cm de distância do ponto de partida após 25 minutos foram excluídos do bioensaio. Os testes foram conduzidos no período diurno matutino e vespertino, sob temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e ausência de luz.

4.8 Análise estatística

Os dados dos bioensaios no olfatômetro realizados em laboratório foram avaliados por um teste binominal no Software R versão 3.0.2 (The R Foundation for Statistical Computing, 2013).

Os dados dos experimentos de campo foram submetidos à análise de variância (ANOVA), nas quais as médias foram transformadas em $\text{Log } x+1$, e comparadas pelo teste de Tukey a 5% de nível de significância. Os dados foram processados no Software SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 15.0.

5. RESULTADOS

5.1 Resposta olfativa a vinhaça, colmo, melão e água residuária

Nas comparações da vinhaça com colmo, melão, água residuária e água, os adultos de *S. levis* foram significativamente mais atraídos para a vinhaça. Comparando vinhaça com colmo, nota-se que 90% dos machos e 75% das fêmeas foram para a vinhaça, tendo apenas 10% dos machos e 25% das fêmeas ido para o colmo. A vinhaça também foi mais atrativa quando comparada com melão e água residuária, atraindo 90% e 85% para ambos os sexos, respectivamente (Figura 17 e 18).

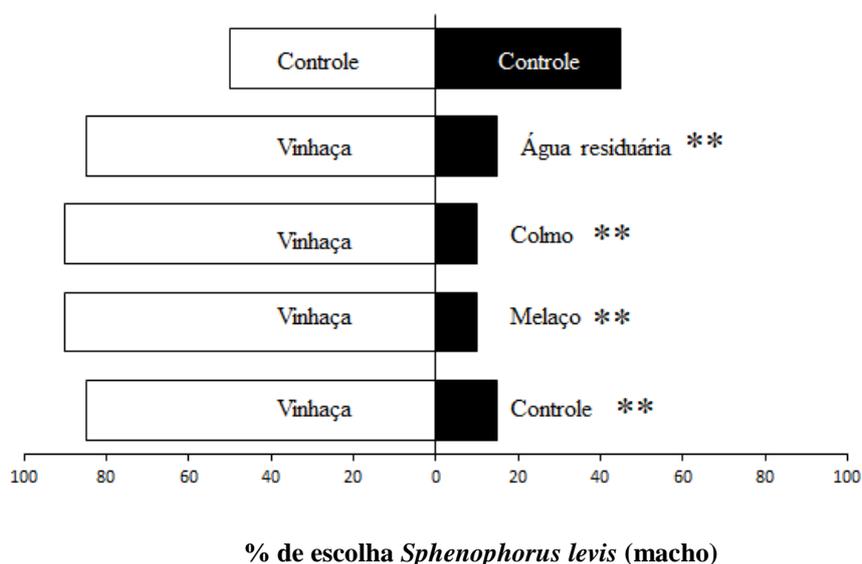


Figura 17. Resposta olfativa de machos adultos de *Sphenophorus levis* em olfatômetro a odores produzidos de Vinhaça vs Água (Controle); Vinhaça vs Melão; Vinhaça vs Colmo; Vinhaça vs Água residuária; Água (Controle) vs Água (Controle). As barras representam a resposta inicial dos insetos (quando o inseto alcançou em 25 minutos um dos braços do olfatômetro). Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos de acordo com o teste binomial (* $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$) $N = 20$.

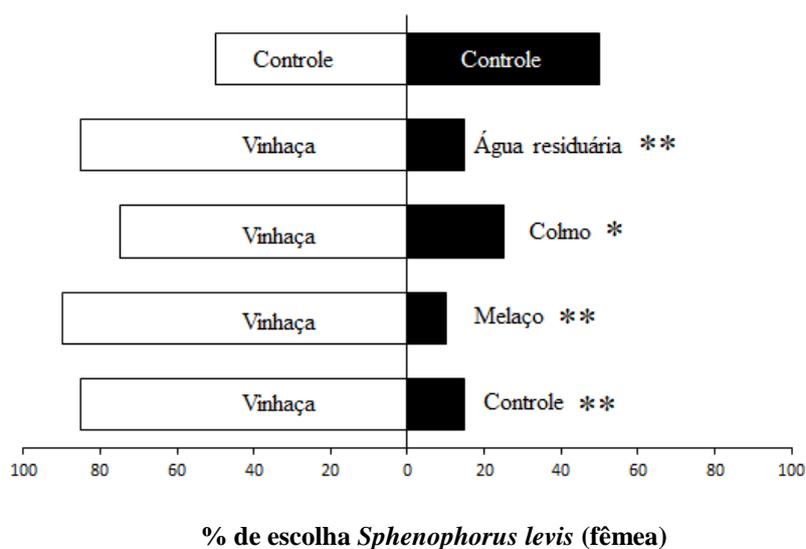


Figura 18. Resposta olfativa de fêmeas adultas de *Sphenophorus levis* em olfatômetro a odores produzidos de Vinhaça vs Água (Controle); Vinhaça vs Melão; Vinhaça vs Colmo; Vinhaça vs Água residual; Água (Controle) vs Água (Controle). As barras representam a resposta inicial dos insetos (quando o inseto alcançou em 25 minutos um dos braços do olfatômetro). Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos de acordo com o teste binomial (* $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$) $N = 20$.

5.2 Resposta olfativa a vinhaça em diferentes volumes e diferentes comprimentos de colmos

Comparando diferentes volumes de vinhaça com colmo em diferentes comprimentos, observou-se atração significativamente maior dos adultos machos somente para a vinhaça no volume de 100 mL e para o colmo no comprimento de 30 cm quando comparados com a água (testemunha), e para a vinhaça no volume de 2 mL comparada com o colmo no comprimento de 10 cm e 15 cm (Figura 19). Para os adultos fêmeas do inseto, foram significativamente mais atraídos para a vinhaça no volume de 2 mL comparada com colmo no comprimento de 15 cm e 20 cm, respostas semelhantes àsquelas observadas para os insetos machos (Figura 20).

Comparando a vinhaça no volume de 2 mL com o colmo em diferentes comprimentos, ocorreu um aumento gradativo na atração do inseto para o colmo conforme aumentou o seu comprimento, tendo colmos com 25 e 30 cm igualados à vinhaça no volume de 2 ml quanto a atratividade para o inseto.

Comparando a vinhaça nos volumes de 6, 12, 25, 50 e 100 mL com o colmo no comprimento de 30 cm, nota-se ainda uma atratividade semelhante entre os tratamentos, sem diferirem significativamente entre si, não ocorrendo um aumento na atratividade para a vinhaça como se esperava. Isso pode estar relacionado a uma saturação no volátil liberado

pela vinhaça (principalmente nos volumes maiores) distanciada de 40 cm do ponto de liberação do inseto, confundindo o inseto para qual tratamento escolher (Figura 19 e 20).

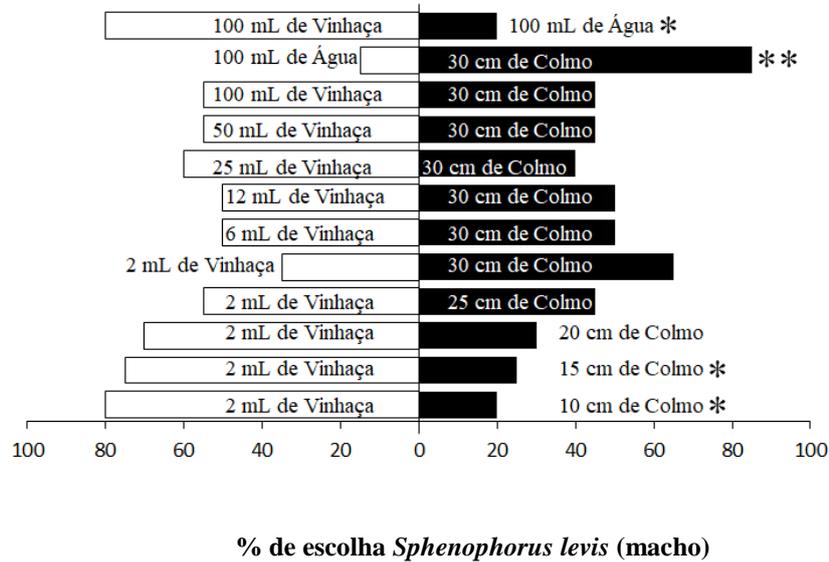


Figura 19. Resposta olfativa de machos adultos de *Sphenophorus levis* em olfatômetro a odores produzidos de 100 mL de Vinhaça vs 100 mL de Água (Controle); 100 mL de Água (Controle) vs 30 cm de colmo; diferentes volumes de vinhaça comparados com 30 cm de colmo; e 2 mL de Vinhaça comparados com diferentes comprimentos de colmo. As barras representam a resposta inicial dos insetos (quando o inseto alcançou em 25 minutos um dos braços do olfatômetro). Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos de acordo com o teste binomial (* $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$) N = 20

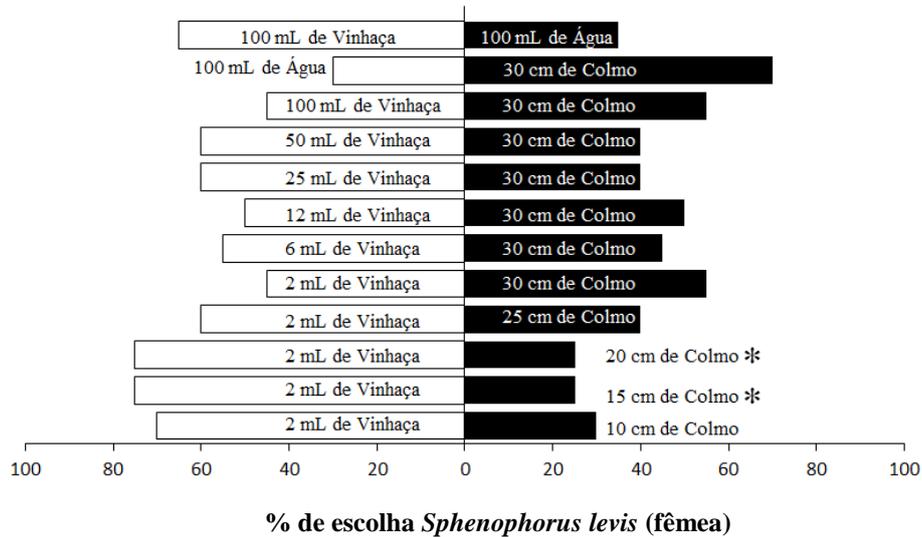


Figura 20. Resposta olfativa de fêmeas adultas de *Sphenophorus levis* em olfatômetro a odores produzidos de 100 mL de Vinhaça vs 100 mL de Água (Controle); 100 mL de Água (Controle) vs 30 cm de colmo; diferentes volumes de vinhaça comparados com 30 cm de colmo; e 2 mL de Vinhaça comparados com diferentes comprimentos de colmo. As barras representam a resposta inicial dos insetos (quando o inseto alcançou em 25 minutos um dos braços do olfatômetro). Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos de acordo com o teste binomial (* $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$) N = 20.

5.2 Estudos de campo

No estudo de campo com a vinhaça formulada em poliacrilamida gel (hidrogel), o tratamento “Colmo + Vinhaça em hidrogel” apresentou uma atração para adultos do bicudo (5,25 insetos/isca) ligeiramente superior comparado ao tratamento “Colmo” testado isoladamente (4,45 insetos/isca), não havendo diferença significativa entre ambos ($F=46,117$; $P=0,901$). O tratamento “Vinhaça em hidrogel” não se apresentou atrativo para adultos do inseto nas condições do ensaio, com nenhum inseto atraído, diferenciando significativamente dos demais tratamentos ($F=46,117$; $P\leq 0,001$) (Figura 21).

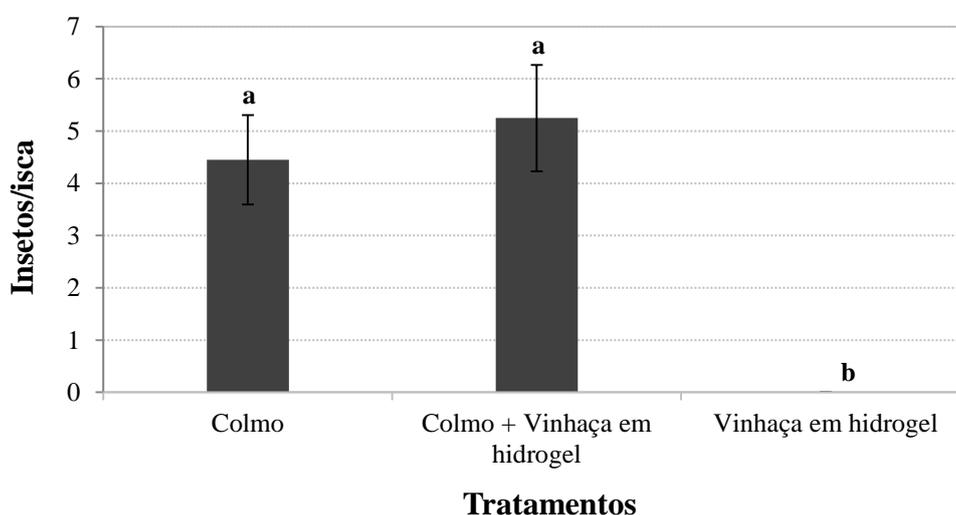


Figura 21. Número de adultos de *Sphenophorus levis* atraídos para os seguintes tratamentos em campo: (i) Colmo; (ii) Colmo + Vinhaça em hidrogel; (iii) Vinhaça em hidrogel. As barras representam a média de insetos capturados por iscas (tratamentos). Médias com mesma letra minúscula nas barras não diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey.

No estudo de campo com vinhaça *in natura*, novamente o tratamento “Colmo + Vinhaça *in natura*” apresentou uma atração para adultos do bicudo ligeiramente superior (7,4 insetos/isca), mas não diferiu significativamente do “Colmo” (6,3 insetos/isca), tendo ambos diferenciados do tratamento “Vinhaça *in natura*” ($F=104,251$; $P\leq 0,001$). Diferentemente do primeiro estudo de campo, o tratamento “Vinhaça *in natura*” apresentou atratividade para os adultos do inseto (0,9 insetos/isca), diferenciando significativamente do tratamento “Água” (Controle) que não se apresentou como atrativo ($F=104,251$; $P\leq 0,001$) (Figura 22).

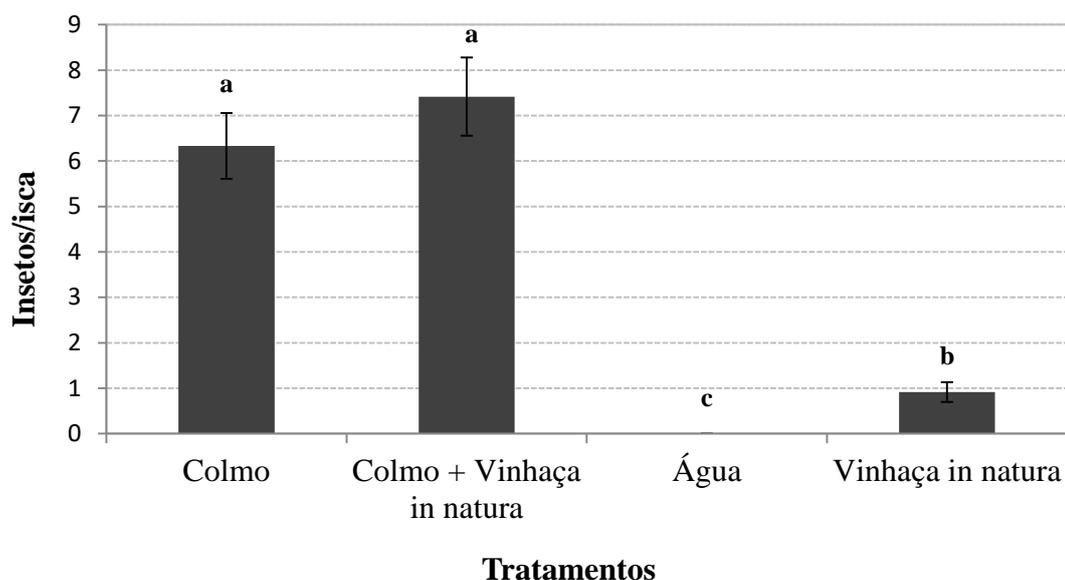


Figura 22. Número de adultos de *Sphenophorus levis* atraídos para os seguintes tratamentos em campo: (i) Colmo; (ii) Colmo + Vinhaça *in natura*; (iii) Água; (iv) Vinhaça *in natura*. As barras representam a média de insetos capturados por iscas (tratamentos). Médias com mesma letra minúscula nas barras não diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey.

5.3 Análise Cromatográfica de voláteis

De acordo com a cromatografia acoplada à espectrometria de massas, a vinhaça é formada por ácidos orgânicos carboxílicos, álcoois primários e terpeno (Figura 23).

No presente estudo, os ácidos orgânicos carboxílicos detectados foram ácido propanoico (propanoic acid), ácido butanoico (butyric acid), ácido pentanoico (valeric acid) e ácido hexanoico (caproic acid). Os álcoois primários detectados foram acetato de isobutila (isobutyl acetate), 1- pentanol e cyclohexanemethanol. D-limonene pertencente à família dos terpenos (Figura 23).

O semioquímico detectado com maior intensidade foi ácido propanoico (propanoic acid) com 15.000 e 17.500 μv . Os semioquímicos 1- pentanol, acetado de isobutila (isobutyl acetate), ácido butanoico (butyric acid) e ácido pentanoico (valeric acid) apresentaram picos entre 3.500 a 8.000 μv , enquanto que os demais compostos, ácido hexanoico (caproic acid), cyclohexanemethanol e D-limonene apresentaram menores picos.

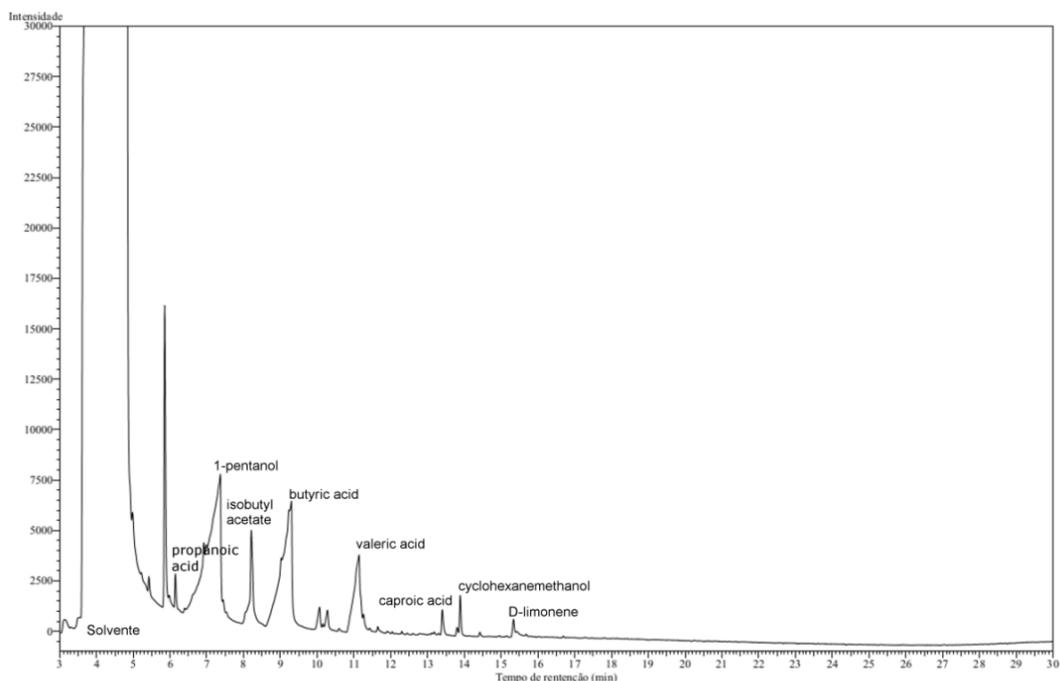
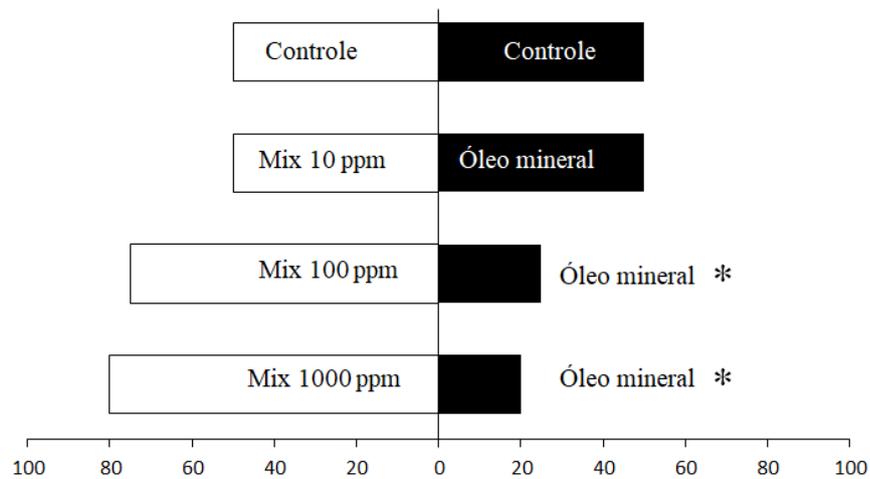


Figura 23. Compostos voláteis da vinhaça detectados pela análise cromatográfica (GC-MS). Os picos indicam a intensidade em microvolts de cada composto identificado.

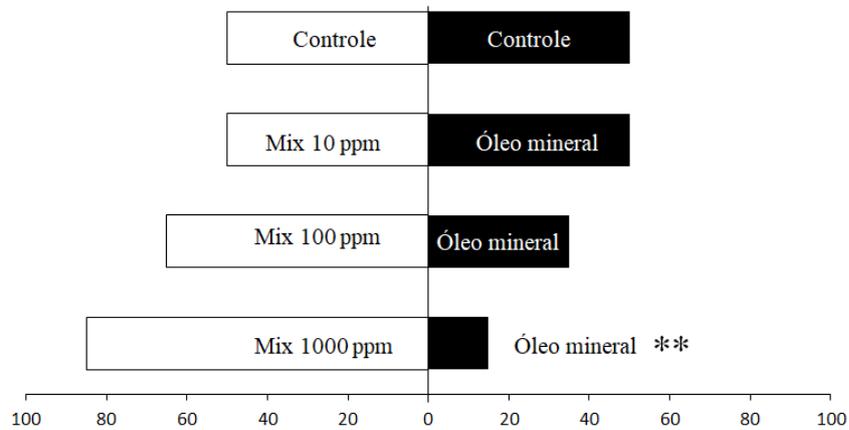
5.4. Resposta olfativa aos componentes químicos da vinhaça em laboratório

Nos bioensaios com a finalidade de avaliar a resposta olfativa de adultos de *S. levis* aos compostos voláteis da vinhaça identificados neste trabalho, ambos os insetos adultos machos e fêmeas foram mais atraídos para as misturas de compostos em comparação ao óleo mineral, havendo aumento na atração em função do aumento na concentração dos compostos (Figura 24 e 25). Para adultos machos, as misturas atraíram significativamente os insetos quando testados nas concentrações de 1000 e 100 ppm, atraindo 80% e 75% dos insetos liberados (Figura 24). Para as fêmeas, a mistura atraiu significativamente os insetos apenas a maior concentração, de 1000 ppm, atraindo 85% dos insetos (Figura 25).



% de escolha *Sphenophorus levis* (macho)

Figura 24. Resposta olfativa de machos adultos de *Sphenophorus levis* em olfatômetro a odores produzidos de Mix 1000 ppm vs Óleo mineral; Mix 100 ppm vs Óleo mineral; Mix 10 ppm vs Óleo mineral; Óleo mineral (Controle) vs Óleo mineral (Controle). As barras representam a resposta inicial dos insetos (quando o inseto alcançou em 25 minutos um dos braços do olfatômetro). Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos de acordo com o teste binomial (* $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$) $N = 20$. Mix = mistura de todos os compostos identificados na vinhaça.



% de escolha *Sphenophorus levis* (fêmea)

Figura 25. Resposta olfativa de fêmeas adultas de *Sphenophorus levis* em olfatômetro a odores produzidos de Mix 1000 ppm vs Óleo mineral; Mix 100 ppm vs Óleo mineral; Mix 10 ppm vs Óleo mineral; Óleo mineral (Controle) vs Óleo mineral (Controle). As barras representam a resposta inicial dos insetos (quando o inseto alcançou em 25 minutos um dos braços do olfatômetro). Asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos de acordo com o teste binomial (* $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$) $N = 20$. Mix = mistura de todos os compostos identificados na vinhaça.

6. DISCUSSÃO

O olfatômetro de duas vias confirmou ser um equipamento eficiente para avaliar a resposta de *S. levis* à estímulos olfativos. O inseto se deslocou com facilidade no interior dos tubos, ao longo dos 40 cm a partir do ponto de partida, durante os 25 minutos. Além disso, o inseto não apresentou tendência de escolha para um determinado lado do olfatômetro, já que a resposta foi semelhante para ambas as vias contendo água (controle).

A vinhaça apresentou-se atrativa para adultos de *S. levis*, o que pode explicar as maiores infestações do inseto em áreas de cana tratadas com vinhaça como vem sendo observado e suspeitado. Em estudo realizado por Jelvez Serra *et al.* (2017), a vinhaça apresentou-se atrativa também para *Stomoxys calcitrans* (moscas-dos-estábulo) sugerindo ser um subproduto atrativo para vários insetos, principalmente para pragas relacionadas à cana-de-açúcar.

A resposta olfativa de insetos a substratos vegetais (hospedeiros) é de caráter específico, podendo haver semelhança na atratividade das espécies dependendo da presença de odores, grau de fermentação e hábitos alimentares. Tecidos vegetais em estado de fermentação possuem maior concentração de voláteis do que tecidos conservados, existindo uma correlação positiva entre o grau de fermentação, concentração de odores marcantes e a atratividade para o inseto (ROCHAT *et al.*, 2000; TINZAARA *et al.*, 2002; EL-SAYED *et al.*, 2005; GIRÓN-PÉREZ *et al.*, 2009). Segundo Giblin-Davis; Peña e Dukan (1994), em experimento de campo, adultos de *M. hemipterus* apresentaram maior preferência para substratos de abacaxi e cana-de-açúcar em estado de fermentação, comparados aos mesmos substratos conservados. No presente estudo a maior atratividade dos adultos de *S. levis* para a vinhaça pode ser devido ao maior grau de fermentação e conseqüentemente a maior concentração de odores na vinhaça.

A vinhaça apresentou-se mais atrativa para o bicudo da cana comparada com a água residuária, o que já era esperado, pois a água residuária é a água que foi usada na lavagem da cana antes da sua moagem, apresentando menor fermentação que a vinhaça. Da mesma forma, a vinhaça apresentou-se mais atrativa que o melaço, subproduto na produção de açúcar e que vem sendo recomendado para uso em mistura com o colmo da cana visando aumentar a atratividade do inseto para a isca no campo. Em estudos sob condições de laboratório conduzidos por Girón-Pérez *et al.* (2009), o melaço a 10% combinado com colmo de cana fermentado por 24 e 48 horas atraiu 90% e 85% dos adultos de *S. levis*,

respectivamente, enquanto que os tratamentos colmo de cana combinado com água fermentado por 24, 48 e 72 horas atraíram menos que 50% dos insetos.

De modo geral, os insetos adultos machos e fêmeas apresentaram as mesmas tendências nas respostas para os diferentes substratos e compostos em todos os bioensaios conduzidos em laboratório, sugerindo poucas diferenças entre os sexos quanto à atração para os compostos. Nos testes com vinhaça no volume de 100 mL e colmos no comprimento de 30 cm, comparados com água, ambos os sexos foram mais atraídos para a vinhaça e para o colmo, porém com diferenças significativas apenas nos testes com machos. Da mesma forma, nos testes com a mistura dos componentes químicos comparados com o óleo mineral, ambos os sexos foram significativamente mais atraídos para as concentrações de 1000 ppm, sendo que para a concentração de 100 ppm, apenas os machos foram significativamente mais atraídos. Isso sugere maior preferência dos machos para o colmo e a mistura dos componentes químicos, porém novos estudos devem ser realizados visando essa confirmação. Girón-Pérez *et al.* (2009) não observaram diferença para ambos os sexos de *S. levis* quando avaliaram atração dos adultos para toletes de cana-de-açúcar com ou sem melação e casca de abacaxi em diferentes períodos de fermentação. Jaffé *et al.* (1993) também não encontraram diferenças nas respostas entre machos e fêmeas adultas de *R. palmarum* quando atraídos para abacaxi, banana e palma de coco.

O colmo da cana apresentou-se menos atrativo que a vinhaça somente em comprimentos abaixo de 25 cm para fêmeas e 20 cm para machos, reforçando a recomendação para uso de colmos com 30 cm de comprimento visando a coleta, monitoramento ou controle do inseto no campo (ALMEIDA, 2005; ALMEIDA; STINGEL; ARRIGONI, 2008). No comprimento de 30 cm, o colmo apresentou-se mais atrativo para adultos do bicudo que a água, com diferença significativa apenas para insetos machos.

Nos estudos de campo, o colmo da cana apresentou-se como o mais eficiente para atração dos insetos comparado a vinhaça, provavelmente devido a volatilidade mais lenta do colmo, permanecendo atrativo por mais tempo no campo. A vinhaça em hidrogel testada isoladamente não se apresentou atrativa para os insetos, mas a vinhaça *in natura* testada isoladamente apresentou-se, confirmando os testes em laboratório. Para a vinhaça em hidrogel, os insetos podem ter sido atraídos, mas se dispersaram em seguida pela falta de um suporte físico para se agarrarem ou pela volatilização rápida da vinhaça, já que tem a presença de compostos alcoois em sua composição, conforme detectados no presente estudo. O colmo da cana-de-açúcar vem sendo recomendado para monitoramento do bicudo-da-cana e de *M. hemipterus* em cana-de-açúcar, demonstrando eficiência para atratividade e também captura

de insetos, já que o inseto permanece agarrado ao colmo (GIRON-PEREZ *et al.*, 2009; ALMEIDA, 2005; GIBLIN-DAVIS; PEÑA; DUNCAN, 2002). Vem sendo recomendado também para o monitoramento e controle de *Rhynchophorus palmarum* em palmeiras, associado ao feromônio (TIGLIA *et al.*, 1998).

El-Sayed *et al.* (2005) testaram em campo 4 tipos de iscas envolvendo colmo de cana-de-açúcar fermentados, constituídas por colmo de cana, colmo + xarope de cana, colmo + vinho do porto e colmo + melaço. Todas atrativas para espécies de lepidópteros *Graphania mutans* e *Tmetolophota* spp. O colmo de cana e colmo + xarope de cana se apresentaram mais atrativos quando comparados com colmo + melaço e colmo + vinho do porto. Com base no estudo realizado por El-Sayed *et al.* (2005) e no presente estudo, o uso do colmo associado com um subproduto não aumenta a sua eficiência comparado com o colmo isoladamente.

No presente estudo, detectou-se na vinhaça a presença de ácidos orgânicos carboxílicos, álcoois primários e terpeno. Na análise GC-MS realizada por Jelvez Serra *et al.* (2017), além dos ácidos orgânicos carboxílicos e álcoois primários, foram também detectados os fenóis, cetonas e aldeídos como parte da vinhaça. Lima *et al.* (2017) identificaram os ácidos graxos, álcoois e ésteres como os compostos voláteis presentes na vinhaça.

O alto teor de ácidos orgânicos de cadeia curta confere a vinhaça o odor característico que pode ser percebido a distância. Entre esses ácidos voláteis, estão incluídos o ácido propanoico, ácido butanoico, ácido hexanoico e ácido pentanoico, os quais foram detectados na vinhaça no presente estudo. Os três últimos compostos foram detectados também por Jelvez Serra *et al.* (2017) na vinhaça, enquanto que os 4 foram detectado por Jeanbourquin e Gerin (2007) em estrumes de cavalo e vaca. Nesses estudos, esses substratos foram atrativos para *Stomoxys calcitrans* (moscas-dos-estábulos) e os seus compostos detectados comprovaram atratividade para o inseto em estudos de resposta fisiológica pela antena. Dessa forma, é possível que esses mesmos compostos detectados no presente estudo sejam atrativos também para *S. levis*, sugerindo novos estudos para essa confirmação.

Em geral, a composição da vinhaça consiste de 93% de água e 7% de compostos orgânicos e inorgânicos (ROLIM *et al.*, 2013). A variedade dos compostos químicos presentes na vinhaça dependerá dos processos de destilação a qual foi submetida. No entanto, os diferentes voláteis detectados por Jelvez Serra *et al.* (2017) em duas amostras de vinhaça de origem distintas atraíram *S. calcitrans*, sugerindo que a vinhaça é composta por uma variedade de estimulantes químicos que podem funcionar como atrativos independentes de seus processos de destilação.

A mistura dos compostos identificados na vinhaça atraiu insetos machos para as concentrações de 100 e 1000 ppm, e insetos fêmeas para a concentração de 1000 ppm. Jaffé *et al.* (1993) avaliaram a atração de *R. palmarum* à misturas dos compostos identificados nos tecidos naturais de coco. Concluíram que o mix de acetato de etila, acetado de isopentilo, pentano, isopentanol, e etanol em proporções semelhantes, eram tão atraentes quanto o tecido natural de coco.

No presente estudo, o composto volátil de maior intensidade na vinhaça foi o ácido propanoico. Embora, não tenham sido realizados bioensaios com este volátil separadamente, se faz necessário estudos para testar este composto e os demais identificados na vinhaça. Diversos trabalhos de análise cromatográfica acoplada à espectrometria de massas têm sido realizados com diversos substratos e subprodutos. Lima *et al.* (2017) identificaram na vinhaça o composto volátil álcool fenetílico (Phenylethanol) em maior intensidade, pertencente ao grupo dos álcoois primários. Este mesmo composto também foi encontrado em maior intensidade em polpa de cebola envelhecida e avaliado separadamente como forte atrativo em laboratório e campo para *Hylemya antiqua* e *H. platura* (moscas-da-cebola) (ISHIKAWA; IKESHOJI; MATSUMOTO, 1983). El-Sayed *et al.* (2005) também identificaram como parte dos compostos o álcool fenetílico presente em 4 tipos de iscas de cana-de-açúcar, combinadas com vinho do porto, melão e xarope de açúcar.

O presente estudo é o primeiro a confirmar a atratividade da vinhaça ao *S. levis* em condições de laboratório e campo. Isso destaca esse resíduo industrial como um dos responsáveis pelas maiores infestações do inseto nas áreas de cana-de-açúcar tratadas com vinhaça conforme têm sido observados por Precetti e Arrigoni (1990). Pode-se sugerir novos estudos em laboratório e campo visando avaliar combinações entre feromônio, isca tradicional de cana-de-açúcar e compostos voláteis na busca de novas tecnologias para monitoramento, captura e controle de *S. levis*. Para isso, os compostos voláteis deverão ser avaliados individualmente procurando selecionar aquele ou aqueles mais eficientes para atração do inseto. Outros compostos como proteína hidrolisada podem ser também avaliados quanto a atratividade para *S. levis*. Pavarini *et al.* (2018) observaram maior atração de adultos de *C. sordidus* e *Metamasius* sp. para iscas de pseudocaule de bananeira quando a isca foi associada a proteína hidrolisada da marca comercial Bio Fruit.

7. CONCLUSÃO

De acordo com o estudo realizado, pode-se concluir que:

- A vinhaça *in natura* é atrativa para adultos de *S. levis* em condições de laboratório e campo;
- As respostas olfativas dos insetos adultos machos e fêmeas apresentaram as mesmas tendências para os diferentes atrativos testados;
- A vinhaça em mistura com hidrogel não é atrativa para adultos de *S. levis* em condições de campo;
- O colmo foi mais atrativo que a vinhaça em condições de campo, e a combinação do colmo com a vinhaça não aumenta a sua atratividade para o inseto;
- Os compostos voláteis detectados na vinhaça são ácidos orgânicos carboxílicos, álcoois primários e terpeno, sendo o ácido propanoico o composto volátil de maior intensidade detectado;
- A mistura dos componentes químicos na concentração de 1000 ppm foi atrativa para machos e fêmeas, sendo que na concentração de 100 ppm foi atrativa somente para machos.

8. REFERÊNCIAS

- ABREU, I. L. **Identificação e caracterização de um gene *cry* recombinante de *Bacillus thuringiensis* var. *Londrina***, 2006. 87 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2006.
- AGROFIT. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 03 jul. 2017.
- ALEXANDER, A. G. **Sugarcane physiology**. Amsterdam: Elsevier Publishing, 1973. 752 p.
- ALMEIDA, J. R. O problema da vinhaça em São Paulo. **Boletim do Instituto Zimotécnico**, Piracicaba, n.3: p. 1-24, 1952.
- ALMEIDA, L. C. **Bicudo da cana-de-açúcar: boletim técnico C.T.C.** Piracicaba: Centro de Tecnologia Canavieira, 2005. 3 p.
- ALMEIDA, L. C.; STINGEL, E.; ARRIGONI, E. B. **Monitoramento e controle de pragas da cana-de-açúcar**. Piracicaba-SP.: Centro de Tecnologia Canavieira, 2008. 35p.
- BADILLA, F.; ALVES, S. Controle do gorgulho da cana-de-açúcar *Sphenophorus levis* (Vaurie, 1978) (Coleoptera: Curculionidae) com *Beauveria* spp em condições de laboratório e campo. **Anais de Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 20, n. 2, p. 250-263, 1991.
- BARRETO-TRIANA, N.; NARDI, C.; FANZELLI-TOMAZELLA, M. I.; MATSUBARA, L.Y.; ALMEIDA, L.C.; PIACETINI, S.A.; BENTO, J. M. S. Aspectos reprodutivos de *Sphenophorus levis* Vaurie (Coleoptera: Curculionidae) em cana-de-açúcar. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE PRAGAS DE SOLO PRAGAS-SOLO-SUL, 10., 2007, Londrina. **Anais...** Londrina, EMBRAPA, P. 110-113, 2007.
- BOLONHEZI, D.; PEREIRA, J. C. V. N. A. Plantio direto na Alta Mogiana. **O Agrônomo**, Campinas, v. 51, p. 12-15, 1999.
- BOTELHO, P. S. M.; MACEDO, N. *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. (Eds.). **Controle Biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, p. 409-425, 2002.
- BUTT, T.M.; WALDEN, S. Fungal biological control agents. **Pesticide Outlook**, v.11, p.186-191, 2000.
- CANASSA, F. **Distribuição espacial, efeito do manejo da palha pós-colheita e da aplicação de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Hupocreales: Cordycipitaceae) na ocorrência de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) em cana-de-açúcar**. 2014. 98 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2014.

CARLSON, D. A., SCHRECK, C. E. & BRENNER, R. J. Carbon-dioxide released from human skin – effect of temperature and insect repellents. **Journal of Medical Entomology**, v. 29, n. 2, p. 165-170, 1992.

CESAR, M. A. A.; DELGADO, A. A. GABAN, L.C. Aumento do nível de amido e de potássio no caldo de cana, decorrente da aplicação sistemática de vinhaça ao solo. **Brasil Açucareiro**, v.92, n.1, p.24-29, 1978.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. V. 5 - Safra 2018/19, n. 1 - Primeiro levantamento, Brasília, mai. de 2018, 66 p.

COSTA, V. M. Irrigação em cana-de-açúcar: uma realidade ainda oculta no Brasil. **Stab – Açúcar, Álcool e Subprodutos**. V. 30, n. 3, p. 15-17, novembro/dezembro 2011.

CSIKI, E. Curculionidae: Rhynchophorinae, Cossoninae. In: **Coleopterorum catalogus auspiciis et**. Auxílio W. Junk editus a S. Schenkling. W. Junk, s-Gravenhage, pt. 149, p. 1-212, 1936.

DEGASPARI, N.; BOTELHO, P. S.; ALMEIDA, L. C.; CASTILHO, H. J. Biologia de *Sphenophorus levis* (Vaurie, 1978) (Coleoptera: Curculionidae) em dieta artificial e no campo. **Pesquisa Agropecuária do Brasil**, Brasília, v. 22, n. 6, p. 556-558, 1987.

DINARDO-MIRANDA, L. L. Cana. Caderno técnico cultivar. **Revista Cultivar Grandes Culturas**. Pelotas, n.80, 2005.10p..

DINARDO-MIRANDA, L. L.; FRACASSO, J. V.; CABRAL, S. B.; VALÉRIO, W.; GONÇALVES, R. D.; BELTRAME, J. A. Eficiência de inseticidas aplicados em soqueiras de cana-de-açúcar no controle de *Sphenophorus levis*. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 24, n. 5, p. 34-37 maio/ jun. 2006.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; FRACASSO, J. V. Effect of insecticides applied at sugarcane planting on *Sphenophorus levis* Vaurie (Coleoptera: Cuculionidae) control and on the yield of first two harvests. **Proceedings Internacional Society of Sugar Cane Technology**, Boston, v. 27, p. 1-5, 2010.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; FRACASSO, J. V. Sugarcane straw and the populations of pests and nematodes. **Scientia Agricola**, v.70, n.5, p.x-x, September/October 2013.

DINARDO-MIRANDA, L. L. **Nematoides e pragas de cana-de-açúcar**. Campinas. Instituto Agrônômico, 2014.

DINARDO-MIRANDA, L. L. Ocorrência de *Sphenophorus levis* em 2000. **Stab – Açúcar, Álcool e Subprodutos**. V. 19, n. 1, p. 26, 2000.

DINARDO-MIRANDA, L. L. Pragas. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, p. 349–404, 2008.

DOLINSKI, C. Tecnologia de produção e formulação de nematoides entomopatogênicos. In: OLIVEIRA FILHOS, E. C.; MONNERAT, R. G.; **Fundamentos para regulação de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas**, 1 ed., p. 197-218, 2006.

ELIAS NETO, A. **Biodigestão da vinhaça com reator anaeróbio de manta de lodo**. São Carlos, EESC/USP, 1988. 30p.

EL-SAYED, A. M.; HEPPELTHWAITE, V. J.; MANNING, L. M.; GIBB, A. R.; SUCKLING, D. M. Volatile Constituents of fermented sugar baits and their attractions to lepidopteran species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 953 - 958, 2005.

FANCELLI, M; MILANEZ, J. M.; MESQUITA, A. L. M.; COSTA, A. C. F.; COSTA, J. N. M.; PAVARINI, R.; PAVARINI, G. M. P. Artrópodes: pragas da bananeira e controle. **Informe Agropecuário (Belo Horizonte)**, v. 36, n. 288, p. 7-18, 2015.

FAO- Food and Agriculture Organization of the United Nations 2015. **Banco de dados: FAOSTAT**. Disponível em: < <http://www.fao.org/corp/statistics/en/> >. Acesso em: 31 mai de 2017.

FIGUEIREDO, P. Breve história da cana-de-açúcar e o papel do instituto agrônomo no seu estabelecimento no Brasil. In: DINARDO-MIRANDA, L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDEL, M. G. A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônomo, p. 31-44, 2008.

FILGUEIRAS, C. C.; WILLETT, D. S.; PEREIRA, R. V.; MOINO JR, A.; PAREJA. M.; DUNCAN, L. W. Eliciting maize defense pathways aboveground attracts belowground biocontrol agents. **Scientific Reports**. v. 6, p. 36484, 2016.

GARCIA, J. F. Manejo Integrado de *Sphenophorus levis* em cana-de-açúcar. Ribeirão Preto, 24 jul. 2013. In: SEMINÁRIO NACIONAL SOBRE CONTROLE DE PRAGAS DA CANA-DE-AÇÚCAR – INSECTSHOW, 9., 2013. **Palestra ministrada...** Ribeirão Preto, 2013a. 1 p.

GARCIA, J. F. **Manual de identificação de pragas da cana**. Campinas: FMC, 2013b, 219 p.

GIBLIN-DAVIS, R. M.; PEÑA, J. E.; DUNCAN, R. E. Lethal pitfall trap for evaluations of semiochemical-mediated attraction of *Metamasius hemipterus serecius* (Coleoptera: Curculionidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 77, n. 2, p. 247-255, 2002.

GIOMETTI, F. H. C.; LEITE, L. G.; TAVARES, F. M.; SCHMIT, F. S.; BATISTA FILHO, A.; DELLAACQUA, R. Virulência de nematoides entomopatogênicos (Nematoda: Rhabditida) a *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae). **Bragantia**, v. 70, n. 1, p. 81-86, 2011.

GIRON-PEREZ, K. ; NAKANO, O.; SILVA, A. C.; ODA-SOUZA, M. Atração de adultos de *Sphenophorus levis* Vaurie (Coleoptera: Curculionidae) a fragmentos vegetais em diferentes estados de conservação. **Neotropical Entomology**, v.38, n.6, p.842-846, 2009.

ISHIKAWA, Y.; IKESHOJI, T.; MATSUMOTO Y. 2-Phenylethanol: An attractant for the onion and seed-corn flies, *Hylemya antiqua* and *H. platura* (Diptera: Anthomyiidae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 18, n. 2, p. 270 – 277, 1983.

JAFFÉ, K.; SÁNCHEZ, P.; CERDA, H.; HERNÁNDEZ, J. V.; JAFFÉ, R.; URDANETA, G.; GUERRA, R. Chemical ecology of the palm weevil *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae): Attraction to host plants and to a male-produced aggregation pheromone. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 19, n. 8, p. 1703-1720, 1993.

JEANBOURQUIN, P.; GUERIN, P. M. Chemostimuli implicated in selection of oviposition substrates by the stable fly *Stomoxys calcitrans*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 21, p. 209–216, 2007.

JELVEZ SERRA, N. S.; GOULART, H. F.; TRIANA, M. F.; DOS SANTOS TAVARES, S.; ALMEIDA, C. I. M.; DA COSTA, J. G.; SANTANA, A. E. G.; ZHU, J. J. Identification of stable fly attractant compounds in vinasse, a byproduct of sugarcane-ethanol distillation. **Medical and Veterinary Entomology**, doi: 10.1111/mve. 12246, p. 1-11, 2017.

KOGAN, M. Integrated pest management: Historical perspective and contemporary developments. **Annual Review of Entomology**, v. 43, n.1, p. 243-270, 1998.

LEITE, I. H. F.; CARVALHO, E. B.; BITTENCOURT, A. J. Influence of vinasse on the development of *Stomoxys calcitrans*. **Ciência Rural**, 43, 326–330, 2013.

LEITE, L. G.; BATISTA, A. F.; GINARTE, A. M. A.; TAVARES, F. M.; ALMEIDA, L. C.; BOTELHO, P. S. M. Alternativa de controle: bicudo da cana-de-açúcar. **Revista Cultivar Grandes Culturas**, Pelotas, n. 83, 2005.

LERECLUS, D. Génétique et biologie moléculaire de *Bacillus thuringiensis*. **Bulletin de l'Institut Pasteur**, Paris, v.86, p.337-371, 1988.

LIMA, A.V. A.; BARBOSA, M. A. S.; CUNHA, L. C. S.; MORAIS, S. A. L.; AQUINO, F. J. T.; CHANG, R.; NASCIMENTO, E. A. Volatile Compounds Obtained by the Hydrodistillation of Sugarcane Vinasse, a Residue from Ethanol Production. **Revista Virtual de Química**, v. 9, p. 764-773, 2017.

LOGAN, J. G.; BIRKETT, M. A. Review semiochemicals for biting fly control: their identification and exploitation. **Pest Management Science**, Sussex, v. 63, p. 647-657, 2007.

MIRANDA, J.R. **História da cana-de-açúcar** – History of sugarcane. Campinas: Komedi, p.1-20, 2008.

MORAES, G. C.; ÁVILA, C. J. *Sphenophorus levis* detected in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Agricultura Science Research Journals**, v. 3, n. 1, p. 36-37, 2013.

NORDLUND, D. A.; LEWIS, W. J. Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interespecific interactions. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 2, n. 2, p. 211-220, 1976.

NOVACANA. **Usinas de Açúcar e Álcool no Brasil**. Disponível em: <https://www.novacana.com/usinas_brasil/estados/>. Acesso em: 05 fev. 2018.

OMENA, S. P. F.; CALLADO, N. H.; PEDROSA, V. A.; TORQUATO JUNIOR, H.; MENEZES, A. C. V.; PIMENTAL, I. M. C.. Tratamento de águas de lavagem de cana-de-açúcar, visando sua reutilização. In: XIII Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas, 2004, Cuiabá. **Anais do XIII Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas**, 2004.

PAULINO, J.; ZOLIN, C. A.; BERTONHA, A.; FREITAS, P. S. L.; FOLEGATTI, M. V. Estudo exploratório do uso da vinhaça ao longo do tempo.II. Características da cana-de-açúcar. **Revista Brasileira Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, p. 244-249, 2011.

PAVARINI, G. M. P.; DEMONARI, C. G.; PAVARINI, R.; SOUZA, I. V. Atração de adultos de *Cosmopolites sordidus* e *Metamasius* sp. (Coleoptera: Curculionidae) por armadilhas associadas a inseticida e proteína hidrolisada. **CULTURA AGRONOMICA (UNESP. ILHA SOLTEIRA)**, v. 27, p. 148-159, 2018.

PINTO, A. S.; GARCIA, J. F.; DE OLIVEIRA, H. N. Manejo das principais pragas da cana-de-açúcar. In: VANZOLINI, S. S.; SENE, A. P.; JENDIROBA, E.; NÓBREGA, J. C. M. **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. São Paulo: Ed. PROL, p. 257-280, 2006.

PRECETTI, A. A. C. M.; ARRIGONI, E. D. B. **Aspectos bioecológicos e controle do besouro *Sphenophorus levis* (Vaurie, 1978) (Coleoptera, Curculionidae) em cana-de-açúcar**. São Paulo: Copersucar, 1990. 15p. (Boletim Técnico Copersucar – Edição Especial).

PRECETTI, A. A. C. M.; TERAN, F. O. Gorgulhos da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis* (Vaurie, 1978), e *Metamasius hemipterus* (I, 1765) (Coleoptera: Curculionidae). In: REUNIÃO TÉCNICA AGRONÔMICA: PRAGAS DA CANA-DE-AÇÚCAR, 1., 1983, Piracicaba, **Anais...** Piracicaba: Copresuca, p. 32-37, 1983.

RIBEIRO, H.; FICARELLI, T. R. A. Queimadas nos canaviais e perspectivas dos cortadores de cana-de-açúcar em Macatuba, São Paulo. **Saúde e Sociedade**. São Paulo, v.19, n.1, p.48-63, 2010.

ROBLES-GONZALEZ, V.; LOPEZ-LOPEZ, E.; MARTINEZ-JERONIMO, F.; ORTEGA-CLEMENTE, A.; RUIZ-ORDAZ, N.; GALINDEZ-MAYER, J.; RINDERKNECHT-SEIJAS, N.; POGGI-VARALDO, H.M. Combined treatment of mezcal vinasses by ozonation and aerobic biological post-treatment. **Proceedings of 14th International Biotechnology Symposium**. Rimini, Italy, 14–18, September 2010 in CD ROM.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R 3.0.2. Vienna, 2013. Disponível em: <http://www.R-project.org/>. Acesso em: 8 mar. 2018.

ROCHAT, D.; NAGNAN, L. E.; MEILLOUR, P. N.; ESTEBAN-DURAN, J. R.; MOLASSE, C.; PERTHIUS, B.; MARIN, J.; DESCOINS, C. Identification of pheromone synergists in american palm weevil, *Rhynchophorus palmarum*, and attraction of related *Dynamis borass*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 26, n. 1, p. 155-187, 2000.

ROLIM, M. M.; LYRA, M. R. C. C.; DUARTE, A. S.; MEDEIROS, P. R. F.; SILVA, E. F. F.; PEDROSA, E. M. R. Influência de uma lagoa de distribuição de vinhaça na qualidade da

água. **Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, Taubaté, v. 8, n. 1, p. 155-171, 2013.

SALOMON, K.R. **Avaliação Técnico Econômica e Ambiental da Utilização do Biogás Proveniente da Biodigestão da Vinhaça em Tecnologias para Geração de Eletricidade**. 2007. 219 p. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Universidade Federal de Itajubá. Itajubá, 2007.

SCARPARI, M. S.; BEAUCLAIR, E. G. F. Anatomia e Botânica. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, p. 47–56, 2008.

SCHNEIDER, V. K.; SOARES-COSTA, A.; CHAKRAVARTHI, M.; RIBEIRO, C.; CHABREGAS, S. M.; FALCO, M. C.; HENRIQUE SILVA, F. Transgenic sugarcane overexpressing CaneCPI-1 negatively affects the growth and development of the sugarcane weevil *Sphenophorus levis*. **Plant Cell Rep**, doi: 10.1007/s00299-016-2071-2, p. 193-201, 2017.

STINGEL, E.; ALMEIDA, L. C.; ARRIGONI, E. B.; BONANI, J.P. Distribuição geográfica de *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae) em cana-de-açúcar, evolução dos registros de ocorrência e estimativa de área infestada, por município, em 2009. In.: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 23., 2010. Natal. **Anais...** Sociedade Entomológica do Brasil, 2012, p. 1.

SUGUITANI, C.; MATSUOKA, S. Efeitos do fósforo nas características industriais e na produtividade agrícola em cana-de-açúcar (cana-planta) cultivada em duas regiões do Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 28., 2001, Londrina. **Anais...** Londrina: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2001, p. 119.

TAVARES, F. M.; BATISTA FILHO, A.; LEITE, L. G.; ALMEIDA, L. C.; GOULART, T. M. Efeitos sinérgicos de combinações entre nematoides entomopatogênicos (Nemata: Rhabditida) e inseticidas químicos na mortalidade de *Sphenophorus levis* (Vaurie) (Coleoptera: Curculionidae). **Bioassay**, v. 4, p. 1-10, 2009.

TIGLIA, E. A.; VILELA, E. F.; MOURA, J. I. L.; ANJOS, N. Eficiência de armadilhas com feromônio de agregação e cana-de-açúcar na captura de *Rhynchophorus palmarum* (L). **Anais da Sociedade Entomológica Brasileira**, Londrina, v. 27, n. 2, p. 177-183, 1998.

TINZAARA, W.; DICKE, M.; VAN HUIS, A.; CLIFFORD, G. Use of infochemicals in pest management with special reference to the banana weevil *Cosmopolites sordidus* (Germar) (Coleoptera: Curculionidae). **Insect Science Applied**, Kenya, v. 22, n. 4, p. 241-261, 2002.

VAURIE, P. Revision of the genus *Sphenophorus* in South America. **American Museum Novitates**, New York, n. 2659, p. 1-30, 1978.

VIANA, A. M. M. **Comportamento de agregação e acasalamento de *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Curculionidae), mediado por semioquímicos, em olfatômetro**. 1992. 75 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1992.

VIEIRA, D. B. Fertirrigação sistemática da cana-de-açúcar com vinhaça. **Álcool e Açúcar**, v.6, n.28, p.26-30, 1986.

VILELA, E.; DELLA LUCIA, T. **Feromônios de insetos: biologia, química e aplicação**. 2 ed. Ribeirão Preto: Holos, 2001. 206 p.

VILLAS BOAS, A. M.; ALVES, S. B. Patogenicidade de *Beauveria spp.* E seu efeito associado ao inseticida monocrotofós sobre *Castnia licus* (Drury, 1770) (Lepidoptera: Castiniidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v.17, n.2, p. 305-332, 1988.

WEI, M.; XU, G.; GUI, H.; WANG, X.; CHEN, L. Effect of vinasse application on soil in sugarcane fields. **Applied Mechanics and Materials**, doi:10.4028/www.scientific.net/AMM, v. 700, p. 270–275, 2015.

ZARBIN, P. H. G.; ARRIGONI, E. D. B.; RECKZIEGEL, A.; MOREIRA, J.; BARALDI, P.T.; VIEIRA, P. C. Identification of male-specific chiral compound from the sugarcane weevil *Sphenophorus levis*. **Journal of chemical Ecology**, New York, v. 29, n. 2, p. 377-386, 2003.

ZARBIN, P. H. G.; PRINCIVAL, J. L.; SANTOS, A. A.; OLIVEIRA, A. R. M. Synthesis of (S), (+), 2, Methyl, 4, octanol: Male-specific compound released by sugarcane weevil *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 331-334, 2004.

ZARBIN, P. H. G.; RODRIGUES, M. A. C. M.; LIMA, E. R. Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 722-731, 2009.

ZHAO, J. P.; WANG H. T.; ZENG, X. N.; XUE, P. P. Differences in selection behaviors and chemical cues of adult asian citrus psyllids, *Diaphorina citri*, on healthy and huanglongbing-infected Young shoots of citrus plants. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v.5, n.9, p. 83-91, 2013.

ZORZENON, F. J.; BERGMANN, E. C.; BICUDO, J. E. A. Primeira ocorrência de *Metamasius hemipterus* (Linnaeus, 1758) e *Metamasius ensirotris* (Germar, 1824) (Coleoptera, Curculionidae) em palmiteiros dos gêneros *Euterpe* e *Bactris* (Arecaceae) no Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, n. 67, p. 265- 268, 2000.