



**UNESP - Faculdade de Engenharia
Campus de Ilha Solteira
Departamento de Fitossanidade,
Engenharia Rural e Solos**

**Voláteis liberados de galerias
de besouros da ambrosia
(Coleoptera, Scolytidae) ao
longo do tempo**

**Carlos Alberto Hector Flechtmann
Engenheiro Agrônomo**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia, campus de Ilha Solteira, UNESP, para obtenção do título de Livre-Docente na disciplina de Entomologia Geral, junto ao Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos.

1210001235



**ILHA SOLTEIRA - SP
Agosto de 2001**



**UNESP - Faculdade de Engenharia
Campus de Ilha Solteira
Departamento de Fitossanidade,
Engenharia Rural e Solos**

**Voláteis liberados de galerias
de besouros da ambrosia
(Coleoptera, Scolytidae) ao
longo do tempo**

1210001235



**Carlos Alberto Hector Flechtmann
Engenheiro Agrônomo**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia, campus de Ilha Solteira, UNESP, para obtenção do título de Livre-Docente na disciplina de Entomologia Geral, junto ao Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos.

Proc. 040/2001-NAS 114/01

UNESP - "CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA"	
SERVIÇO TÉCN. DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO	
DATA DE CHEGADA	DATA DE TOMBO
02/10/01	30/10/01
RECEBIDO POR	TOMBO
Quilzer	Tc. 1235
AQUISIÇÃO	CLASSIFICAÇÃO
Wagner autor R\$ 10,00	

**ILHA SOLTEIRA - SP
Agosto de 2001**

50102028

ENTOMOLOGIA AGRÍCOLA



Flechtmann, Carlos Alberto Hector

F593v Voláteis liberados de galerias de besouros da ambrosia (Coleoptera, Scolytidae)
ao longo do tempo / Carlos Alberto Hector Flechtmann. – Ilha Solteira, 2001
iii, 52 p.

Tese (livre docente)-Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia
de Ilha Solteira.

Bibliografia: p.28-35

1. Besouro da ambrosia 2. Feromônio 3.Xyleborini 4.Hidrocarbonetos mo-
noterpênicos 5.Monoterpenos oxigenados 6.Fase inicial de ataque

Dedico esta obra a meus pais,
NORMA e CARLOS,
que ao longo de toda minha vida,
ensinaram-me o valor
do estudo e da pesquisa, e
propiciaram-me todas as condições
para que eu pudesse seguir a carreira universitária

Livre-Docência Flechtmann i



AGRADECIMENTOS

Gostaria de forma geral agradecer aqui às muitas pessoas que me propiciaram condições, ao longo de minha carreira, de chegar na posição em que me encontro.

Ao meu orientador durante minha Graduação e Mestrado, Evoneo Berti Filho (ESALQ/USP), pelos anos de amizade, compreensão e ensinamentos. Aos meus professores e colegas de Mestrado da ESALQ/USP (Piracicaba/SP), pelo companheirismo, incentivo e troca de conhecimentos.

A José Henrique Pedrosa-Macedo e Eli Nunes Marques (Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR), pelos primeiros ensinamentos em taxonomia de Scolytidae.

Ao meu orientador de PhD, C. Wayne Berisford, por me propiciar todas as condições para que eu pudesse conduzir e concluir com êxito meu doutoramento, tornando ainda esta etapa de minha carreira frutífera e prazerosa. A inúmeros docentes, colegas e funcionários da University of Georgia (Athens, Georgia, EUA) durante meu PhD, pela amizade, dedicação, humanismo e auxílio.

À Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, por propiciar-me as condições para que eu me desenvolvesse na carreira docente e de pesquisador. Aos colegas do Curso de Agronomia, pela amizade, motivação e ensinamentos ao longo de minha vida universitária em Ilha Solteira. Aos funcionários da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira pela prontidão e eficiência em auxiliarem-me em tantos aspectos da vida profissional no campus.

Ao CNPq, FAPESP e Duraflora S.A. pelas bolsas de Mestrado e PhD concedidas.

Às empresas florestais Duraflora S.A., International Paper, Klabin Fabricadora de Papel e Celulose S.A., e Whitehall Forest, Chattahoochee National Forest e Savannah River Plant, pela permissão do uso de áreas na condução de experimentos e suporte técnico.



ÍNDICE

	Página
RESUMO	1
SUMMARY	3
1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO DE LITERATURA	6
3. OBJETIVOS	9
4. MATERIAL E MÉTODOS	9
4.1. Fonte dos Scolytidae	9
4.2. Infestação das Toras e Coleta de Voláteis	9
4.3. Métodos Instrumentais	12
4.4. Delineamento Experimental e Análise de Dados	13
5. RESULTADOS	14
6. DISCUSSÃO	18
7. CONCLUSÕES	27
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28



VOLÁTEIS LIBERADOS DE GALERIAS DE BESOUROS DA AMBROSIA (COLEOPTERA, SCOLYTIDAE) AO LONGO DO TEMPO

Carlos Alberto Hector Flechtmann

RESUMO: O objetivo deste experimento foi o de identificar voláteis liberados por galerias de três espécies de besouros da ambrosia, *Gnathotrichus materiarius*, *Xyleborinus saxeseni* e *Xyleborus pubescens*, durante a fase inicial de colonização de toras de *Pinus taeda* em laboratório, e estudar sua variação ao longo do tempo. Empregou-se a técnica da microextração de fase sólida para coleta dos voláteis, e de cromatógrafo de gás acoplado a espectrômetro de massa para identificação e quantificação dos mesmos. Foram identificados com precisão 39 compostos, sendo 14 destes hidrocarbonetos monoterpênicos, 18 monoterpênicos oxigenados, 2 hidrocarbonetos sesquiterpênicos, 2 derivados do fenil propanol, dois álcoois e uma cetona. De forma geral os hidrocarbonetos monoterpênicos predominaram nos primeiros 7 dias de ataque, porém a abundância se reduziu ao longo do tempo. Os monoterpênicos oxigenados apresentaram-se inicialmente em abundância baixa, porém após o sétimo dia esta passou a aumentar significativamente. A redução na abundância dos hidrocarbonetos monoterpênicos deveu-se provavelmente a processo de autooxidação e/ou detoxificação dos mesmos pelos besouros e/ou microorganismos associados. Os resultados indicam que o aumento mais pronunciado na abundância dos monoterpênicos oxigenados deva estar correlacionado ao desenvolvimento de fungos simbiotes nas paredes das galerias, em associação com mecanismos detoxificadores de larvas e adultos dos besouros. O conjunto de voláteis liberados das

Livre-Docência Flechtmann 1



galerias foi distinto para cada espécie, permitindo diferenciá-las estatisticamente. Em machos de *G. materiarius* encontrou-se um feromônio sexual potencial, sulcatol, enquanto que nas demais espécies nenhum composto candidato a tal se evidenciou.

Palavras-chave: feromônio, Xyleborini, hidrocarbonetos monoterpênicos, monoterpênicos oxigenados, fase inicial de ataque



VOLATILES RELEASED FROM AMBROSIA BEETLE (COLEOPTERA, SCOLYTIDAE) GALLERIES OVER TIME

Carlos Alberto Hector Flechtmann

SUMMARY: The main objectives of this experiment were to identify volatiles released from entrance galleries of three ambrosia beetle species, *Gnathotrichus materiarius*, *Xyleborinus saxeseni* and *Xyleborus pubescens*, during the beginning of their attack phase. I used the solid-phase microextraction technique to collect headspace samples, and a GC-MS to identify and quantify the volatiles released. 39 volatiles were identified, including 14 hydrocarbon monoterpenes, 18 oxygenated monoterpenes, 2 sesquiterpene hydrocarbons, 2 phenylpropanoids, 2 alcohols and 1 cetone. Overall, hydrocarbon monoterpenes predominated over the 7 first days of attack, but its abundance decreased over time. Oxygenated monoterpenes were present initially in low abundance, but this increased significantly after day 7. The decrease in hydrocarbon monoterpene abundance was due probably to an autoxidation process, in addition to a detoxification of those by either the beetles and/or their associated microorganisms. Results suggest the more pronounced increase in oxygenated monoterpene abundance might be related to the development of beetle symbiotic fungi on the gallery walls, in association with larval and adult beetle detoxification mechanisms. The bouquet of volatiles released from the galleries was distinct for each species, allowing for a statistical separation of them. In male *G. materiarius* I found sulcatol, a putative sex pheromone, while no pheromone candidate was found in any of the other species studied.



Key words: pheromone, Xyleborini, hydrocarbon monoterpene, oxygenated monoterpene, initial attack phase.



1. INTRODUÇÃO

Besouros da família Scolytidae são considerados como as principais pragas de coníferas no mundo (Wood 1982). Entretanto, normalmente a maioria de suas espécies reproduz-se em material morto ou em árvores fracas e/ou com stress (Schroeder 1992).

Considerando-se o hábito alimentar dos Scolytidae, estes podem ser divididos em espécies fleófagas, xilomicetófagas, xilófagas, mielófagas, herbívoras e espermófagas (Browne 1961, Atkinson & Equihua-Martinez 1986). Destes grupos, destacam-se pela sua importância econômica aquelas ditas fleófagas ou besouros da casca e as xilomicetófagas ou besouros da ambrosia (Wood 1982).

Besouros da casca escavam suas galerias na região do floema, sendo que este tecido se constitui também na principal fonte de alimento dos mesmos. Espécies deste grupo predominam em florestas temperadas, causando danos econômicos vultosos anualmente, expressos principalmente em mortalidade de árvores (Noguera-Martinez & Atkinson 1990, Paine et al. 1997). As principais espécies encontram-se nos gêneros *Dendroctonus*, *Ips* e *Scolytus* (Lie & Bakke 1981, Arbeitsgruppe Waldschutz 1984, Drooz 1985).

No grupo dos besouros da ambrosia encontram-se espécies cujo principal alimento é composto de fungos. Estes fungos são transportados em estruturas especiais presentes no corpo destas espécies, as micângias (Batra 1963b), são geralmente específicos (Batra 1967) e proliferam nas galerias construídas pelos besouros na região do alburno e cerne das plantas hospedeiras. A relação estabelecida é de simbiose, onde os besouros beneficiam-se pelo fato dos fungos concentrarem



nutrientes extraídos de um meio (alburno/cerne) tipicamente pobre nestes, enquanto que os fungos beneficiam-se por serem levados a novos substratos onde podem se desenvolver (Batra 1966, Batra 1967).

Enquanto que besouros da casca predominam em florestas temperadas, os besouros da ambrosia predominam em regiões tropicais (Chandra 1981, Atkinson e Equihua-Martinez 1986, Flechtmann et al. 1995). Comparativamente, os danos que estes causam são inferiores àqueles causados pelos besouros da casca (Samaniego & Gara 1970). As principais espécies de importância econômica neste grupo pertencem à tribo Xyleborini nos trópicos, destacando-se os gêneros *Premnobius* e *Xyleborus* (Beaver 1988, Flechtmann et al. 1995, Flechtmann et al. 2001).

2. REVISÃO DE LITERATURA

O processo de seleção hospedeira é muito importante tanto para besouros da casca como para besouros da ambrosia; pelo fato do substrato onde a maioria dos Scolytidae se desenvolve ser escasso e descontínuo no espaço e no tempo (Lanier 1983, Lindelöw et al. 1992), e a maioria destes voar uma única vez à procura da planta hospedeira, este voo é provavelmente o episódio mais crítico na vida destes (Browne 1958).

A seleção hospedeira pode ser dividida em duas fases, a atração primária, seguida ou não de uma atração secundária. Na atração primária, componentes voláteis emitidos pela planta hospedeira (caïromônios) podem ser utilizados pelo besouro na localização desta. Se o hospedeiro for adequado, pode ocorrer a atração secundária, onde o besouro emite feromônios (em associação ou não com



caiomônios) para atrair conspecíficos à planta hospedeira. Para besouros da casca, considera-se que em espécies agressivas (capazes de matar árvores vivas e saudáveis) a influência de caiomônios na localização hospedeira seja pequena ou mesmo inexistente, enquanto que em espécies secundárias (aquelas que colonizam árvores à morte ou mortas) haja influência caiomonal na atração primária (Byers 1989, Paine et al. 1997).

Em besouros da ambrosia, sabe-se muito pouco do papel de caiomônios na seleção hospedeira (Phillips et al. 1989, Kelsey & Joseph 1997). Entretanto, para várias espécies mostrou-se que caiomônios são importantes na atração primária ao hospedeiro (Samaniego & Gara 1970, Phillips et al. 1988, Liu & McLean 1989, Flechtmann et al. 1999). Uma atração secundária, envolvendo a produção de feromônios, é conhecida contudo em somente duas espécies de *Gnathotrichus* (Corthylini) e uma espécie de *Trypodendron* (Xyloterini) (Byrne et al. 1974, Macconnel et al. 1977, Borden e McLean 1979). Em Xyleborini, aparentemente não há espécies produtoras de feromônios (Beaver 1977, Klimetzek et al. 1986), o que sugere a falta de pesquisas neste grupo de insetos (Beaver 1977).

Nos besouros da ambrosia, além de pouquíssimos estudos relativos à produção ou não de feromônios, não são encontrados quaisquer trabalhos relativos à identificação e/ou quantificação de semioquímicos emitidos de orifícios de entrada de galerias destes.

Muitas vezes, análises de glândulas e tecidos do corpo de um dado Scolytidae, visando à identificação de compostos feromoniais, não refletem necessariamente o produto liberado (Francke 1988) ou então este pode ser liberado tão rapidamente que ele não é armazenado no inseto (Gries et al. 1988). Desta forma, a captura de voláteis emitidos pelos besouros em condições naturais (quando este se encontra na planta hospedeira), expressa mais corretamente os compostos feromoniais



liberados, tanto qualitativa como quantitativamente (Francke 1988). Entretanto, uma restrição ao emprego desta técnica é que a quantidade de terpenóides naturalmente emitidos pela planta hospedeira é proporcionalmente muito alta em relação aos compostos produzidos no interior das galerias, dificultando sobremaneira na detecção destes últimos (Byers 1989).

A técnica de microextração de fase sólida (SPME) é um método de coleta de compostos voláteis que se destaca pela capacidade em concentrar compostos presentes em baixa concentração no meio (Zhang & Pawliszyn 1993, Bartelt 1997), e é considerada ideal para analisar muitas das misturas complexas liberadas por sistemas biológicos (Czerwiński et al 1996, Bartelt 1997), incluindo voláteis liberados de galerias de Scolytidae.

G. materiarius (Drooz 1985) e *X. pubescens* (Wood 1982) são encontrados no leste dos EUA da Florida ao Canadá, enquanto que *X. saxeseni* é encontrado por todo o país. *Xyleborus pubescens* é uma das poucas espécies em Xyleborini que apresenta especificidade hospedeira, atacando algumas espécies de *Pinus* (Atkinson & Peck 1994); *G. materiarius* desenvolve-se em troncos de coníferas à morte ou mortas, enquanto que *X. saxeseni* é encontrado numa variedade de árvores, de pinos (hospedeiros mais importantes) a espécies de folhas largas (Drooz 1985).

Em *Gnathotrichus* (Farris, 1963, Liu & McLean, 1989) os machos são os besouros pioneiros (os primeiros a localizar uma árvore hospedeira e iniciar a construção de galeria), e ambos sexos são alados e voam (Wood 1982). Em Xyleborini entretanto, os machos são pequenos, de vida curta, não voam e normalmente nunca deixam as galerias onde nasceram (Hamilton 1967, Norris 1979). Desta forma, em Xyleborini são as fêmeas as pioneiras, cabendo a estas localizar e colonizar novas plantas hospedeiras (Francke-Grosmann 1975).



3. OBJETIVOS

Os objetivos deste experimento foram os de identificar quais voláteis são liberados de orifícios de entrada de galerias de três espécies de besouros da ambrosia, *Gnathotrichus materiarius* (Fitch) (Corthylini), *Xyleborinus saxeseni* (Ratzeburg) e *Xyleborus pubescens* Zimmermann (Xyleborini) ao longo da fase inicial de colonização de toras de *Pinus taeda* L. por estes, bem como tentar constatar a produção de eventuais feromônios pelos mesmos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Fonte dos Scolytidae

Cem toras de *Pinus taeda* L. (comprimento de 0,7 m e diâmetro de 0,15 a 0,20 m) foram expostas ao ataque de *Gnathotrichus materiarius*, *Xyleborinus saxeseni* e *Xyleborus pubescens* em talhão de *Pinus palustris* Miller, U.S. Department of Energy Savannah River Site (Condado de Barnwell, estado da Carolina do Sul, Estados Unidos) no período de agosto a outubro de 1997. Após o início de ataque a estas toras, 10 foram trazidas semanalmente ao laboratório e colocadas no interior de uma caixa de emergência (Browne 1972). Besouros emergidos eram coletados diariamente, sexados (Wood 1982) e colocados separadamente em placas de petri contendo papel filtro umedecido com água destilada, e mantidos sob refrigeração (4°C) até serem utilizados (Borden & McLean 1979).



4.2. Infestação das Toras e Coleta de Voláteis

Toras de *P. taeda* (1 m de comprimento e aproximadamente 0,2 m de diâmetro) foram artificialmente infestadas em laboratório (temperatura ambiente de cerca de 22°C) entre novembro e dezembro de 1997. Orifícios de cerca de 1 mm de profundidade foram artificialmente perfurados nas toras para facilitar uma penetração inicial dos besouros, os quais foram recobertos individualmente com metade de uma cápsula gelatinosa (para prevenção de fuga). Para *G. materiarius*, foram infestadas duas toras, com um total de 100 machos numa e 50 fêmeas em outra tora; no segundo dia, imediatamente após a coleta dos voláteis, adicionou-se fêmeas a metade das cápsulas contendo machos. Em *X. pubescens* infestou-se uma tora com 60 fêmeas, cada uma também individualizada sob uma cápsula gelatinosa contendo um orifício artificialmente perfurado, à semelhança do que foi feito com *G. materiarius*. Para *X. saxeseni*, devido a esta espécie ser de pequeno porte, foram colocadas duas fêmeas sob cada cápsula gelatinosa, estas agrupadas de modo a formar um pentágono (uma cápsula no vértice de cada um dos 5 lados); utilizou-se de 8 grupos, resultando num total de 40 cápsulas e 80 fêmeas.

Os compostos voláteis foram coletados individualmente na entrada das galerias a cada 24 horas. Para *X. pubescens*, coletou-se voláteis pelos seis primeiros dias; para *X. saxeseni* coletou-se os mesmos nos seis primeiros dias e no 14º dia, enquanto que para *G. materiarius* as coletas foram realizadas nos sete primeiros dias (para machos, fêmeas e casais, estes últimos iniciando-se somente a partir do terceiro dia) e também para machos e casais no 12º e 20º dias (as fêmeas morreram todas até o 12º dia). A coleta diária de voláteis foi feita em 5 orifícios de galerias de machos, fêmeas e casais de *G. materiarius*, além de em orifícios artificiais (testemunhas), 10 fêmeas e 5 testemunhas em *X.*



pubescens e seis grupos (pentágonos) e 4 testemunhas em *X. saxeseni*. Escolhia-se (exceto para fêmeas de *G. materiarius* e testemunhas) somente galerias onde havia *frass* abundante para a coleta de voláteis. Uma testemunha era um orifício feito artificialmente com uma broca de 1/16" a uma profundidade de cerca de 4 mm, diariamente, para simular a atividade de broquear do besouro.

Em *G. materiarius* e *X. pubescens*, para a coleta de voláteis a cápsula gelatinosa era removida, e uma pipeta de pasteur (volume de ≈ 2.9 ml) era colocada sobre o orifício de entrada da galeria, incluindo o *frass*. A extremidade superior da pipeta era coberta com papel alumínio, e o conjunto permanecia por 30 min sobre a galeria para que houvesse um equilíbrio dos voláteis no interior da pipeta, antes que estes fossem coletados. Para *X. saxeseni* utilizou-se de um funil de vidro (volume de ≈ 37 ml), suficientemente grande para englobar um conjunto (pentágono) de 5 cápsulas gelatinosas, em procedimento similar ao utilizado para as demais espécies. Os voláteis foram coletados através da técnica de microextração de fase sólida (SPME), com uma fibra recoberta com 100 μ m de polydimethylsiloxano como a fase estacionária (Supelco; Bellefonte, Pennsylvania; EUA). A fibra era exposta por 1 min no interior da pipeta/funil, sendo em seguida recolhida para o interior da seringa, cuja extremidade era selada com um septo de borracha. As fibras eram mantidas em gelo até serem transferidas a um freezer regulado para -82°C . Os voláteis eram analisados no mesmo dia em que foram coletados. Após a coleta dos voláteis, o *frass* na entrada da galeria era removido, e a cápsula gelatinosa era recolocada para prevenir escape dos besouros.



4.3. Métodos Instrumentais

Para a identificação dos voláteis, utilizou-se de um cromatógrafo de gás-espectrômetro de massa (GC-MS) Hewlett-Packard GCD G1800A, equipado com uma coluna capilar de sílica fundida HP-FFAP (46,8 m x 0,2 mm de diâmetro interno; espessura do filme de 0,33 mm) (Hewlett-Packard Corp., Palo Alto, California; EUA). A programação de temperatura foi: 40 °C por 1 min, 16 °C/min até atingir 80 °C, 7 °C/min até atingir 202 °C, e finalmente 40 °C/min até atingir 230 °C, permanecendo por 6 min. O gás utilizado foi hélio, e o fluxo foi de 0,7 ml/min. O injetor foi regulado para 220 °C, e o detector espectral de massa para 230 °C.

As injeções foram feitas manualmente usando de um suporte especial de SPME (Supelco, Bellefonte, PA; EUA). A câmara de injeção tinha 0,75 mm de diâmetro interno, o que melhora significativamente os resultados do GC-MS (Yang & Peppard 1994); as análises foram feitas no modo sem divisão (Czerwiński et al. 1996). As fibras foram limpas termicamente na cabeça de injeção (Yang & Peppard 1994), e reutilizadas até o final do experimento (Bartelt 1997).

Os voláteis foram identificados baseando-se na massa espectral dos mesmos, e tempos de retenção na coluna similares aos de padrões conhecidos.

Utilizou-se de uma calibração externa (Yang & Peppard 1994), onde as fibras eram expostas no interior de frasco de 500 ml ao qual era adicionado um padrão contendo undecano ou 4-alilanisole (1 µl de padrão a 250 µg/ml). Não se procurou quantificar os voláteis pelo fato do método da calibração externa não ser adequada a técnicas SPME de quantificação (Yang & Peppard 1994). A abundância dos voláteis foi expressa como a abundância relativa baseada na abundância de undecano para *G. materiarius* e 4-alilanisole para *X. pubescens* e *X. saxeseni*. Doravante, a abundância relativa



será denominada somente de “abundância”.

4.4. Delineamento Experimental e Análise de Dados

O delineamento experimental utilizado foi o totalmente casualizado. A abundância dos voláteis foi transformada em $\sqrt{(x + 0,5)}$ para remover a heterodasticidade. Dados de comparação de abundância de voláteis entre espécies e entre períodos de emissão foram submetidos à análise de variância (proc GLM; SAS 1990) e médias separadas pelo teste de Tukey (SAS 1990). Utilizou-se ainda de uma análise de função discriminativa (Snyder et al. 1996) para determinar se o conjunto de voláteis liberados de galerias de machos, fêmeas, casais e/ou testemunhas, dentro e entre de cada espécie, eram estatisticamente distintos (proc STEPDISC em combinação com proc DISCRIM; SAS 1990).



5. RESULTADOS

Vários compostos estavam presentes no buquê de semioquímicos liberados de galerias das três espécies de Scolytidae, e 39 destes puderam ser identificados com precisão, a maioria destes sendo terpenóides. Dentre os hidrocarbonetos monoterpênicos (HM) identificou-se o α -felandreno, α -pineno, α -terpineno, β -felandreno, β -pineno, canfeno, 3-careno, fencheno, γ -terpineno, limoneno, mirceno, p-cimeno, terpinoleno e triciclina, nos monoterpenos oxigenados (MO) o α -terpineol, acetato de bornila, borneol, carvone, cânfora, fenchone, isoborneol, isopinocanfene, linalool, mirtenal, mirtenol, p-cimeno-8-ol, pinocanfene, pinocarvone, terpineno-4-ol, trans-pinocarveol, trans-verbenol e verbenone, nos hidrocarbonetos sesquiterpênicos o bergamoteno e o cariofileno, nos derivados do fenilpropano (FP) o 4-alilanisole e o anetol, nos álcoois o etanol e o sulcatol, e na cetona a acetona. Dos compostos listados, em função dos valores de abundância encontrados, trabalhou-se com somente 20 na maioria das análises estatísticas. Os HM α -pineno, β -pineno e limoneno, não puderam ter a abundância determinada em função da altíssima concentração em que se encontravam, incorrendo em sério risco de se queimar o detector do GC-MS, o qual era desligado no período de tempo em que estes emergiam da coluna.

Para as espécies *G. materiarius* e *X. saxeseni*, a grande maioria dos HM decresceu em abundância ao longo do tempo (Figs. 1 a 4), à exceção de fencheno e p-cimeno, cuja abundância começou a aumentar nos últimos dias de análise (exceto para p-cimeno em casais de *G. materiarius*) (Figs. 2 e 4). Para *X. pubescens*, enquanto que resultados foram similares aos das outras espécies para



os compostos p-cimeno e fencheno (Fig. 6), houve entretanto um aumento gradativo na abundância dos demais HM, à medida em que o ataque progredia (Figs. 5 e 6), resultados estes diametralmente opostos aos observados para as duas outras espécies.

Não foram feitas análises de voláteis liberados de galerias de fêmeas de *G. materiarius* (à exceção das análises de função discriminativa), em função de nenhuma destas ter efetivamente escavado galerias. As mesmas simplesmente permaneceram abrigadas nos orifícios artificialmente construídos, e das 50 fêmeas originais, todas exceto uma estavam mortas após 8 dias.

No grupo dos MO, ao longo do tempo houve um aumento na abundância dos compostos isopinocanfene, pinocanfene, fenchone, terpineno-4-ol e trans-pinocarveol (este exceto para *G. materiarius*), para todas as espécies estudadas (Figs. 1 a 6). Acetato de bornila entretanto apresentou uma redução na abundância para todas as espécies de besouros (Figs. 1, 3 e 5), enquanto que borneol e verbenone apresentaram comportamento variável ao longo do tempo (Figs. 2, 4 e 6).

Dentre os álcoois, sulcatol foi encontrado somente nos tratamentos de machos de *G. materiarius*, e tudo indica ser este um feromônio sexual. O etanol apresentou uma redução na abundância para as espécie *X. pulicarius* (Fig. 6), enquanto que em *G. materiarius* (Fig. 2) e *X. saxeseni* (Fig. 4) esta aumentou ao longo do tempo.

O FP 4-alilanisole comportou-se basicamente como a maioria dos HM, i.e., sua abundância diminuiu ao longo do tempo (Figs. 1 e 3), exceto para *X. pubescens*, onde ela aumentou (Fig. 5).

Agrupando-se os semioquímicos dentro dos grupos HM, MO e FP, para todas as espécies e tratamentos (casais, machos, fêmeas e testemunhas), houve uma nítida tendência para uma redução na abundância de HM (à exceção de testemunhas e fêmeas de *X. pubescens*, Fig. 8) e FP, e aumento naquela de MO ao longo do tempo (Figs. 7 e 8). Os HM predominaram como grupo de



semioquímicos, para aqueles tratamentos com besouros (casais, machos e fêmeas) até aproximadamente o sexto ou sétimo dia após o início da construção das galerias (à exceção de *X. pulicarius*; Fig. 8), após o qual a abundância de HM e MO foi estatisticamente similar (Figs. 7 e 8).

A comparação da quantidade total de voláteis emitida de galerias com besouros e respectivas testemunhas apresentou resultados que variaram conforme a espécie. Para *G. materiarius*, os HM α -terpineno, γ -terpineno, 3-careno, terpinoleno, p-cimeno e fencheno, os MO fenchone, isopinocanfone, linalool, pinocanfone, terpineno-4-ol e trans-pinocarveol, e o FP 4-alilanisole foram liberados em abundâncias significativamente superiores em galerias com machos e/ou casais que nas testemunhas. O HM mirceno foi emitido em abundância significativamente maior de galerias testemunhas, enquanto que os também HM canfeno e triciclina foram liberados em maiores abundâncias de galerias de casais e testemunhas (Fig. 9).

Na espécie *X. saxeseni*, os HM p-cimeno, fencheno e 4-alilanisole foram significativamente mais abundantes em galerias de fêmeas que testemunhas, enquanto que para 3-careno, canfeno, mirceno e triciclina estes foram mais abundantes em galerias testemunhas. Dentre os MO, fenchone, isopinocanfone, pinocanfone, terpineno-4-ol e trans-pinocarveol foram significativamente mais abundantes em galerias de fêmeas que em testemunhas (Fig. 10).

Para *X. pubescens*, os HM p-cimeno, β -felandreno, canfeno, mirceno e triciclina, o álcool etanol e o MO isopinocanfone foram significativamente mais abundantes em galerias testemunhas, enquanto que somente o MO terpineno-4-ol foi mais abundante em galerias de fêmeas (Fig. 11).

Nas análises de função discriminativa, procurou-se verificar se os buquês de semioquímicos liberados de galerias de cada um dos tratamentos para as três espécies estudadas eram distintos entre si. Para *G. materiarius*, os voláteis utilizados para classificar os tratamentos (mirceno, fencheno,



verbenone, isopinocanfone, p-cimeno-8-ol e trans-pinocarveol) permitiram classificar os voláteis de galerias de casais corretamente em mais de 75% dos casos, voláteis de galerias de machos em mais de 60% dos casos, voláteis de galerias de fêmeas em mais de 80% dos casos. Voláteis de galerias de testemunhas foram corretamente classificados como tal em somente cerca de 48% dos casos, sendo este tratamento classificado erroneamente em mais de 40% dos casos como voláteis de galerias de fêmeas (Tab. 2).

Os semioquímicos selecionados pela proc STEPDISC para classificar voláteis de galerias de fêmeas e testemunhas de *X. saxeseni* foram α -terpineol, triciclina, cariofileno, borneol e etanol. Estes permitiram classificar corretamente voláteis de galerias de fêmeas em mais de 90% dos casos e voláteis de galerias testemunhas em mais de 85% destes (Tab. 3). Em *X. pubescens* os voláteis selecionados foram triciclina, linalool, fencheno e pinocanfone (dados não mostrados), o que permitiu classificar corretamente voláteis liberados de galerias de fêmeas em mais de 80% dos casos e voláteis de galerias das respectivas testemunhas em mais de 90% dos casos (Tab. 4).

Os voláteis liberados por casais de *G. materiarius*, fêmeas de *X. saxeseni* e de *X. pubescens* provaram ser distintos entre si. Os voláteis utilizados para classificar estes tratamentos foram cariofileno, α -terpineol, triciclina, mirceno, pinocanfone e 3-careno. Os tratamentos em questão foram corretamente classificados como tais em mais de 90% dos casos (Tab. 5).



6. DISCUSSÃO

A técnica de SPME provou ser bastante eficiente na captura de voláteis emanados de galerias de besouros e testemunhas. Um total de 14 HM, 18 MO, 2 HS, 2 PP, 2 álcoois e uma cetona puderam ser identificados com precisão. Este resultado é muito semelhante àquele obtido por Flechtmann et al. (1999) também em *P. taeda* e uso da mesma técnica, e superior qualitativamente a resultados obtidos utilizando-se de outras técnicas de coleta de voláteis (Leufvén & Birgersson 1987, Gara et al. 1993). A variação dos HM α -pineno, β -pineno e limoneno não pôde ser analisada, devido à altíssima abundância em que se apresentavam, o que poderia danificar o detector do GC-MS. Entretanto, estes compostos são bastante comuns em *P. taeda*, podendo corresponder a mais de 90% dos monoterpenos nesta espécie de pino (Bulgakov 1988), e a expectativa é de que o comportamento destes seria similar àquele apresentado por outros HM comuns em *P. taeda*, como mirceno e canfeno, por exemplo.

Individualmente, houve uma grande variação na abundância dos voláteis coletados, mesmo quando estes foram obtidos de orifícios testemunhas, e posicionados proximamente uns dos outros. Aparentemente esta variação é característica comum a pinos (Gambliel et al. 1985), e foi também observada em voláteis liberados de orifícios de galerias de *Ips typographus* atacando árvores vivas de *Picea abies* (Birgersson & Bergström 1989).

De forma geral observou-se, nas espécies *G. materiarius* e *X. saxeseni*, uma diminuição na abundância dos compostos HM emitidos de entradas de galerias, ao longo do tempo (Figs. 1 a 4).



Estes resultados concordam com informações da literatura, que mostram que a abundância destes compostos declina paulatinamente, após o corte da árvore (Byers et al. 1989, Flechtmann et al. 1999). Uma notável exceção entretanto foram os HM liberados de galerias de fêmeas e testemunhas em *X. pubescens*, onde se observou uma tendência oposta, a de um aumento na abundância ao longo do tempo (Figs. 5 e 6).

Em contato com o ar, sabe-se que alguns dos HM autoxidam (Leufvén & Birgersson 1987, Amman et al. 1989), contribuindo assim na redução da abundância destes, como observado mesmo em orifícios de testemunhas (Figs. 1, 3 e 5). Vários dos HM são ainda tóxicos aos Scolytidae, e muitas espécies (principalmente besouros da casca) têm a capacidade de oxidá-los, resultando na produção de compostos mais fáceis de excretar, alguns dos quais podem ter função feromonal (Hughes 1973, Francke & Vité 1983, Birgersson & Leufvén 1988). A grande maioria dos Scolytidae está associada com microorganismos, sendo os principais as bactérias, fungos e leveduras (Wood 1982, Leufvén et al. 1984). HM são também tóxicos a estes microorganismos, os quais costumam detoxificá-los a produtos atóxicos, os quais algumas vezes funcionam como semioquímicos reguladores de comportamento usados pelos besouros associados (Leufvén et al. 1984, Leufvén & Birgersson 1987, Vanderwel & Oehlschlager 1987, Amman et al. 1989, Grégoire et al. 1991).

Não se sabe exatamente o que contribuiu para que, em *X. pubescens*, os resultados tivessem sido opostos àqueles observados para as demais espécies, para os mesmos monoterpenos analisados. Nesta, tanto em galerias artificialmente criadas (testemunhas) como aquelas com besouros, a abundância de HM aumentou do dia 1 ao dia 6 (Figs. 5 e 6). Muito embora a abundância de HM diminua em árvores cortadas ao longo do tempo, ela pode aumentar em árvores vivas atacadas por Scolytidae (Leufvén & Birgersson 1987, Birgersson & Bergström 1989) ou fungos patogênicos



(Nebeker et al. 1995). Há ainda relatos de aumento na abundância de certos HM mesmo após o corte de árvores de *P. taeda* (Werner 1972). A tora utilizada para ser infestada com *X. pubescens* tinha um diâmetro maior que aquelas usadas para infestar besouros das demais espécies, existindo a possibilidade de que houvesse ainda tecido vivo nesta tora, sintetizando monoterpenos como resposta à infestação pelo besouro e fungos simbiontes.

Duas notáveis exceções ao padrão geral de comportamento apresentado pelos HM ocorreram com p-cimeno e fencheno, cujas abundâncias aumentaram ao longo do tempo (Figs. 2, 4 e 6). O composto p-cimeno é encontrado em concentrações baixas em árvores sadias, porém quando a resina fica exposta a condições oxidativas, sua abundância aumenta (Lockhart 1990), e resultados similares aos aqui obtidos já foram reportados anteriormente (Flechtmann et al. 1999). Fencheno aparentemente ocorre somente quando escolitídeos e/ou seus fungos associados estão presentes (Sullivan et al. 1997), e uma discussão maior sobre este composto ocorrerá mais adiante.

Enquanto observou-se uma redução na abundância dos HM ao longo do tempo, os compostos MO aumentaram em abundância, nas três espécies de Scolytidae estudadas (Figs. 1 a 6). Este aumento na abundância em MO está bem documentado na literatura, e pode decorrer da oxidação dos HM, tanto por espécies de Scolytidae, seus microorganismos associados ou mesmo por autooxidação (Leufvén & Birgersson 1987, Birgersson & Leufvén 1988, Birgersson & Bergström 1989, Hunt & Borden 1990). Ao contrário do que ocorre com os HM, onde sua abundância pode aumentar ou diminuir ao longo do tempo em função da árvore atacada estar viva ou cortada, em MO o aumento na abundância ocorre tanto em árvores vivas (Birgersson & Bergström 1989) como cortadas (Flechtmann et al. 1999). Um MO que não seguiu a tendência do grupo foi o acetato de bornila, cuja abundância decresceu ao longo do tempo, comportamento este já reportado na literatura



(Flechtmann et al. 1999).

Verbenone é o produto final da oxidação de α -pineno (Hunt et al. 1989), e geralmente a concentração deste aumenta ao longo do tempo, após o corte de árvores (Byers et al. 1989, Byers 1994, Flechtmann et al. 1999). Este MO também aumenta em concentração com o progresso do ataque de Scolytidae a árvores vivas (Leufvén & Birgersson 1987, Birgersson & Bergström 1989). Neste experimento, observou-se um aumento significativo em sua abundância apenas em *G. materiarius* (Fig. 2) e *X. saxeseni* (Fig. 4), quando provavelmente já havia bom desenvolvimento de fungos simbioss nas galerias, e as larvas já se faziam presentes.

Na combinação de casais de *G. materiarius* somente, houve um comportamento distinto do reportado anteriormente, para alguns HM e MO. Para os HM terpinoleno, γ -terpineno, α -terpineno, fencheno e p-cimeno, e para os MO trans-pinocarveol, terpineno-4-ol, isopinocanfene, verbenone, pinocanfene e fenchone a abundância inicial é bem alta (geralmente a mais alta) no dia 3 (após a introdução da fêmea aos machos), caindo drasticamente no dia subsequente (Figs. 1 e 2). O macho, como besouro pioneiro, inicia a construção da galeria, porém a faz inicialmente curta, do comprimento do próprio corpo. Quando a fêmea é atraída, ela o substitui nesta tarefa, ampliando-a, cabendo agora ao macho expulsar para fora da galeria o frass produzido (Kamp 1979). Devido provavelmente à necessidade da fêmea em ter que rapidamente ampliar uma galeria que seja longa o suficiente para abrigar tanto a ela como ao macho, haja uma produção momentaneamente alta de frass (que possui alta superfície de exposição), liberando grandes quantidades de HM. Parte destes HM precisariam ainda ser detoxificados pela fêmea e, em associação a uma provável autooxidação dos mesmos, resultariam na produção inicialmente alta observada de MO. Para *Xyleborinus* e *Xyleborus*, onde um único indivíduo é responsável pela construção da galeria, não se observou tal pico inicial de



abundância nestes compostos (Figs. 4 a 6).

O etanol é um composto produzido comumente em árvores caídas (Moeck 1970, Lindelöw et al. 1992), e funciona como caíromônio a várias espécies de Scolytidae no processo de seleção hospedeira (Samaniego & Gara 1970, Phillips et al. 1988). Este álcool apresentou uma abundância muito variável conforme a espécie (Figs. 2, 4 e 6), apresentando comportamento definido apenas para *G. materiarius* (Fig. 2) e *X. saxeseni* (Fig. 4), onde a abundância aumentou ao longo do tempo. Flechtmann et al. (1999) observaram que este composto teve abundância máxima coincidente com o pico de abundância da maioria dos MO, embora Kelsey & Joseph (1997) considerem que a abundância de etanol não deva variar em árvores cortadas por alguns meses após o corte.

No grupo dos FP, a abundância de 4-alilanisole reduziu-se ao longo do tempo (Figs. 1 e 3), comportando-se como a maioria dos HM, concordando com dados de literatura (Flechtmann et al. 1999). Novamente, para *X. pubescens* os resultados foram opostos, havendo um aumento na abundância (Fig. 5), à semelhança do que foi observado para a maioria dos HM para este tratamento. Werner (1972) obteve resultados comparáveis, ao observar aumento na concentração deste composto em árvores cortadas, quando comparadas com árvores em pé. Novamente, estes resultados são atípicos, e difíceis de se explicar.

Agrupando-se todos os HM e MO, verificou-se para *G. materiarius* e *X. saxeseni* que até o dia 5 ou 6 aproximadamente (o tempo varia dependendo da espécie e sexo do besouro), a abundância de HM foi estatisticamente superior àquela dos MO. Entretanto, nos dias subsequentes a abundância dos MO passa a aumentar mais, e esta torna-se estatisticamente igual à dos HM. Verificou-se ainda que a abundância de MO aumentou mais rapidamente em galerias de besouros que nas correspondentes testemunhas (Figs. 7 e 8).



Fêmeas de *X. saxeseni* colocam seus ovos livremente na galeria parental (Prebble & Graham 1957), enquanto que em *Gnathotrichus* os ovos são colocados em nichos especiais, em galerias transversais que irradiam da galeria parental (Wood 1982). Em menos de 7 dias é muito improvável que as larvas tenham eclodido dos ovos eventualmente produzidos. Desta forma, os dados obtidos sugerem que, cerca de 6 a 7 dias após iniciar a construção de galerias, os fungos simbiontes trazidos pelos besouros pioneiros já estivessem se estabelecido nas galerias, e seriam os responsáveis pela produção de MO (a partir de HM), como já sugerido anteriormente na literatura (Leufvén & Birgersson 1987, Birgersson & Bergström 1989). Para *X. pubescens*, como as coletas de voláteis estenderam-se somente até o sexto dia de ataque, observou-se abundância de HM sempre superior estatisticamente à de MO (e FP também) (Fig. 8).

Para casais de *G. materiarius* e fêmeas de *X. saxeseni*, onde coletou-se voláteis além dos primeiros 6 a 7 dias da infestação, observou-se um pico evidente de HM, MO e FP aos 12 e 14 dias, respectivamente (Figs. 7 e 8). Seguramente nesta fase já havia larvas desenvolvendo-se nas galerias parentais, e este recrudescimento na abundância de compostos deve talvez estar associado à atividade destas larvas, muito provavelmente em adição aos fungos simbiontes. Já para o dia 20 em casais de *G. materiarius*, o decréscimo na abundância dos voláteis deveria possivelmente estar associado à fase de pupação das larvas, com respectiva diminuição na atividade biológica (Fig. 7).

Para *G. materiarius*, a emissão total de compostos HM e FP foi geralmente maior em galerias de casais que naquelas de machos e testemunhas (Fig. 9). Isto era de se esperar, pois a ação combinada de fêmeas e larvas deveria poder suplantear a ação simulada de broquear nas testemunhas. Em *X. saxeseni* entretanto, para poucos HM e FP a emissão total foi estatisticamente maior em galerias de fêmeas que nas de testemunhas. Talvez o que tenha ocorrido foi que a galeria criada



artificialmente pela broca fosse maior que aquela criada naturalmente pelas fêmeas desta espécie, que são diminutas em comparação com as demais espécies. Quanto a *X. pubescens*, devido a uma liberação atipicamente alta de HM, quando houve uma diferenciação estatística entre abundâncias, esta foi maior nas testemunhas (Fig. 11).

Três HM, mirceno, canfeno e triciclina, em especial o primeiro, destacaram-se pelo fato de que a emissão destes foi, para as espécies estudadas, significativamente mais alta em testemunhas que em galerias com besouros. Talvez estes compostos sejam oxidados/degradados rapidamente, e como a simulação de galeria na testemunha era feita imediatamente antes da coleta dos voláteis, havia tempo ainda para coletá-los, e em quantidade maior que nas galerias de besouros, onde a construção de galeria era feita mais paulatinamente. Uma outra hipótese seria a de que a volatilidade destes compostos seja alta, e devido novamente à diferença na velocidade de construção de galeria por besouros e aquela feita artificialmente, perderia-se muito mais destes compostos no primeiro caso.

Quanto aos MO, observou-se que a abundância total foi maior em galerias com casais (ou machos) em *G. materiarius* e fêmeas em *X. saxeseni* (Figs. 9 e 10) que nas testemunhas. Estes dados indicam que besouros e/ou fungo simbiontes devem estar contribuindo na síntese de MO, haja vista que estes compostos aparecem em abundâncias significativamente superiores em galerias de besouros que em testemunhas. Entretanto, para *X. pubescens*, somente a abundância de terpineno-4-ol foi significativamente maior em galerias de fêmeas, sendo similares estatisticamente para a grande maioria dos demais MO (Fig. 11). Estes resultados aparentemente harmonizam com a observação feita anteriormente, de que a produção de MO acentua-se somente a partir do sexto/sétimo dia após o início do ataque.

Dos compostos determinados, os HM aqui encontrados são, de forma geral, comuns em



resinas de pinos (Sullivan et al. 1997, Flechtmann et al. 1999); entretanto, a composição dos MO e OH difere grandemente, aparentemente em função da ação combinada dos besouros e seus microorganismos associados. Uma análise da literatura deixa evidente que estes compostos foram reportados associados basicamente somente a besouros da casca (Tab. 1), sendo esta a primeira vez em que estes são registrados para besouros da ambrosia.

Em *G. materiarius*, machos são os besouros pioneiros, e responsáveis por transportar o fungo simbiote, na micângia. A principal espécie de fungo da ambrosia é *Endomycopsis fasciculata*, do qual larvas e adultos se alimentam (Batra 1963a, Postner 1974). Aparentemente, muito embora o macho nesta espécie carregue o fungo, este só deve ser inoculado na galeria após uma fêmea unir-se a ele, se o comportamento desta espécie for similar àquele observado em *G. sulcatus*, onde em galerias de machos solitários o crescimento de fungos era pequeno, e normal em galerias de casais (McLean & Borden 1975). Em Xyleborini são as fêmeas as pioneiras (Francke-Grosmann 1975); em *X. saxeseni* a micângia se encontra na margem anterior do élitro, e o fungo da ambrosia é *Ambrosiella sulphurea* (Francke-Grosmann 1975), enquanto que em *X. pubescens* não se sabe nem a localização da micângia nem o fungo simbiote associado.

Baseando-se em todos os voláteis liberados de galerias das três espécies de Scolytidae, utilizou-se de análise de função discriminativa para caracterizá-las. Esta técnica estatística multivariada caracteriza-se por maximizar diferenças entre grupos, enquanto minimiza diferenças dentro de grupos (Schaefer & Hanover 1986). Usando desta técnica, verificou-se que a composição de voláteis liberados de galerias de machos, casais e/ou fêmeas dentro de cada espécie foi distinta entre si e respectivas testemunhas (Tab. 2 a 4). Ainda, os voláteis liberados de galerias de cada uma das espécies foram estatisticamente distintos entre si (Tab. 5).



Deve ser razoável supor que os voláteis liberados sejam resultado de uma combinação da capacidade de escavação de galerias, mecanismo de detoxificação de HM do besouro, mecanismo de detoxificação de HM dos microorganismos associados e autooxidação de HM (este teoricamente igual para todas as espécies). Considerando-se que as espécies têm portes distintos, número distinto de indivíduos por galeria (*Gnathotrichus* x *Xyleborini*) e aparentemente fungos distintos, seria de se esperar que a composição de voláteis liberados de suas galerias fosse distinta para cada espécie.

À exceção de machos de *G. materiarius*, de cujas galerias capturou-se sulcatol, que é o feromônio sexual presente em duas outras espécies, do mesmo gênero, *G. sulcatus* (Byrne et al. 1974) e *G. retusus* (Borden e McLean 1979), não se encontrou nenhum composto que pudesse indicar uma ação feromonal nas espécies *X. saxeseni* e *X. pubescens*. Fenchone é considerado um composto muito raro em besouros da casca, e um possível feromônio (Grégoire et al. 1992). Entretanto, ele foi encontrado sendo emanado de galerias de todas as três espécies estudadas de Scolytidae, e a abundância deste composto aumentou com o tempo (Figs. 2, 4 e 6), levando a crer que este não deva ser um composto feromonal.

À primeira vista, esperaria-se que feromônios de agregação estivessem ausentes ou raros em espécies de poligamia extrema, na qual somente um sexo está envolvido no ataque, como ocorre em *Xyleborini*, e até a presente data não se comprovou a existência dos mesmos nesta tribo. Entretanto, devido ao sistema (de determinação de sexo) nestas espécies ser haplo-diplóide, talvez fosse vantajoso a uma fêmea atrair “irmãs” a um local de desenvolvimento, para aumentar a ‘inclusive fitness’ destas; feromônios seriam um meio adequado de atração de parentes (Beaver 1977). No entanto, muito embora não se tivesse encontrado nenhum composto que apresentasse indicações de ser um feromônio potencial, isto não exclui a possibilidade de que as espécies estudadas de *Xyleborini* (ou



uma outra espécie qualquer dentro da tribo) os produzam. Certamente há a necessidade de mais estudos com espécies de besouros da ambrosia para elucidar esta questão.

7. CONCLUSÕES

Esta parece ser a primeira vez que se estuda a variação na composição de voláteis emitidos de galerias de besouros da ambrosia em sua fase inicial de ataque a árvores cortadas de pinos. Os resultados indicam que, no início do ataque, correspondentes aos primeiros 7 dias, predominam os HM. A abundância destes monoterpenos reduz-se ao longo do tempo, provavelmente devido a uma combinação de três fatores, a autooxidação dos monoterpenos e/ou sua detoxificação por besouros e/ou microorganismos associados. Os MO, presentes em concentrações inicialmente baixas, tem sua abundância aumentada com o progredir do ataque, marcadamente após o sétimo dia. Este aumento mais acentuado a partir da segunda semana de ataque aparenta coincidir com um maior desenvolvimento dos fungos simbioses nas paredes das galerias, além de uma possível ação detoxificadora adicional das larvas dos besouros. A análise conjunta dos voláteis liberados das galerias das três espécies estudadas permitiu mostrar que estes são distintos entre si, em função de uma possível ação diferenciada e combinada dos besouros e seus microorganismos associados. À exceção de *G. materiarius*, não se detectou de galerias de Xyleborini nenhum composto que pudesse indicar um possível feromônio de agregação, porém a possibilidade da existência destes não está descartada.



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amman, G. D., R. W. Thier, M. D. McGregor, e R. F. Schmitz. 1989. Efficacy of verbenone in reducing lodgepole pine infestation by mountain pine beetles in Idaho. *Can. J. For. Res.* 19: 60-64.
- Arbeitsgruppe Waldschutz. 1984. Überwachung und Bekämpfung von Borkenkäfer der Nadelbaumarten. AID, Bonn. (AID, 15)
- Atkinson, T.H., e A. Equihua-Martinez. 1986. Biology of bark and ambrosia beetles (Coleoptera: Scolytidae and Platypodidae) of a tropical rain forest in southeastern Mexico, with an annotated checklist of species. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 79: 414-423.
- Atkinson, T. H., e S. B. Peck. 1994. Annotated checklist of the bark and ambrosia beetles (Coleoptera: Platypodidae and Scolytidae) of tropical southern Florida. *Fl. Entomol.* 77: 313-329.
- Atkinson, T. H., R. J. Rabaglia, S. B. PECK, e J. L. FOLTZ. 1991. New records of Scolytidae and Platypodidae (Coleoptera) from the United States and Bahamas. *Col. Bull.* 45: 152-164.
- Bartelt, R. J. 1997. Calibration of a commercial solid-phase microextraction device for measuring headspace concentrations of organic volatiles. *Anal. Chem.* 69: 364-372.
- Batra, L. R. 1963a. Contributions to our knowledge of ambrosia fungi. II. *Endomycopsis fasciculata* nom. nov. (Ascomycetes). *Am. J. Bot.* 50: 481-487.
- Batra, L. R. 1963b. Ecology of ambrosia fungi and their dissemination by beetles. *Trans. Kans. Acad. Sci.* 66: 213-236.
- Batra, L. R. 1966. Ambrosia fungi: extent of specificity to ambrosia beetles. *Sci.* 153: 193-195.



- Batra, L. R. 1967. *Ambrosia* fungi: a taxonomic revision, and nutritional studies of some species. *Mycologia* 59: 976-1017.
- Beaver, R. A. 1977. Bark and ambrosia beetles in tropical forests, pp. 133-149. *In* BIOTROP Special Publication 2, Bogor.
- Beaver, R.A. 1988. Biological studies on ambrosia beetles of the Seychelles (Col., Scolytidae and Platypodidae). *Z. ang. Entomol.* 105: 62-73.
- Birgersson, G., e G. Bergström. 1989. Volatiles released from individual spruce bark beetle entrance holes; quantitative variations during the first week of attack. *J. Chem. Ecol.* 15: 2465-2483.
- Birgersson, G., e A. Leufvén. 1988. The influence of host tree response to *Ips typographus* and fungal attack on production of semiochemicals. *Insect Biochem.* 18: 761-770.
- Borden, J. H.; e J. A. McLEAN. 1979. Secondary attraction in *Gnathotrichus retusus* and cross-attraction of *G. sulcatus* (Coleoptera: Scolytidae). *J. Chem. Ecol.* 5: 79-88.
- Browne, F. G. 1958. Some aspects of host selection among ambrosia beetles in the humid tropics of South-East Asia. *Malay. For.* 21: 164-182.
- Browne, F. G. 1961. The biology of Malayan Scolytidae and Platypodidae. *Malay. For. Rec.* 22: 1-255.
- Browne, L. E. 1972. An emergence cage and refrigerated collector for wood-boring insects. *J. Econ. Entomol.* 65: 1499-1501.
- Bulgakov, A. H. 1988. [Terpene composition of the balsams of introduced *Pinus taeda* L., *P. maritima* Lamb., *P. strobus* L., *P. contorta* Dougl., in the USSR.] *Rastitel'nye Resursy* 24: 253-257.
- Byers, J. A. 1989. Chemical ecology of bark beetles. *Experientia.* 45: 271-283.



- Byers, J. A. 1995. Host-tree chemistry affecting colonization in bark beetles, pp. 154-213. In R. T. Cardé and W.J. Bell [eds.], Chemical Ecology of Insects 2. Chapman & Hall, New York/NY.
- Byers, J. A., B. S. Lanne, e J. Löfqvist. 1989. Host tree unsuitability recognized by pine shoot beetles in flight. *Experientia* 45: 489-192.
- Byrne, K. J., A. A. Swigar, R. M. Silverstein, J. H. Borden, e E. Stokkink. 1974. Sulcatol: population aggregation pheromone in the scolytid beetle, *Gnathotrichus sulcatus*. *J. Insect Physiol.* 20: 1895-1900.
- Chandra, A. 1981. Bioecology of wood destroying *Xyleborus* and their control (Insecta: Scolytidae). *Indian J. For.* 4: 286-289.
- Czerwiński, J., B. Zygmunt, e J. Namieśnik. 1996. Head-space solid phase microextraction for the GC-MS analysis of terpenoids in herb based formulations. *Fresenius J. Anal. Chem.* 356: 80-83.
- Drooz, A. T. 1985. Insects of Eastern Forests. USDA Misc. Publ. no. 1426, Washington, DC.
- Flechtmann, C. A. H., H. T. Z. Couto, C. L. Gaspareto, e E. Berti, F. 1995. Scolytidae em Reflorestamento com Pinheiros Tropicais. IPEF, Piracicaba.
- Flechtmann, C. A. H., M. J. Dalusky, e C. W. Berisford. 1999. Bark and ambrosia beetle (Coleoptera: Scolytidae) responses to volatiles from aging loblolly pine billets. *Environ. Entomol.* 28: 638-648.
- Flechtmann, C. A. H., A. L. T. Ottati, e C. W. Berisford. 2001. Ambrosia and bark beetles (Scolytidae: Coleoptera) in pine and eucalypt stands in southern Brazil. *For. Ecol. Manag.* 142: 183-191.
- Francke, V. 1988. Identification and synthesis of new pheromones. *Agric. Ecosyst. Environ.* 21: 21-33.
- Francke-Grosman, H. 1975. Zur epizoischen und endozoischen Übertragung der symbiotischen Pilze



- des Ambrosiakäfers *Xyleborus saxeseni* (Coleoptera: Scolytidae). Entomol. Gen. 1: 279-292.
- Gambliel, H. A., R. G. Cates, J. K. Caffey-Moquin, e T. D. Paine. 1985. Variation in the chemistry of loblolly pine in relation to infection by the blue-stain fungus, pp. 177-184. In Proceedings, Integrated Pest Management Symposium, 15-18 April 1985. USDA Forest Service, New Orleans.
- Gara, R. I., W. R. Littke, e D. F. Rhoades. 1993. Emission of ethanol and monoterpenes by fungal infected lodgepole pine trees. Phytochemistry 34: 987-990.
- Grégoire, J.C., M. Baisier, A. Drumont, D. L. Dahlsten, H. Meyer, e W. Francke. 1991. Volatile compounds in the larval frass of *Dendroctonus valens* and *Dendroctonus micans* (Coleoptera: Scolytidae) in relation to oviposition by the predator, *Rhizophagus grandis* (Coleoptera: Rhizophagidae). J. Chem. Ecol. 17: 2003-2019.
- Grégoire, J. C., D. Couillien, R. Krebber, W. A. König, H. Meyer, e W. Francke. 1992. Orientation of *Rhizophagus grandis* (Coleoptera: Rhizophagidae) to oxygenated monoterpenes in a species-specific predator-pray relationship. Chemoecology 3: 14-18.
- Gries, G., H. D. Pierce, Jr., B. S. Lindgren, e J. H. Borden. 1988. New techniques for capturing and analyzing semiochemicals for scolytid beetles (Coleoptera: Scolytidae). J. Econ. Entomol. 81: 1715-1720.
- Hamilton, W. D. 1967. Extraordinary sex ratios. Sci. 156: 477-488.
- Hughes, P. R. 1973. *Dendroctonus*: production of pheromones and related compounds in response to host monoterpenes. Z. angew. Entomol. 73: 294-312.
- Hunt, D. W. A., e J. H. Borden. 1990. Conversion of verbenols to verbenone by yeasts isolated from *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Scolytidae). J. Chem. Ecol. 16: 1385-1397.
- Hunt, D. W. A., J. H. Borden, B. S. Lindgren, e G. Gries. 1989. The role of autoxidation of α -pinene



- in the production of pheromones of *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Scolytidae). Can. J. For. Res. 19: 1275-1282.
- Kamp, H. J. 1979. Ein Beitrag zur Kenntnis von *Gnathotrichus materiarius* Fitch, der Adventivart aus Nordamerika (Col. Scolytidae). Mitt. Entomol. Verein Stuttgart 14: 57-66.
- Kelsey, R. G., e G. Joseph. 1997. Ambrosia beetle host selection among logs of douglas fir, western hemlock, and western red cedar with different ethanol and α -pinene concentrations. J. Chem. Ecol. 23: 1035-1051.
- Klimetzek, D., J. Köhler, J. P. Vité, e U. Kohnle. 1986. Dosage response to ethanol mediates host selection by "secondary" bark beetles. Naturwissenschaften 73: 270-272.
- Lanier, G. N. 1983. Integration of visual stimuli, host odorants, and pheromones by bark beetles and weevils in locating and colonizing host trees, pp. 161-171. In S. Ahmed [ed.], Herbivorous Insects, Host-Seeking Behavior and Mechanisms. Academic Press, New York/NY.
- Leufvén, A., G. Bergström, e E. Falsen. 1984. Interconversion of verbenols and verbenone by identified yeasts isolated from the spruce bark beetle *Ips typographus*. J. Chem. Ecol. 10: 1349-1361.
- Leufvén, A., e G. Birgersson. 1987. Quantitative variation of different monoterpenes around galleries of *Ps typographus* (Coleoptera: Scolytidae) attacking Norway spruce. Can. J. Bot. 65: 1038-1044.
- Lie, R., e A. Bakke. 1981. Practical result from the mass trapping of *Ips typographus* in Scandinavia, pp. 175-181. In E. R. Mitchell [ed.], Management of Insect Pests with Semiochemicals: Concepts and Practice. Plenum Press, New York, NY.
- Lindelöw Å., B. Risberg, e K. Sjödin. 1992. Attraction during flight of scolytids and other bark- and wood-dwelling beetles to volatiles from fresh and stored spruce wood. Can. J. For. Res. 22: 224-



- Liu, Y. B. e J. A. McLean. 1989. Field evaluation of responses of *Gnathotrichus sulcatus* and *G. retusus* (Coleoptera: Scolytidae) to semiochemicals. *J. Econ. Entomol.* 82: 1688-1690.
- Lockhart, L. A. 1990. Chemotaxonomic relationships within Central American closed-cone pines. *Silv. Genet.* 39: 173-184.
- Macconnell, J. G., J. H. Borden, R. M. Silverstein, e E. Stokkink. 1977. Isolation and tentative identification of lineatin, a pheromone from the frass of *Trypodendron lineatum* (Coleoptera: Scolytidae). *J. Chem. Ecol.* 3: 549-561.
- McLean, J.A., e J. H. Borden. 1975. *Gnathotrichus sulcatus* attack and breeding in freshly sawn lumber. *J. Econ. Entomol.* 68: 605-606.
- Moeck, H. A. 1970. Ethanol as the primary attractant for the ambrosia beetle *Trypodendron lineatum* (Coleoptera: Scolytidae). *Can. Entomol.* 102: 985-995.
- Nebeker, T. E., R. F. Schmitz, R. A. Tisdale, e K. R. Hobson. 1995. Chemical and nutritional status of dwarf mistletoe, Armillaria root rot, and Comandra blister rust infected trees which may influence tree susceptibility to bark beetle attack. *Can. J. Bot.* 73: 360-369.
- Noguera-Martinez, F. A., e T. H. Atkinson. 1990. Biogeography and biology of bark and ambrosia beetles (Coleoptera: Scolytidae and Platypodidae) of a mesic montane forest in Mexico, with an annotated checklist of species. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 83: 453-466.
- Norris, D. M. 1979. The mutualistic fungi of Xyleborini beetles, pp. 53-63. *In* Proceedings, Insect-Fungus Symbiosis, 27 August-3 September 1977. University of Florida, Tampa.
- Paine, T. D., K. F. Raffa, e T. C. Harington. 1997. Interactions among scolytid bark beetles, their associated fungi, and live host conifers. *Ann. Rev. Entomol.* 42: 179-206.



- Phillips, T. W., J. L. Nation, R. C. Wilkinson, e J. L. Foltz. 1989. Secondary attraction and field activity of beetle-produced volatiles in *Dendroctonus terebrans*. J. Chem. Ecol. 15: 1513-1533.
- Phillips, T. W., A. J. Wilkening, T. H. Atkinson, J. L. Nation, R. C. Wilkinson, e J. L. Foltz. 1988. Synergism of turpentine and ethanol as attractants for certain pine-infesting beetles (Coleoptera). Environ. Entomol. 17: 456-462.
- Postner, M. 1974. Scolytidae (=Ipidae), Borkenkäfer, pp. 334-482. In W. Schwenke [ed.], Die Forstschädlinge Europas, v. 2. Verlag Paul Parey, Hamburg.
- Prebble, M. L., e K. Graham. 1957. Studies of attack by ambrosia beetles in softwood logs on Vancouver Island, British Columbia. For. Sci. 3: 90-112.
- Samaniego, A., e R. I. Gara. 1970. Estudios sobre la actividad de vuelo y selección de huéspedes por *Xyleborus* spp. y *Platypus* spp. (Coleoptera: Scolytidae y Platypodidae). Turrialba 2: 471-477.
- SAS 1990. SAS/STAT user's guide, vol. 2. SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- Schaefer, P., e J. W. Hanover. 1986. Taxonomic implications of monoterpene compounds of blue and Engelmann spruces. For. Sci. 32: 725-734.
- Schroeder, L. M. 1992. Olfactory recognition of nonhosts aspen and birch by conifer bark beetles *Tomicus piniperda* and *Hylurgops palliatus*. J. Chem. Ecol. 18: 1583-1593.
- Snyder, M. A., B. Fineschi, Y. B. Linhart, e R. H. Smith. 1996. Multivariate discrimination of host use by dwarf mistletoe *Arceuthobium vaginatum* subsp. *cryptopodum*: inter- and intraspecific comparisons. J. Chem. Ecol. 22: 295-305.
- Sullivan, B. T., C. W. Berisford, e M. J. Dalusky. 1997. Field response of southern pine beetle parasitoids to some natural attractants. J. Chem. Ecol. 23: 837-856.
- Vanderwel, D., e A. C. Oehlschlager. 1987. Biosynthesis of pheromones and endocrine regulation



- of pheromone production in Coleoptera, pp. 175-215. In G. D. Prestwich and G. J. Blomquist [eds.], Pheromone Biochemistry. Academic Press, Orlando, FL.
- Werner, R. A. 1972. Aggregation behaviour of the beetle *Ips grandicollis* in response to host-produced attractants. J. Insect Physiol. 18: 423-437.
- Wood, S. L. 1982. The bark and ambrosia beetles of North and Central America (Coleoptera: Scolytidae): a taxonomic monograph. Great Basin Nat. Mem. 6: 1-1361.
- Yang, X., e T. Peppard. 1994. Solid-phase microextraction for flavor analysis. J. Agric. Food Chem. 42: 1925-1930.
- Zhang, Z., e J. Pawliszyn. 1993. Headspace solid-phase microextraction. Anal. Chem. 65: 1843-1852.



Tabela 1. Relação de monoterpenos, Scolytidae associados e fonte bibliográfica. Fenc: fencheno, pcim: p-cimeno, bact: acetato de bornila, born: borneol, fcho: fenchone, ipin: isopinocanfene, lina: linaloo, pc8o: p-cimeno-8-ol, pino: pinocanfene, terp: terpineno-4-ol, tpin: trans-pinocarveol.

	fenc	pcim	bact	born	feoh	fcho	ipin	lina	pc8o	pino	terp	tpin	fonte bibliográfica
frass de larvas de <i>Dendroctonus micans</i> e <i>Dendroctonus valens</i>				X	X	X	X		X	X			Grégoire et al. 1991
casca pino + larvas de <i>Dendroctonus frontalis</i>	X		X	X	X	X	X	X	X		X	X	Sullivan et al. 1997
frass <i>Ips pini</i>								X					Miller et al. 1991
galeria de <i>Ips typographus</i>			X	X							X	X	Leufvén & Birgersson 1987 Birgersson & Bergström 1989 Francke et al. 1995
microorganismos associados a <i>Ips typographus</i>				X									Birgersson & Leufvén 1988
proctodaeum de <i>Dendroctonus frontalis</i>											X	X	Hughes 1973
frass de ♀ de <i>Dendroctonus ponderosae</i>				X							X	X	Libbey et al. 1985
♀ de <i>Dendroctonus ponderosae</i>		X						X					Gries et al. 1990
♂ de <i>Polygraphus poligraphus</i>				X					X		X		Francke & Vité 1983 Schurig et al. 1985 Kohnle et al. 1985
♀ de <i>Scolytus scolytus</i>		X											Koutek et al. 2001



Tabela 2. Classificação (em %) do conjunto de voláteis liberados de orifícios de entrada de galerias de machos, fêmeas e casais de *Gnathotrichus materiarius* e orifícios artificialmente produzidos (testemunhas), em toras de *Pinus taeda* em laboratório.

	macho	fêmea	casal	testemunha
macho	60,38	33,96	3,77	1,89
fêmea	2,22	81,48	0,74	15,56
casal	5,88	14,71	79,41	----
testemunha	8,08	41,41	2,02	48,48

Tabela 3. Classificação (em %) do conjunto de voláteis liberados de orifícios de entrada de galerias de fêmeas de *Xyleborinus saxeseni* e orifícios artificialmente produzidos (testemunhas), em toras de *Pinus taeda* em laboratório.

	fêmea	testemunha
fêmea	90,24	9,76
testemunha	14,29	85,71



Tabela 4. Classificação (em %) do conjunto de voláteis liberados de orifícios de entrada de galerias de fêmeas de *Xyleborus pubescens* e orifícios artificialmente produzidos (testemunhas), em toras de *Pinus taeda* em laboratório.

	fêmea	testemunha
fêmea	81,36	18,64
testemunha	6,67	93,33

Tabela 5. Classificação (em %) do conjunto de voláteis liberados de orifícios de entrada de galerias de casais de *Gnathotrichus materiarius* (GM), e fêmeas de *Xyleborinus saxeseni* (XS) e *Xyleborus pubescens*, em toras de *Pinus taeda* em laboratório.

	GM	XP	XS
GM	91,18	8,82	----
XP	----	100,00	----
XS	----	----	100,00



LEGENDAS DAS FIGURAS

Fig. 1. Média (- EPM) da abundância relativa ao longo do tempo de voláteis liberados de galerias de casais, machos e testemunhas de *Gnathotrichus materiarius* infestando toras de *Pinus taeda* em laboratório. Médias diárias seguidas de * são estatisticamente superiores às dos demais dias ($P < 0,05$), dentro de cada combinação.

Fig. 2. Média (- EPM) da abundância relativa ao longo do tempo de voláteis liberados de galerias de casais, machos e testemunhas de *Gnathotrichus materiarius* infestando toras de *Pinus taeda* em laboratório. Médias diárias seguidas de * são estatisticamente superiores às dos demais dias ($P < 0,05$), dentro de cada combinação.

Fig. 3. Média (- EPM) da abundância relativa ao longo do tempo de voláteis liberados de galerias de fêmeas e testemunhas de *Xyleborinus saxeseni* infestando toras de *Pinus taeda* em laboratório. Médias diárias seguidas de * são estatisticamente superiores às dos demais dias ($P < 0,05$), dentro de cada combinação.

Fig. 4. Média (- EPM) da abundância relativa ao longo do tempo de voláteis liberados de galerias de fêmeas e testemunhas de *Xyleborinus saxeseni* infestando toras de *Pinus taeda* em laboratório. Médias diárias seguidas de * são estatisticamente superiores às dos demais dias ($P < 0,05$), dentro de cada combinação.



Fig. 5. Média (- EPM) da abundância relativa ao longo do tempo de voláteis liberados de galerias de fêmeas e testemunhas de *Xyleborus pubescens* infestando toras de *Pinus taeda* em laboratório. Médias diárias seguidas de * são estatisticamente superiores às dos demais dias ($P < 0,05$), dentro de cada combinação.

Fig. 6. Média (- EPM) da abundância relativa ao longo do tempo de voláteis liberados de galerias de fêmeas e testemunhas de *Xyleborus pubescens* infestando toras de *Pinus taeda* em laboratório. Médias diárias seguidas de * são estatisticamente superiores às dos demais dias ($P < 0,05$), dentro de cada combinação.

Fig. 7. Média (- EPM) da abundância relativa ao longo do tempo de derivados do fenil propanol, hidrocarbonetos monoterpênicos e monoterpênicos oxigenados liberados de galerias de casais, machos e testemunhas de *Gnathotrichus materiarius* infestando toras de *Pinus taeda* em laboratório. Médias diárias seguidas de * são estatisticamente superiores às dos demais dias ($P < 0,05$), dentro de cada combinação.

Fig. 8. Média (- EPM) da abundância relativa ao longo do tempo de derivados do fenil propanol, hidrocarbonetos monoterpênicos e monoterpênicos oxigenados liberados de galerias de fêmeas e testemunhas de *Xyleborinus saxeseni* e *Xyleborus pubescens* infestando toras de *Pinus taeda* em laboratório. Médias diárias seguidas de * são estatisticamente superiores às dos demais dias ($P < 0,05$), dentro de cada combinação.

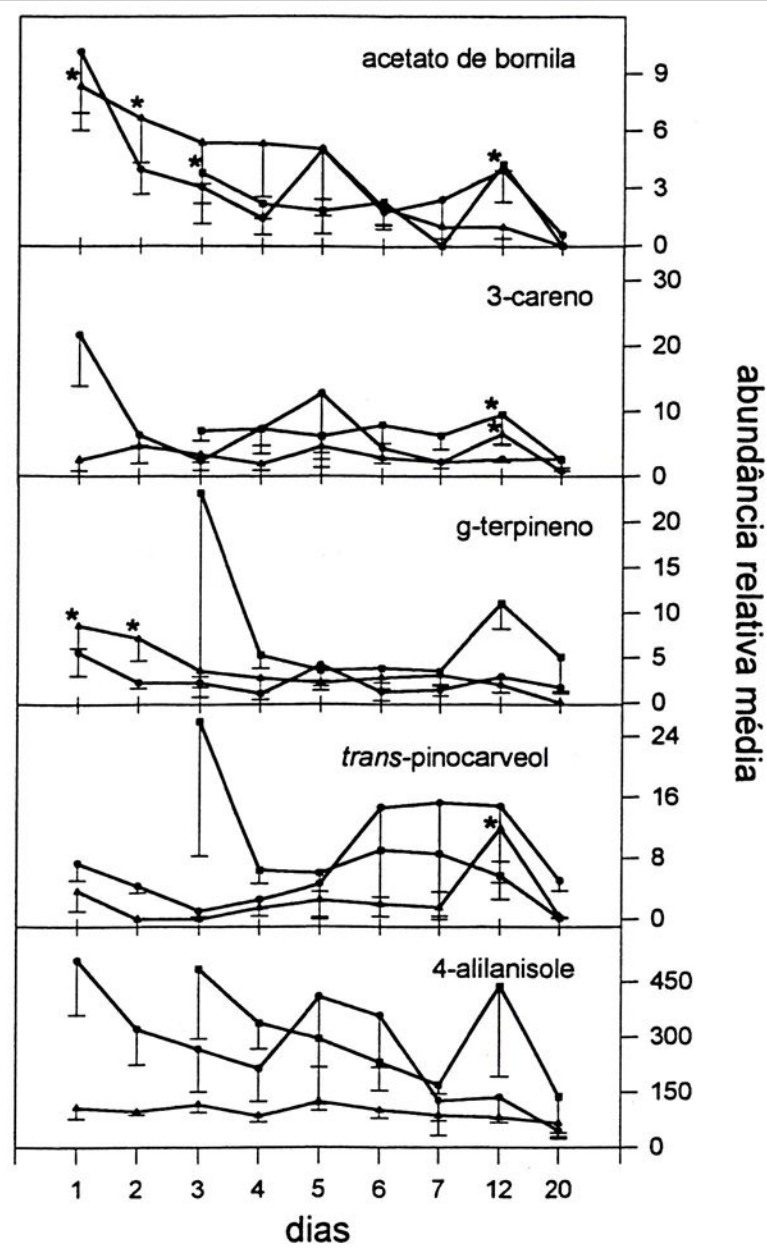
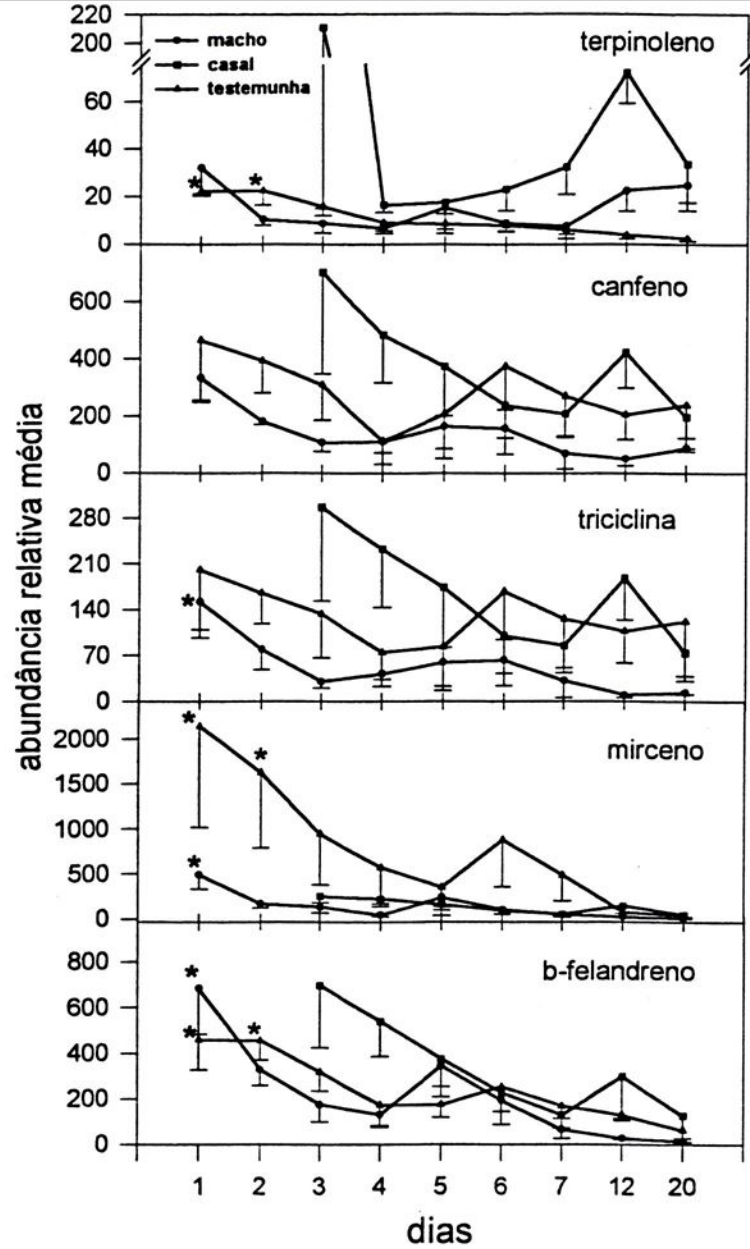


Fig.9. Comparação de médias (+ EPM) de emissão total de voláteis de galerias de casais, machos e testemunhas de *Gnathotrichus materiarius* (dias 1 a 7, 12 e 20 de ataque) infestando toras de *Pinus taeda* em laboratório. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, dentro de cada volátil. Ater: α -terpineno, bact: acetato de bornila, fcho: fenchone, lina: linalool, verb: verbenone, t4ol: terpineno-4-ol, tpin: trans-pinocarveol, pino: pinocanfene, gter: γ -terpineno, car3: 3-careno, terp: terpinoleno, ipin: isopinocanfene, pcym: p-cimeno, fen: fencheno, etoh: etanol, bphe: β -felandreno, aany: 4-alilanosile, camp: canfeno, myrc: mirceno, tric: triciclina.

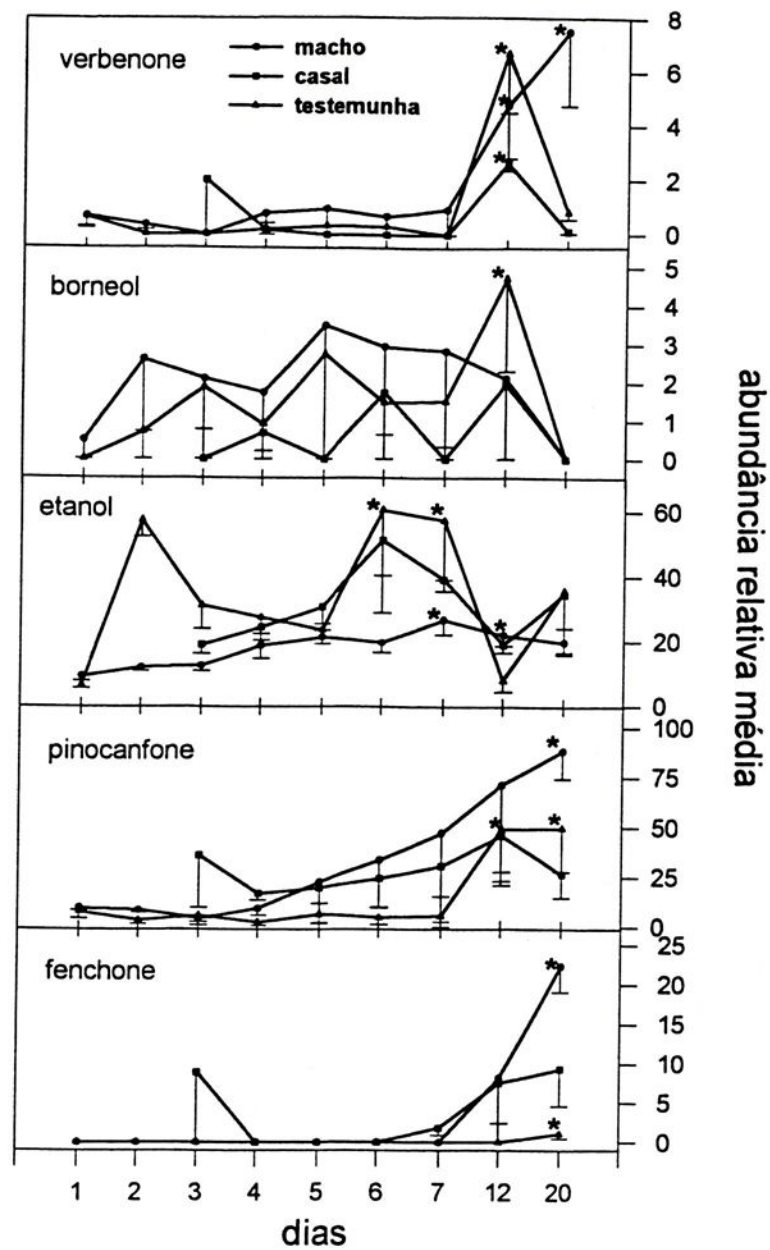
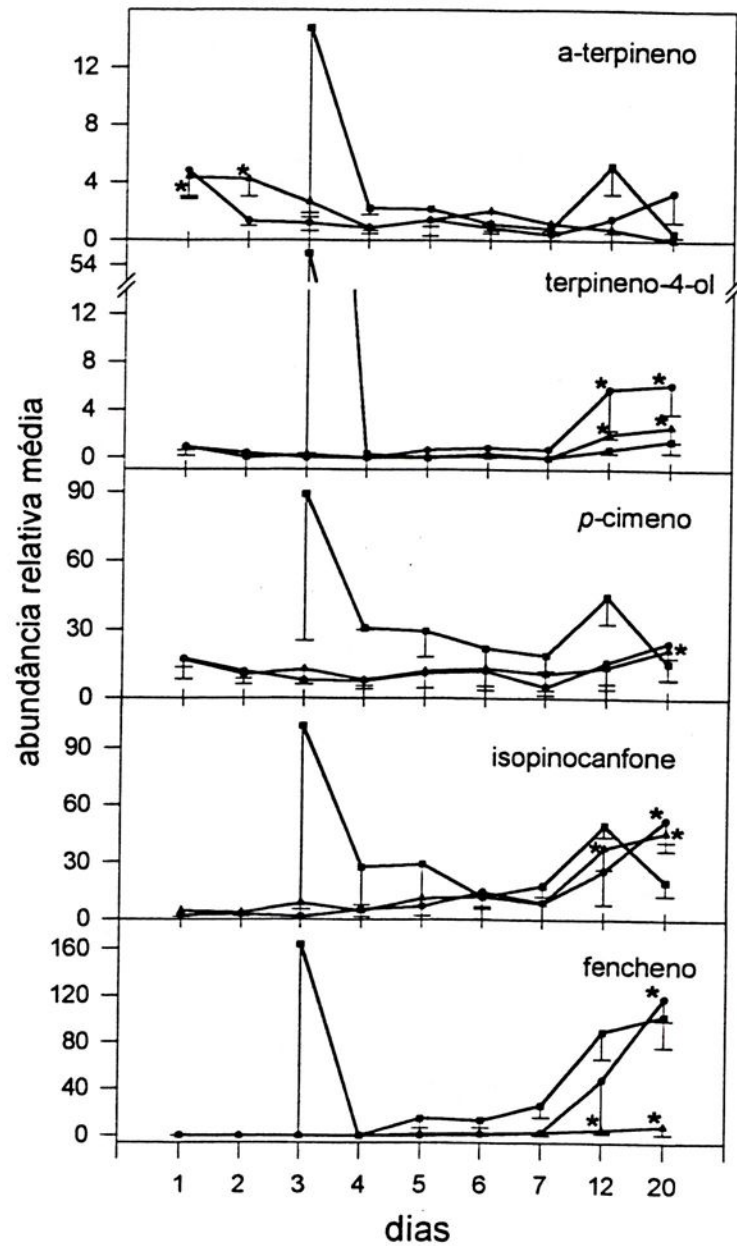
Fig.10. Comparação de médias (+ EPM) de emissão total de voláteis de galerias de fêmeas e testemunhas de *Xyleborinus saxeseni* (dias 1 a 6 e 14 de ataque) infestando toras de *Pinus taeda* em laboratório. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, dentro de cada volátil. Simbologia dos voláteis: vide Fig. 9.

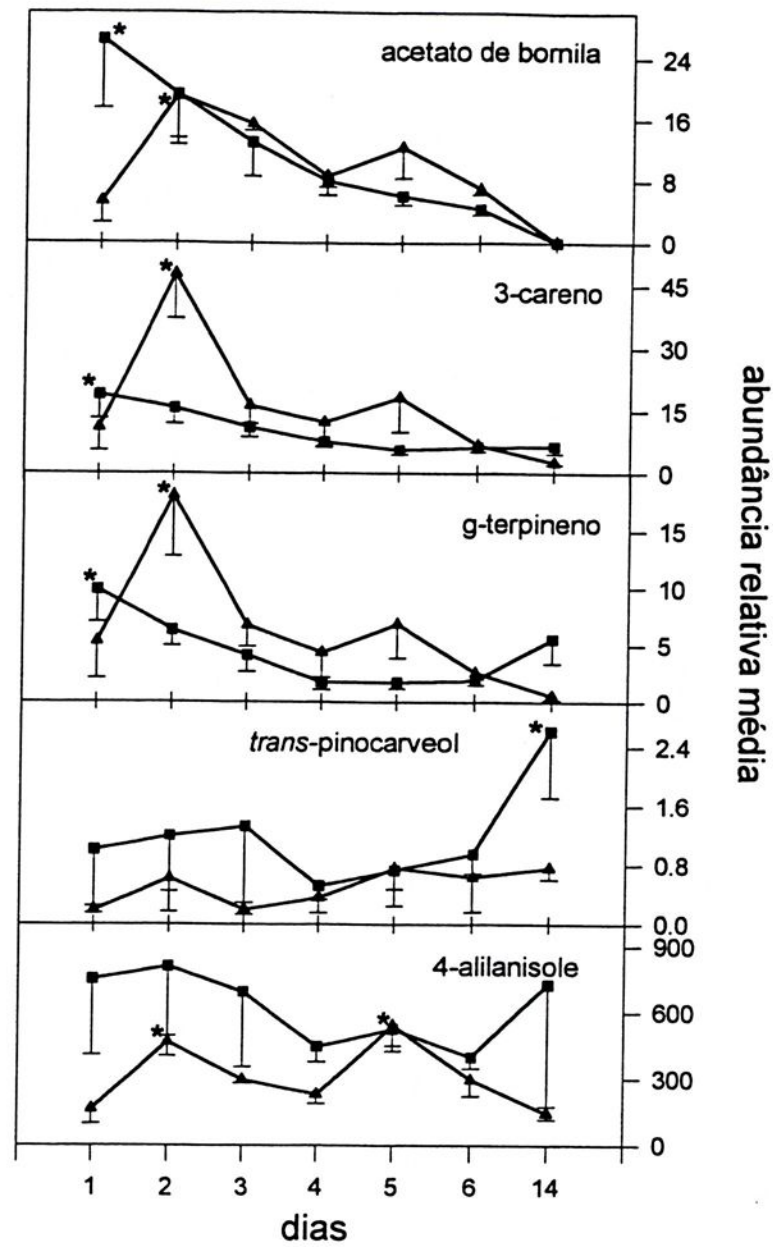
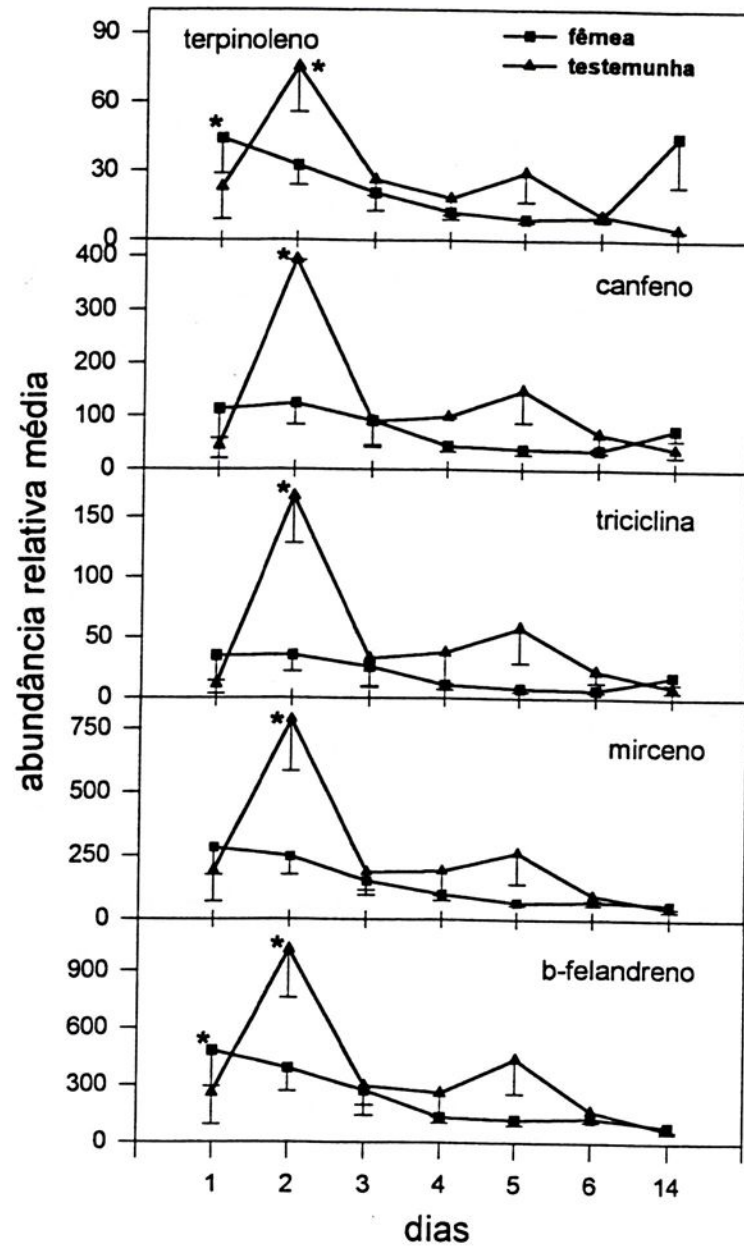
Fig.11. Comparação de médias (+ EPM) de emissão total de voláteis de galerias de fêmeas e testemunhas de *Xyleborus pubescens* (dias 1 a 6 de ataque) infestando toras de *Pinus taeda* em laboratório. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, dentro de cada volátil. Simbologia dos voláteis: vide Fig. 9.



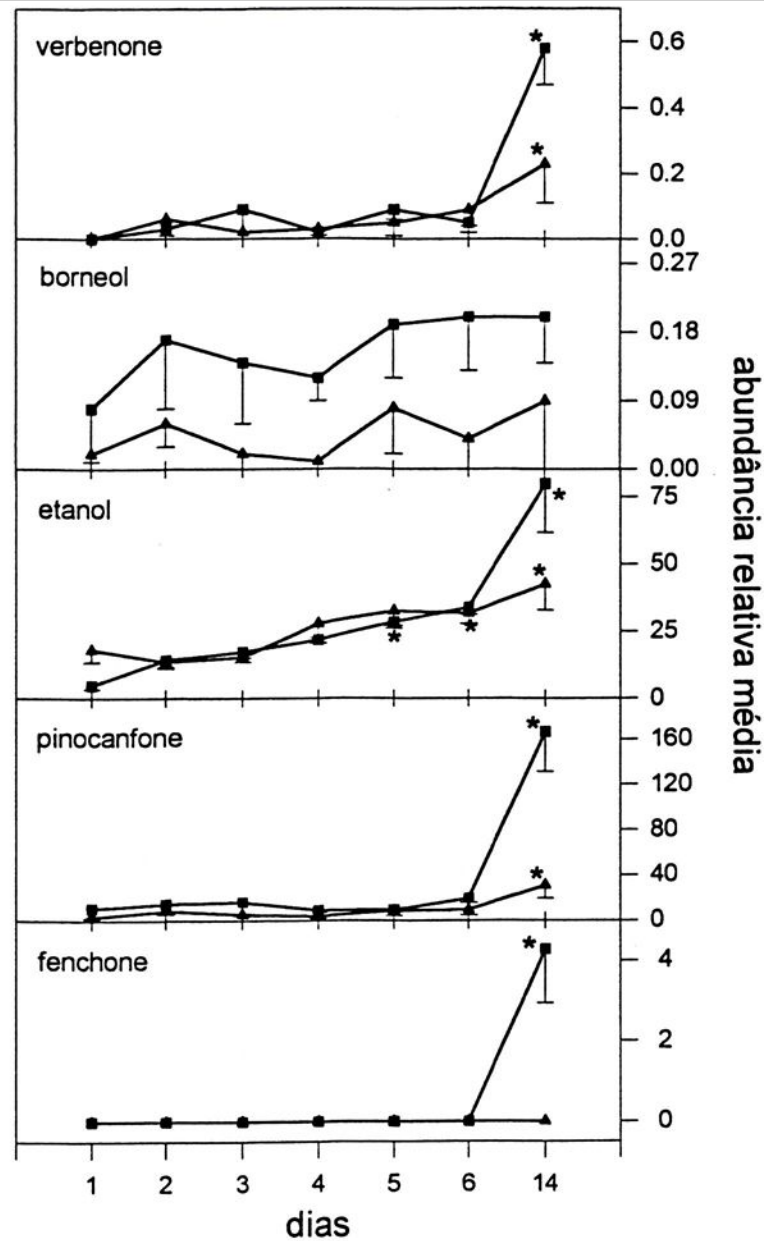
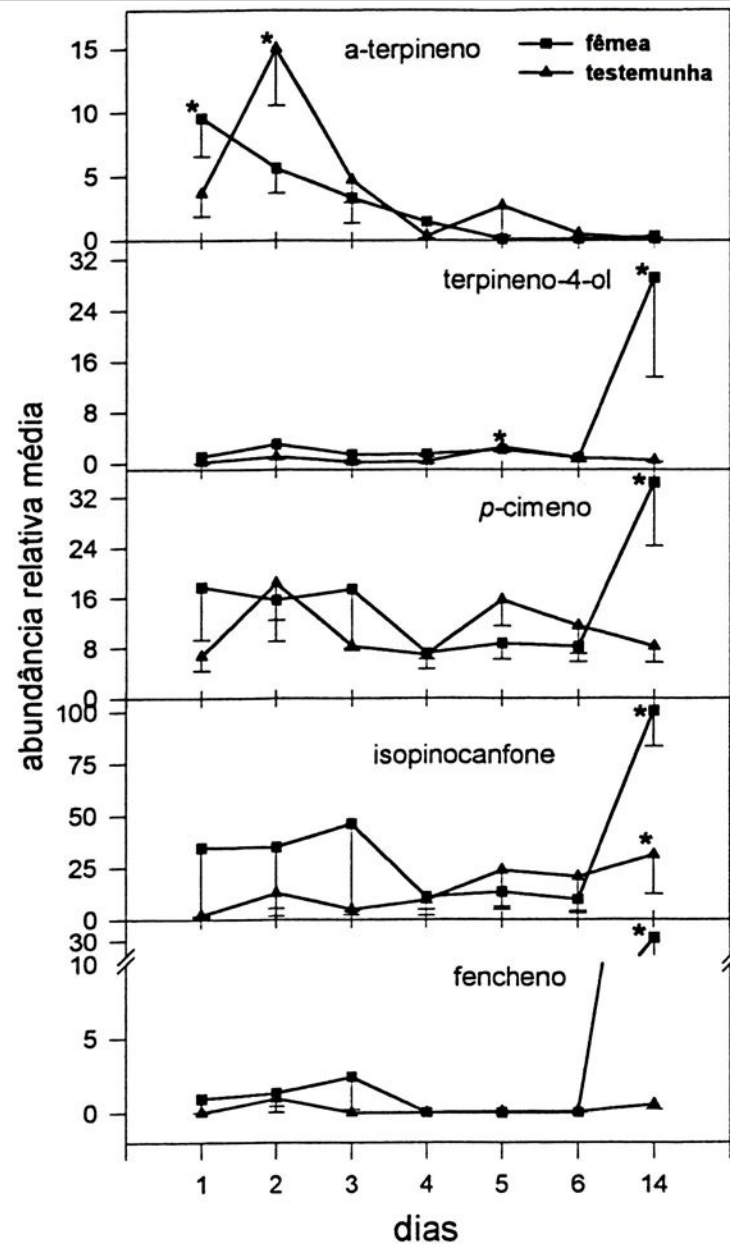


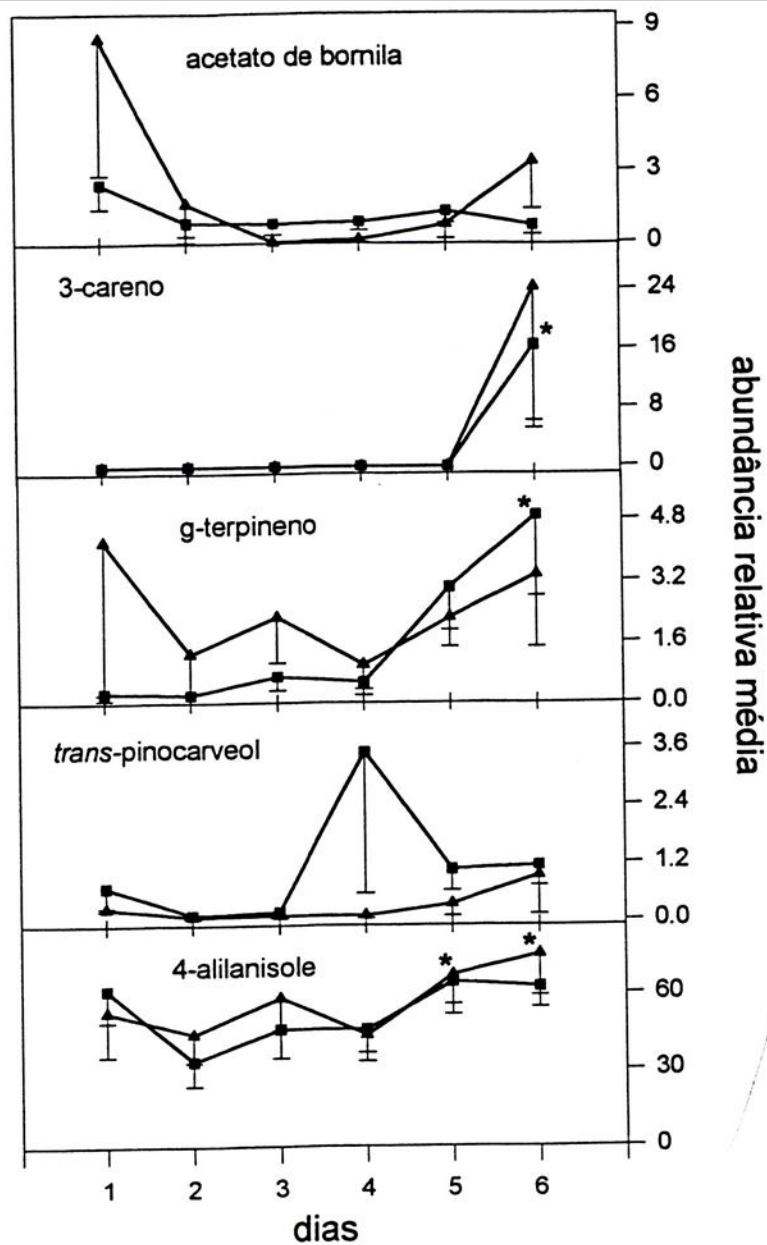
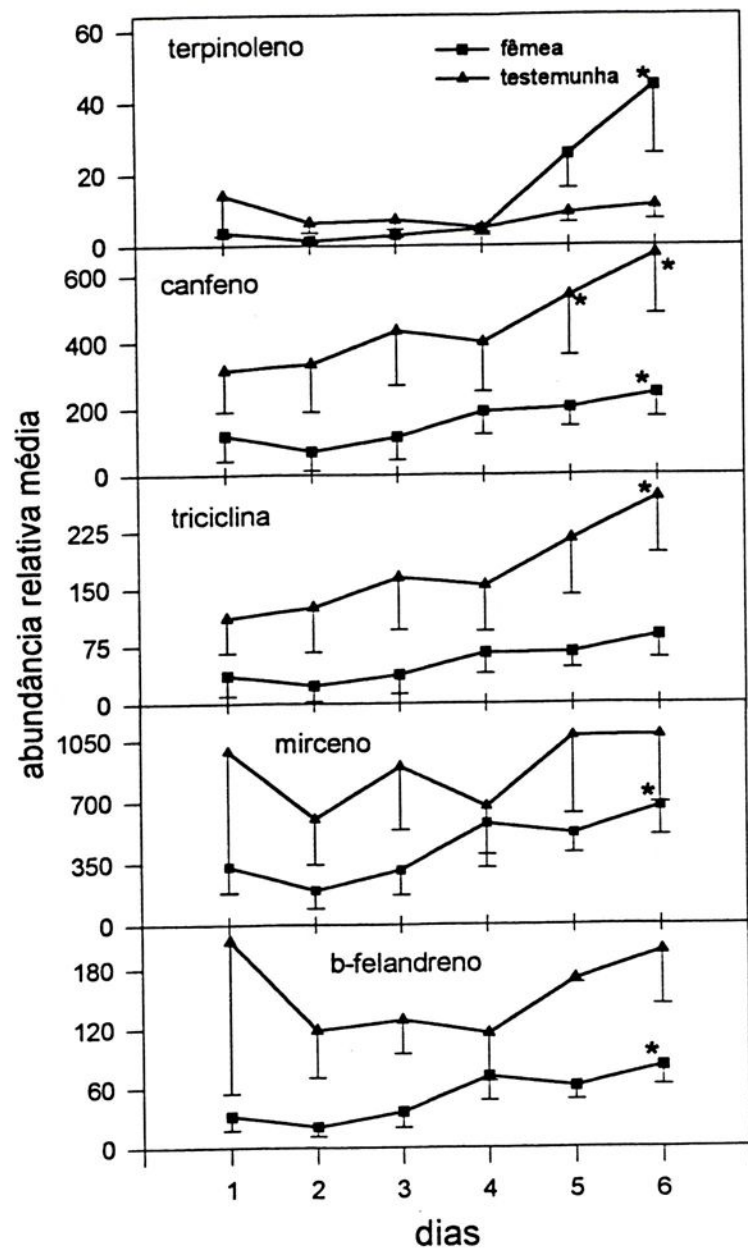
Livre-Docência Flechtmann 42

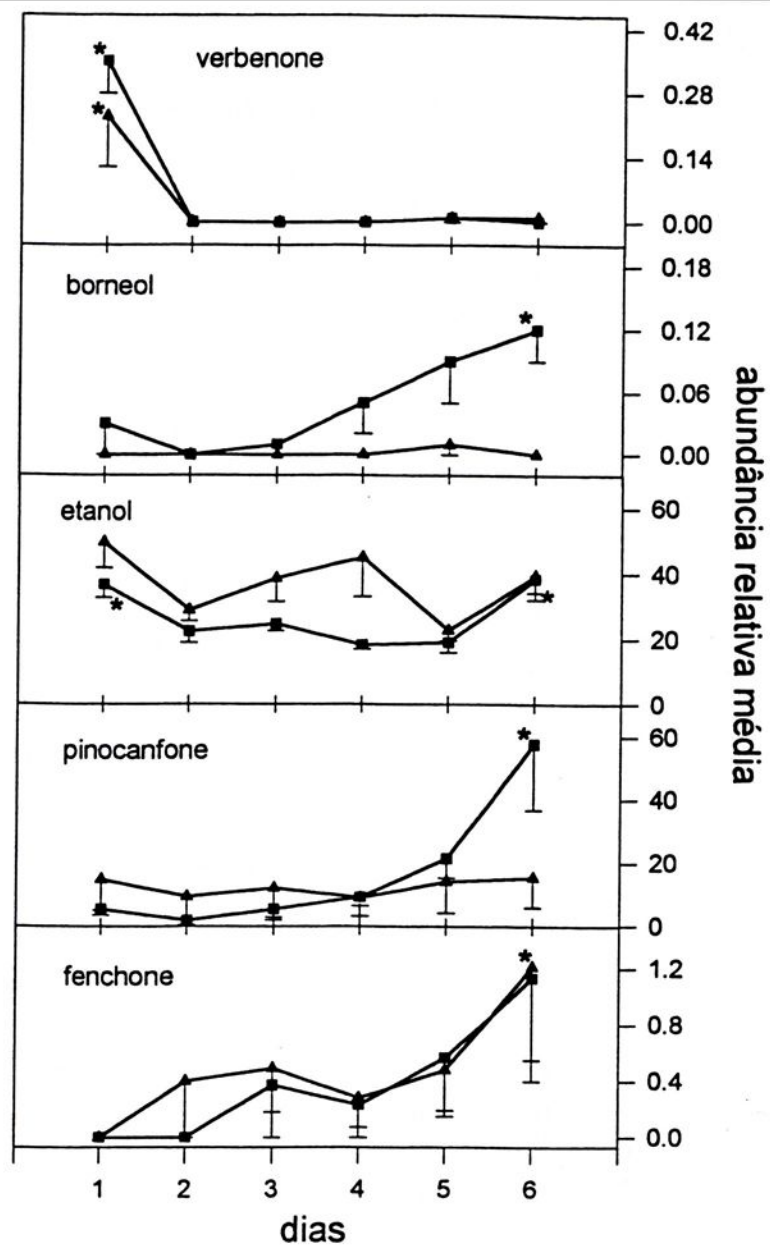
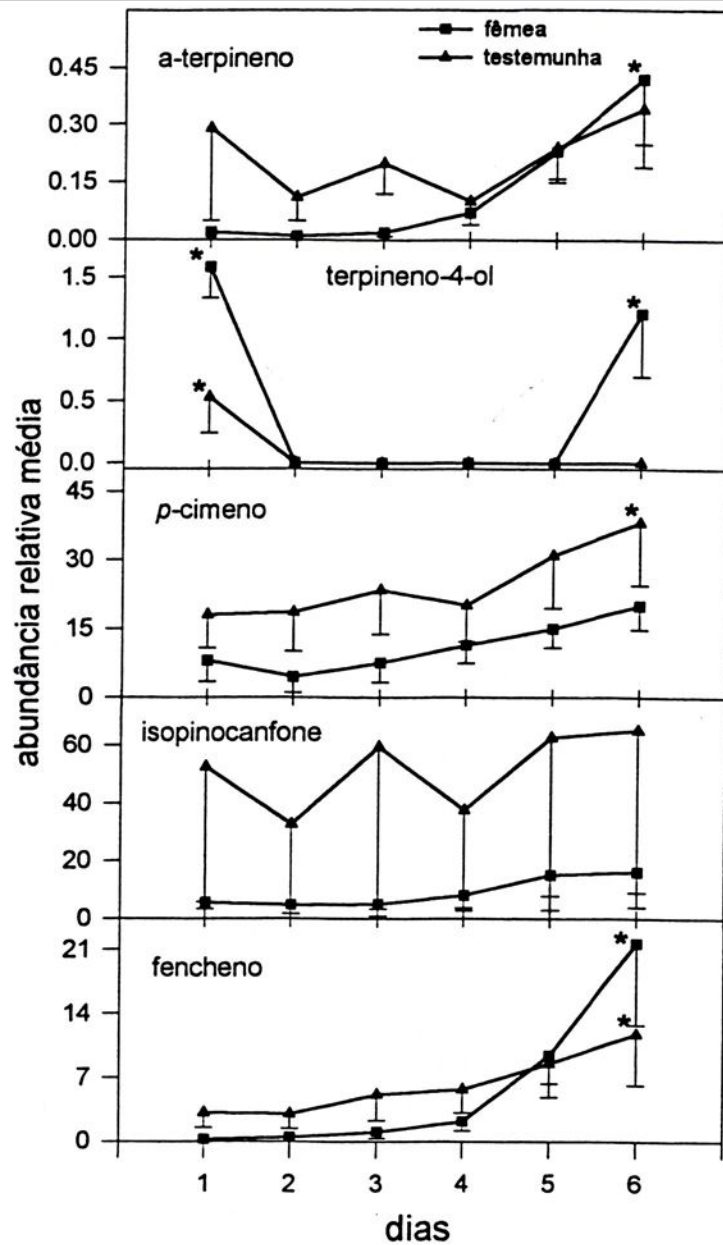


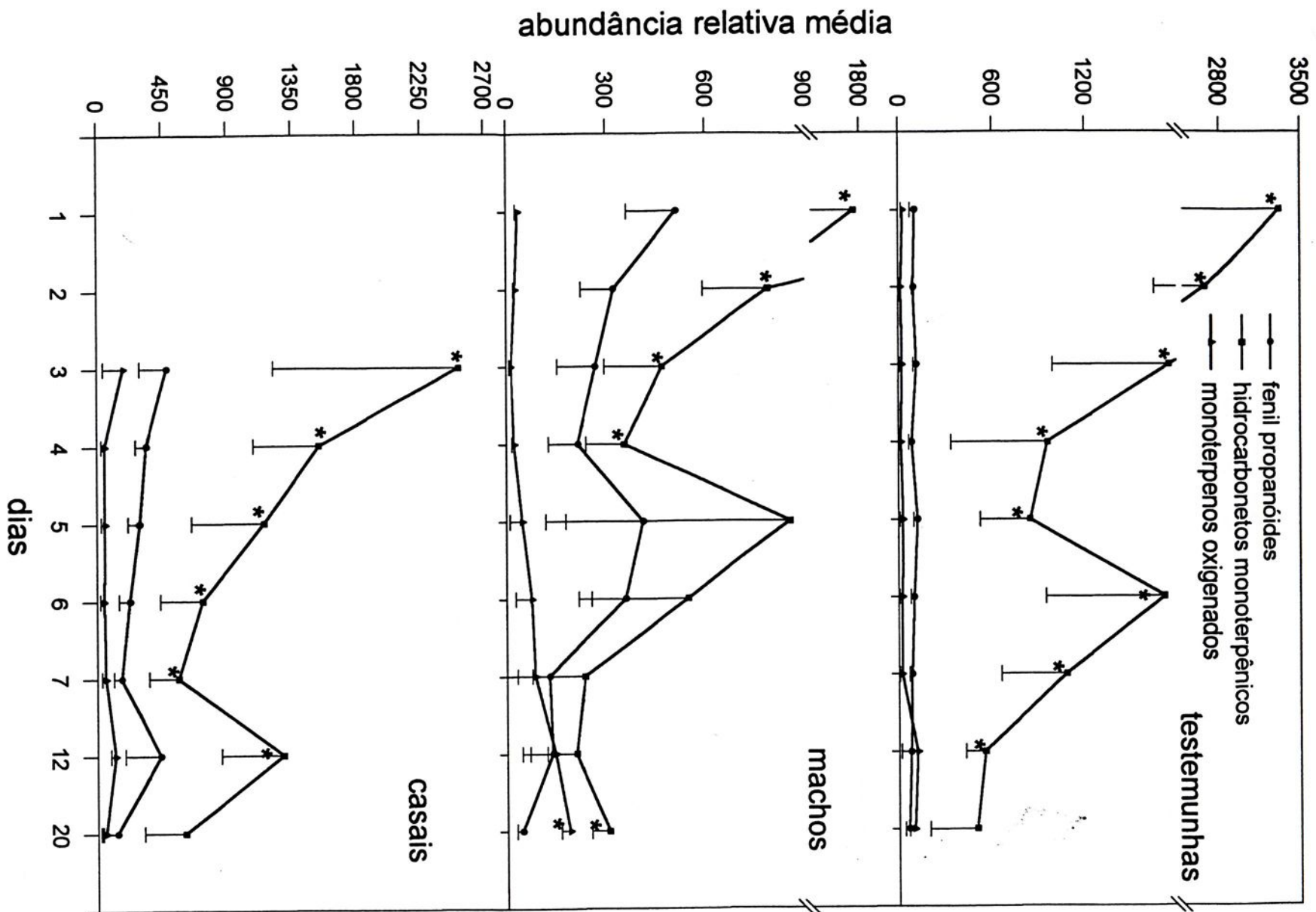


Livre-Docência Flechtmann 44

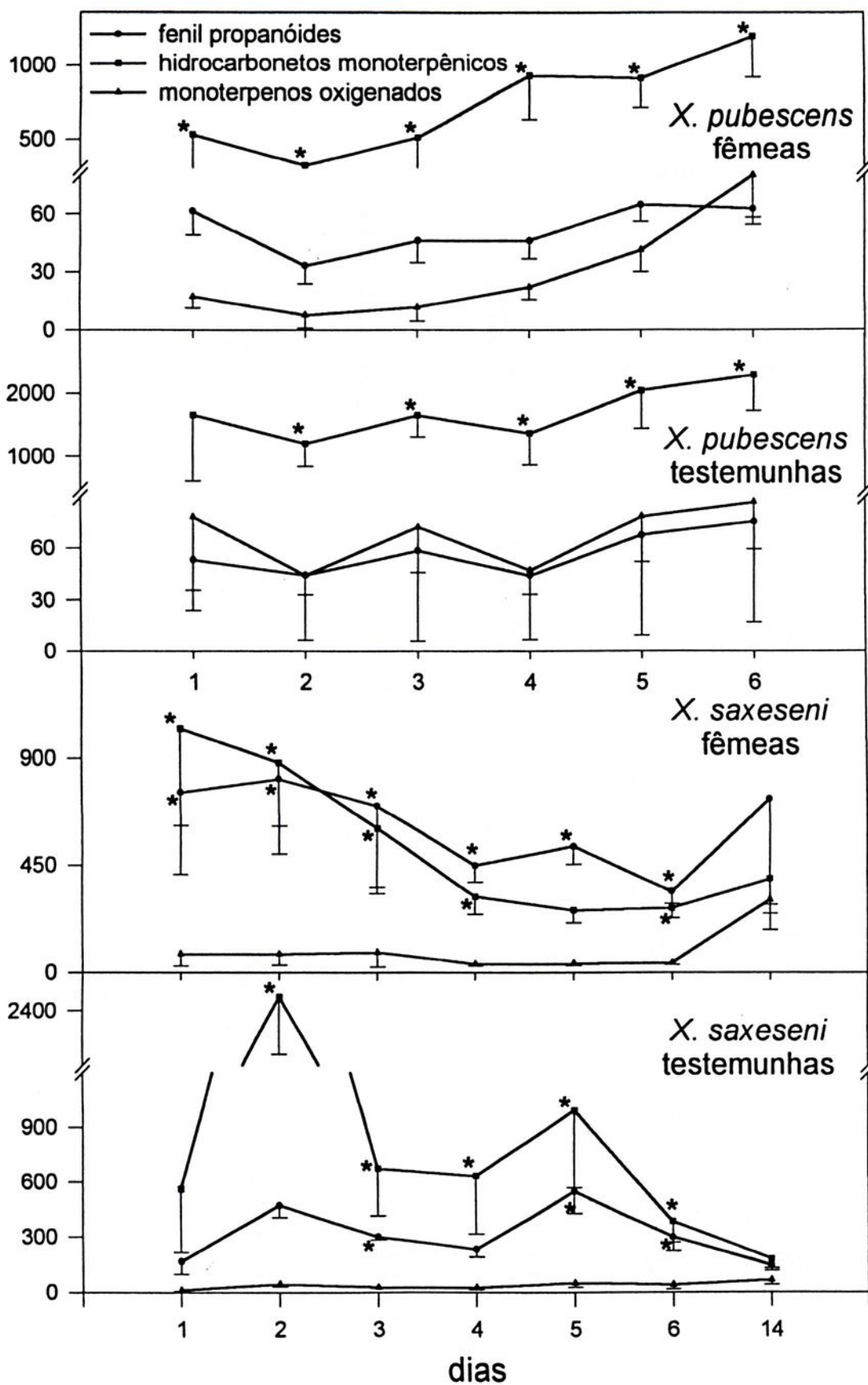




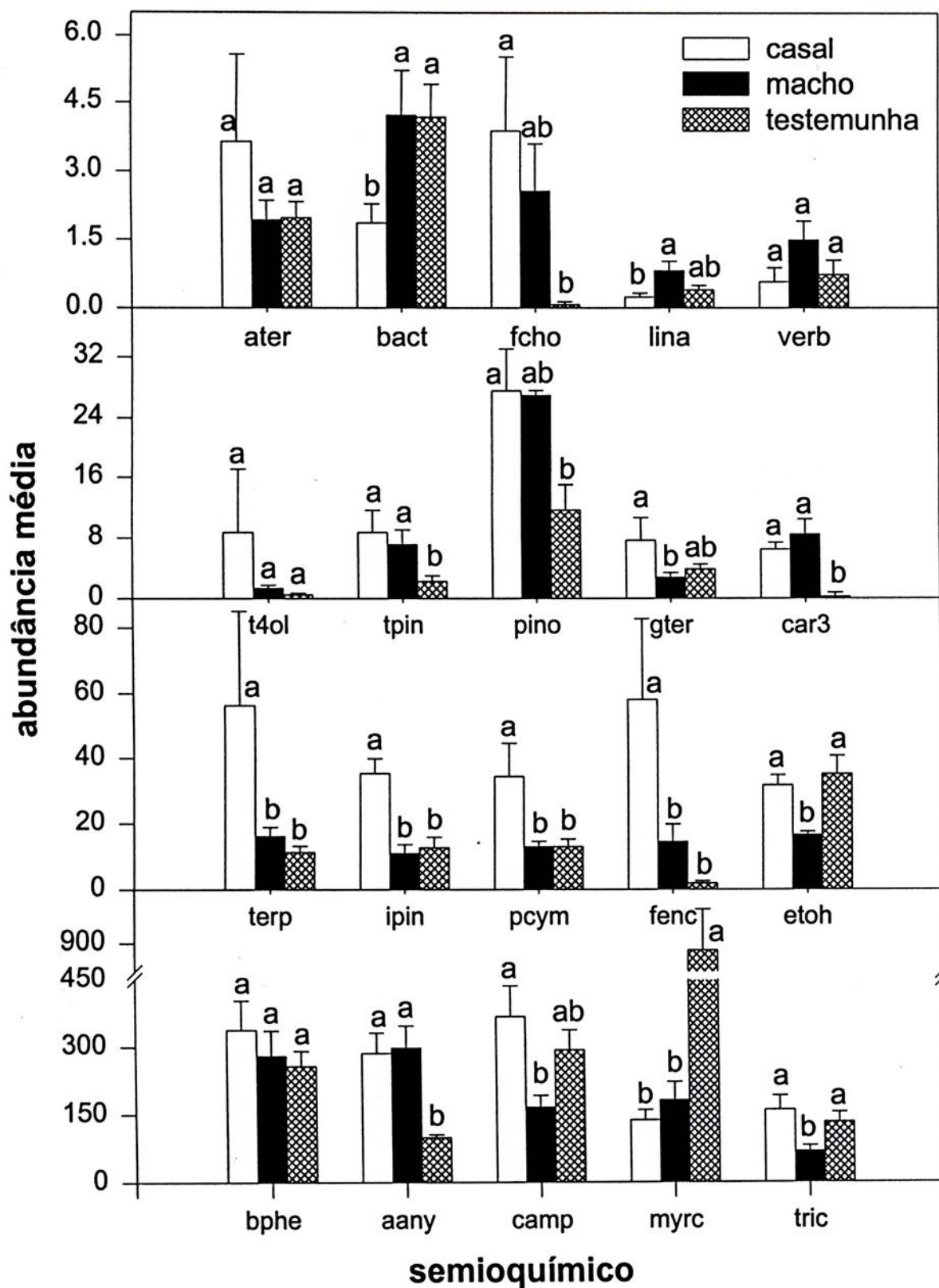




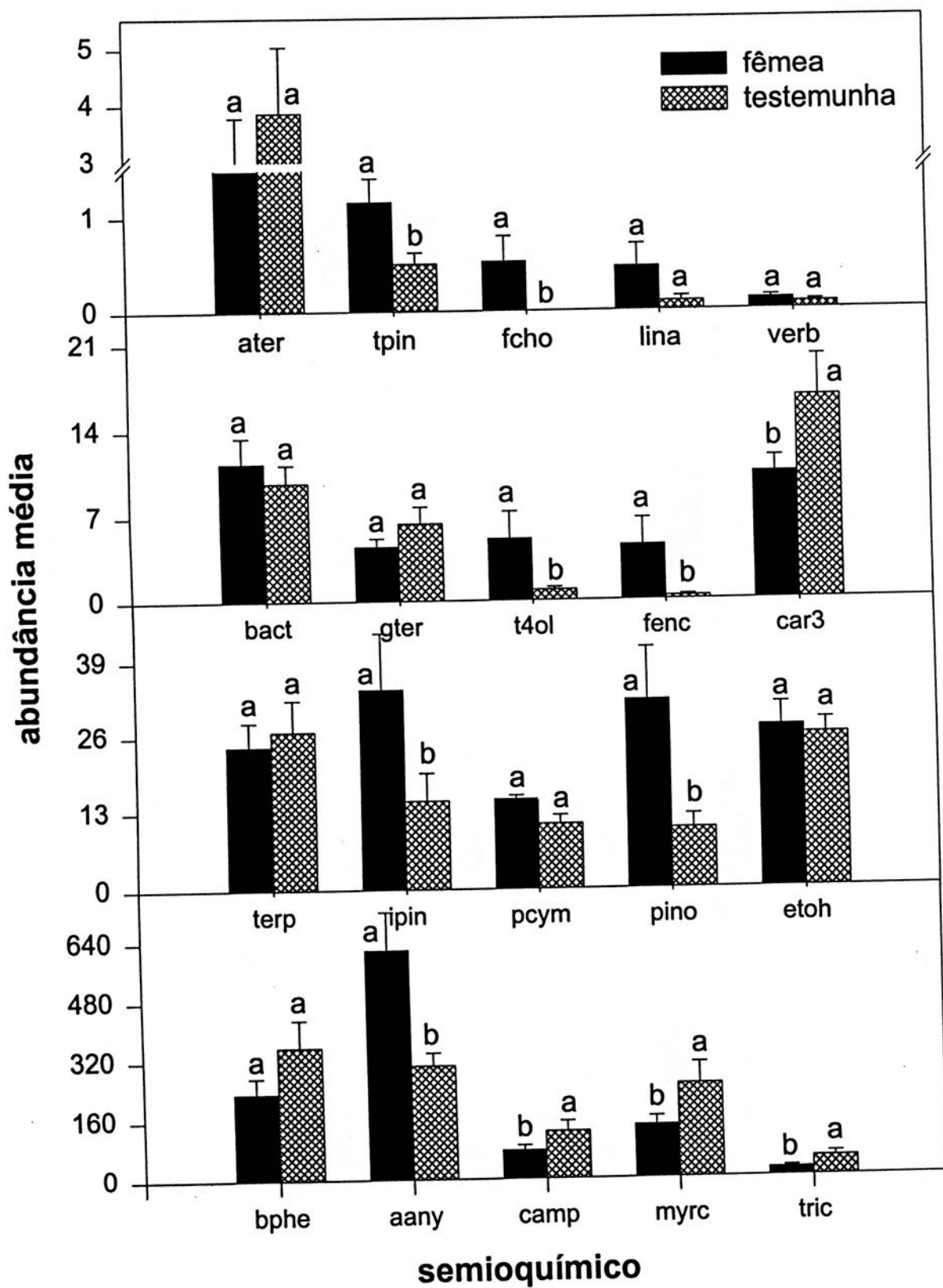
abundância relativa média



Livre-Docência Flechtmann 49



Livre-Docência Flechtmann 50



Livre-Docência Flechtmann 51

