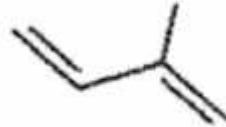
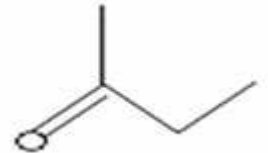
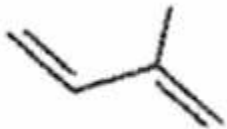


Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisa René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde



**Sinais químicos envolvidos no comportamento sexual de
Rhodnius prolixus Stål, 1859 (Hemiptera, Reduviidae)**

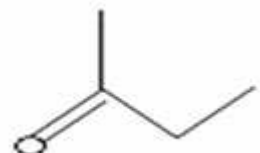
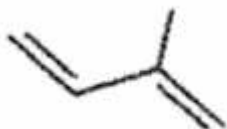
por



Gina Barcelos Pontes



Belo Horizonte
Fevereiro, 2007



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisa René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**Sinais químicos envolvidos no comportamento sexual de
Rhodnius prolixus Stål, 1859 (Hemiptera, Reduviidae)**

por

Gina Barcelos Pontes

Dissertação apresentada com vistas à
obtenção do Título de Mestre em Ciências
na área de concentração, Doenças
Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Dr. Marcelo Gustavo Lorenzo

Belo Horizonte
Fevereiro de 2007



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa René Rachou

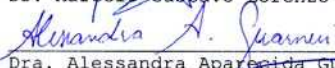
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Ata da trigésima defesa de dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da aluna Gina Barcelos Pontes, sob a orientação do Dr. Marcelo Gustavo Lorenzo.

Aos quinze dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e sete, às quatorze horas, realizou-se no auditório do Centro de Pesquisa René Rachou, o exame da trigésima dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisa René Rachou/FIOCRUZ, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias. A dissertação da aluna Gina Barcelos Pontes intitula-se "Sinais químicos envolvidos no comportamento sexual de *Rhodnius prolixus* Stal 1859 (Heteroptera / Reduviidae)". A banca examinadora foi constituída pelos professores: Dr. Marcelo Gustavo Lorenzo CPqRR/FIOCRUZ (orientador e presidente da banca), Dra. Alessandra Aparecida Guarneri - CPqRR/FIOCRUZ (membro titular), Dr. José Roberto Trigo - UNICAMP (membro titular) e Dra. Liléia Gonçalves Diotaiuti - CPqRR/FIOCRUZ (membro suplente). Após arguir a aluna e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização na apresentação dos dados, a Banca Examinadora assim se pronunciou: De acordo com o regulamento do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, a aluna foi considerada APROVADA. Uma vez encerrado o exame, eu, Marcelo Gustavo Lorenzo, presidente da Banca, assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora. Belo Horizonte, quinze de fevereiro de dois mil e sete.



Dr. Marcelo Gustavo Lorenzo



Dra. Alessandra Aparecida Guarneri



Dr. José Roberto Trigo

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas- Centro de Pesquisas René Rachou, sob orientação do Dr. Marcelo Gustavo Lorenzo, pesquisador titular, e colaborações do Dr. Rikard Unellius, professor da Universidade de Kalmar/Suécia e Lic. Björn Bohman, estudante de doutorado da Universidade de Kalmar/Suécia.

“... as pessoas podiam fechar os olhos diante da grandeza, do assustador, da beleza, e podiam tapar os ouvidos diante da melodia ou de palavras sedutoras. Mas não podiam escapar ao aroma. Pois o aroma é o irmão da respiração. Com esta, ele penetra nas pessoas, elas não podem escapar-lhe caso queiram viver. E bem para dentro delas é que vai o aroma, diretamente para o coração, distinguindo lá categoricamente entre atração e menosprezo, nojo e prazer, amor e ódio. Quem dominasse os odores dominaria o coração das pessoas.”

Patrick Süskind

O Perfume

Aos meus pais,
Às minhas irmãs.

AGRADECIMENTOS

É difícil expressar o sentimento de gratidão em meras folhas de papéis. Sinto neste momento uma sensação de vazio que misturada à realização deste trabalho me faz acreditar que saio com mais dúvidas do que certezas. E é justamente por isso que a pesquisa se tornou algo fascinante na minha vida. Sempre busquei algo que me desafiasse, que me instigasse a ir mais longe, que me tirassem algumas, somente algumas, noites de sono... E que me fizesse, acima de tudo, acreditar na minha escolha. Este é o sentimento que tenho agora... Amor, amor naquilo que faço e que pretendo fazer por muito tempo!

O que torna este trabalho humano e satisfatório são as pessoas que fizeram parte dele. É justamente neste momento que esqueço todas as análises, gráficos e referências que fazem parte deste estudo e volto meu coração para o resultado mais precioso que eu tenho: os amigos, o amor e o companheirismo que eu conquistei e que nenhum membro da banca é capaz de me dizer: Este resultado não é significativo! Eu sinto que é... E assim, eu agradeço imensamente a todos.

Ao meu orientador Dr. Marcelo Gustavo Lorenzo, por confiar no meu trabalho, acreditar em mim e acima de tudo por entender e respeitar todos os meus momentos. Para mim é um prazer trabalhar com você!

À Dra. Liléia Diotaiuti, pessoa excepcional, humana. Sempre nos incentivando a conduzir a vida e o trabalho de forma ética, sem perder a alegria.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Alessandra Guarneri, Dr. José Trigo e Dra. Liléia Diotaiuti, por dedicarem seu tempo à leitura deste trabalho.

À Raquel, irmã de coração, amiga, companheira. Você torna as minhas horas de trabalho mais emocionantes e alegres.

À Ana, pela ajuda incondicional e por longas horas de discussão sobre o nosso trabalho. Aprendi com você a importância da palavra “por quê?”

À Angélica, você para mim é uma lição de vida!

Ao Theo, meu pequeno, grande amigo. Muito obrigada pelos bons momentos que passamos juntos.

Às minhas pequenas e lindas amigas, Grasi, Thessa e Silvia Basques. É sempre um prazer estar ao lado de vocês. Vocês são muito fofas.

À Maria Inês, pela constante ajuda nos serviços burocráticos e pelas boas risadas que tenho diante dos seus e-mails.

Aos demais amigos e companheiros do Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas, Fernando, Alessandra, Dr. João Carlos, Evandro, João Paulo, Carlota, Marcos, D. Maria, Silvia Ermelinda, Ivan, Diogo, Kelly, Auffy, Alexandre, Ademilson e Rita pelo grande carinho e atenção.

Aos colegas do Laboratório de Química de Produtos Naturais, Carlos Zani, Tânia Alves, Márcia Rodrigues, Luiz Henrique Rosa, Marcio Akira Couceiro, Elaine Fagundes, Rodrigo Leite, Ezequias Pessoa de Siqueira Filho, Eliandra Soares Lopes, Betania Barros Cota, Fernanda Fraga Campos, Susana Johann, Carolina Paula de Souza, Samanta Marengo e Vivian Nicolau Gonçalves.

Ao Dr. Ezequias Pessoa de Siqueira Filho pelas incansáveis ajudas no GC-MS.

Aos pesquisadores Dr. Rikard C. Unelius e Björn Bohman pelo auxílio na identificação dos compostos das glândulas.

Ao Instituto René Rachou e CAPES pelo suporte financeiro.

Ao Segemar pelo suporte na pesquisa bibliográfica.

Aos colegas da pós-graduação, em especial ao Fernando e a Patrícia pelo companheirismo.

À pós-graduação, em especial as secretárias Cris e Neide, pela constante ajuda e apoio.

Ao Bê, pelos inesquecíveis anos de amizade, companheirismo e carinho.

E finalmente, aos meus pais, pela luz. Minhas irmãs Kely, Pati e Tchan por me mostrarem o caminho e caminharem comigo.

RESUMO

Rhodnius prolixus é o principal vetor da doença de Chagas no norte da América do Sul e na América Central. Triatomíneos adultos possuem um par de glândulas metasternais (GM) localizadas no metatórax ventral. Alguns estudos discutem a participação das GMs na comunicação sexual em triatomíneos. Até o momento, a função das GMs de *R. prolixus*, assim como a identidade de suas secreções são desconhecidas. Assim, o objetivo deste estudo foi identificar os compostos presentes nas GMs de *R. prolixus*, bem como estudar o envolvimento destes compostos no contexto sexual desta espécie. Para isso, foram feitas análises químicas do conteúdo das GMs, utilizando SPME e CG-EM. Posteriormente, foram feitas análises químicas dos voláteis emitidos por casais em cópula. A emissão espontânea de voláteis em adultos virgens também foi caracterizada. Foram identificados 12 compostos nas GMs, sendo estes cetonas e álcoois. Os mesmos compostos foram encontrados nas glândulas de ambos os sexos. Em 70% das cópulas realizadas foi encontrado pelo menos um composto das GMs, sendo que o principal composto (2-metil-3-buten-2-ol) foi detectado em 40% das cópulas. As fêmeas emitiram espontaneamente mais compostos presentes nas GM durante a noite, sendo esta emissão mais intensa que nos machos. Propomos que os compostos encontrados nas GMs de *R. prolixus* estão envolvidos na comunicação sexual desta espécie. Foi observado um decréscimo no sucesso da cópula na ausência dos odores das GMs devido a oclusão dos orifícios de abertura desta glândula. Sugerimos que o reconhecimento entre os sexos pode ser mediado por sinais químicos e que estes podem ser originados das GMs. A identificação dos compostos presentes nas GMs, assim como o envolvimento destes na comunicação química, é o primeiro passo no estudo dos prováveis feromônios sexuais de *R. prolixus*. A sua potencial utilização na manipulação do comportamento desta espécie justifica o aprofundamento deste estudo para permitir o desenho potencial de ferramentas para o seu controle.

ABSTRACT

Twelve compounds produced by the metasternal glands (MGs) of the triatomine bug *Rhodnius prolixus* were identified by solid phase microextraction (SPME) combined with coupled gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) using achiral and chiral columns. All substances were ketones or alcohols, and the same compound profile was found in the secretions produced by either sex. The most abundant compounds were 2-methyl-3-buten-2-ol, (2S)-pentanol, (3E)-2-methyl-3-penten-2-ol, and (2R/2S)-4-methyl-3-penten-2-ol. Emission of these compounds was detected more frequently from females than males, and females released them more frequently during the early hours of the scotophase, the period when sexual activity in this species is at its peak. These compounds were also detected in the headspace above mating pairs. Finally, the occlusion of the MG orifices of male or female bugs with paraffin resulted in a significant decrease in copulation frequency compared to sham-operated insects. Together, these data suggest that the MG secretions of *R. prolixus* may be involved in sexual communication.

ÍNDICE

1-Introdução	1
1.1-Importância Epidemiológica de <i>Rhodnius prolixus</i>	2
1.2-Comunicação química	3
1.3-Comunicação química no contexto sexual em triatomíneos	5
2-Objetivos	10
2.1-Objetivo Geral	11
2.2-Objetivos específicos	11
3-Materiais e Métodos	12
3.1-Os insetos	13
3.2-Compostos químicos	13
3.3-Identificação dos compostos produzidos pelas GMs	13
3.4-Emissão espontânea dos compostos das GMs por adultos virgens	15
3.5-Odores das GMs emitidos durante a cópula	16
3.6-Relevância dos odores das GMs para o sucesso da cópula	16
4-Artigo	19
4- Considerações finais	28
6- Referências Bibliográficas	33

LISTA DE ABREVIATURAS

CAR – carboxeno.

CDCl_3 – trichlorodeuteromethane.

CG-EM – Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa.

^{13}C -NMR – Carbon Nuclear Magnetic Resonance (^{13}C -NMR) Spectroscopy.

Cm – centímetro.

DVB – divinilbenzeno.

e.V. – Electron volts= 2.71828183 volts.

GC-FID – Gas chromatography coupled to flame ionization detector.

GC-MS – Gas chromatography coupled to mass spectrometry.

GM – Glândula metasternal.

^1H -NMR – Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy.

i.d. – intern diameter.

KHz – kilohertz.

L/D – Light/Dark.

L/E – Luz/ Escuridão.

MG – Metastenal glands.

MHz – Megahertz.

M – metro.

Mm – milímetro.

mmol – Micro- molar.

μm – microlitros.

ppm – Partes por milhão.

PDMS – polidimetilsiloxano.

RH – Relative humidity.

SPME – Solid phase micro extraction.

UR – Umidade relativa.



Introdução

1-Introdução

1.1-Importância Epidemiológica de *Rhodnius prolixus*

Rhodnius prolixus Stål (1859) é um inseto pertencente à subfamília Triatominae (Heteroptera: Reduviidae) e possui grande importância epidemiológica por ser o principal vetor da doença de Chagas na Venezuela, Colômbia e partes da América Central (Guatemala, Honduras, Nicarágua e El Salvador) (Schofield, 1994). A doença de Chagas é uma enfermidade que tem como agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi*, responsável pela infecção de 16-18 milhões de pessoas na América Latina, sendo que 120 milhões de pessoas se encontram em áreas consideradas sob risco de transmissão desta doença (WHO, 2005).

Segundo Lent & Wygodzinsky (1979), *R. prolixus* é encontrado em associação com roedores e aves em várias espécies de palmeiras, que representam o ecótopo original desta espécie. Provavelmente, aves e roedores podem atuar como possíveis agentes de dispersão desta espécie no ambiente silvestre. Além disso, esta espécie possui grande capacidade de colonizar os ambientes artificiais em elevadas densidades (Sandoval, 2000).

A sistemática e a taxonomia dos insetos pertencentes ao gênero *Rhodnius* é muito discutida por diversos autores. Segundo Gamboa (1963), *R. prolixus* parece estar completamente confinado a habitats domésticos e peridomésticos na América Central, enquanto populações silvestres são encontradas em várias partes da Venezuela e Colômbia, principalmente em copas de palmeiras. No entanto, outros trabalhos propõem que *R. prolixus* seja uma derivação doméstica de *Rhodnius robustus* (Schofield & Dujardin, 1999).

Além de ser considerado uma espécie de grande importância epidemiológica, *R. prolixus* tem se tornado um dos mais importantes modelos experimentais de laboratório para o estudo da fisiologia e comportamento de insetos. Isso se deve ao fato de que este inseto é relativamente grande e de fácil manuseio, bem como pelo rápido estabelecimento e fácil manutenção de suas colônias (Lent & Wygodzinsky, 1979). Grande parte dos trabalhos desenvolvidos por Wigglesworth (1950), utilizou esta espécie como modelo de experimentação.

1.2-Comunicação química

Ao longo da evolução, insetos e outros animais desenvolveram mecanismos de comunicação química característicos, utilizados para a transferência de informações entre indivíduos da mesma espécie ou entre espécies diferentes. Para isso, é imprescindível a existência de um fluxo de informações que envolvam a interação entre uma fonte (o emissor) e um receptor. Entre ambos existe um canal de transmissão, ou seja, um meio disponível através do qual a informação é transmitida. Para que a transmissão de informações seja bem sucedida, o organismo receptor deve ser capaz de reconhecer os sinais emitidos pela fonte (emissor). Existem diferentes modalidades sensoriais que os organismos utilizam para o intercâmbio de informações. Dentre estas, a olfação, a visão, o tato e a audição são algumas das mais estudadas.

Os compostos químicos que atuam como sinais permitindo o intercâmbio de informações são denominados semioquímicos ou infoquímicos. De acordo com Dicke & Sabelis (1988), um infoquímico é uma substância química que transporta informações de um organismo a outro da mesma espécie ou de espécies diferentes, provocando, no receptor, um comportamento ou uma resposta fisiológica. Os infoquímicos podem ser agrupados em duas categorias com base no tipo de interação, feromônios (intraespecífica) ou aleloquímicos (interespecífica) (Dicke & Sabelis, 1988). Estas duas categorias ainda podem ser classificadas com base nos custos e benefícios que cada organismo obtém nesta interação.

Feromônios [do grego *pherein* (= transferência) + *hormon* (=excitar)] são infoquímicos que atuam entre indivíduos de uma mesma espécie, produzindo mudanças de comportamento ou fisiologia específicas (Dusenbery, 1992). Existem diversos tipos de feromônios que medeiam interações em diferentes contextos de comportamento. Os feromônios sexuais estão envolvidos em processos de atração entre machos e fêmeas (Shorey, 1973), enquanto os de alarme promovem um estado de alerta em insetos de uma mesma espécie diante de alguma fonte de perigo (Blum, 1969). Além destes, podem ser mencionados os feromônios de trilha, que demarcam o caminho até uma fonte de alimentos e os feromônios de oviposição que indicam a existência de um local onde foram depositados ovos de uma determinada espécie (Dusenbery, 1992).

Os insetos não apenas sintetizam os vários componentes dos feromônios com alto grau de pureza por meio de caminhos biossintéticos específicos, mas também controlam o isomerismo geométrico e óptico das moléculas, assim como a proporção com que esses componentes são produzidos (David & Birch, 1989). Uma diferença estrutural que está relacionada com a atividade biológica dos feromônios é a quiralidade da molécula. Quando um composto é quiral, em muitas ocasiões somente um dos enantiômeros existentes é bioativo (Mori, 1989). Isômeros diferentes podem provocar comportamentos diferentes, indicando a existência de mecanismos de discriminação bem definidos na antena, onde estão localizados os receptores de cada espécie (Ferreira, 2001). Por exemplo, enantiômeros de sulcatol (6-metil-5-hepten-2-ol), um feromônio de agregação do besouro da ambrosia, *Gnathotrichus sulcatus* (Byrne et al., 1974), responde a uma mistura de 65% do isômero (S)-(+)-sulcatol (1) e 35% do isômero (R)-(-)-1 e não responde a nenhum dos isômeros separados (Borden et al., 1976). Uma outra espécie do mesmo gênero, (*G. retusus*), é sensível apenas ao isômero S e a resposta é inibida pela ação do isômero R (Borden et al., 1980).

A síntese de feromônios em laboratório é hoje uma área da química orgânica em expansão, permitindo não só a caracterização total dos feromônios naturais isolados (através da comparação de propriedades físicas e químicas conhecidas), mas também fornecendo material em quantidades suficientes para estudos de entomologia, hoje fundamentalmente na área agrícola. Sendo assim, o conhecimento sobre possíveis fontes de odores relacionados com a ecologia química de diversas espécies de insetos de importância econômica ou médica é necessário para esse tipo de estudo.

Atualmente, o conhecimento sobre algumas técnicas utilizadas na identificação e amostragem de voláteis é essencial dentro da área da ecologia química. Dentre as técnicas analíticas utilizadas para a identificação de compostos, destaca-se a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-EM). Esta técnica analítica utiliza um cromatógrafo gasoso (CG) acoplado a um detector de massa (EM) com o objetivo de identificar e/ou quantificar os componentes de uma amostra (mistura). A amostra é injetada no GC e posteriormente conduzida ao interior de uma coluna capilar por um gás de arraste. Nesta ocorre a separação dos componentes e após a sua eluição da coluna, os mesmos são enviados ao EM. O

detector ioniza os componentes e então são obtidos os espectros de massa correspondentes (Eiceman, 2000). Já na cromatografia utilizando o CG-FID, o princípio de funcionamento do detector baseia-se na geração de um sinal elétrico a partir da combustão da amostra na chama. A amostragem de substâncias voláteis pode ser realizada de diversas maneiras. Uma técnica relativamente recente é a micro-extração em fase sólida (SPME), que é muito utilizada na captura de odores, pois realiza a amostragem de substâncias voláteis sem o uso de solventes. Esta técnica se baseia no uso de um bastão de fibra óptica de sílica recoberto com um filme fino adsorvente de polímero, e.g. polidimetilsiloxano, ou de carvão ativo microparticulado (Valente & Augusto, 1999).

1.3- Comunicação química no contexto sexual em triatomíneos

Estudos sobre comportamento e comunicação química em triatomíneos, podem ser de grande relevância no desenvolvimento de novas ferramentas para o controle vetorial. A existência de feromônios sexuais na subfamília Triatominae tem sido evidenciada através de alguns trabalhos de comportamento que ressaltam a importância de realizar mais estudos nesta área.

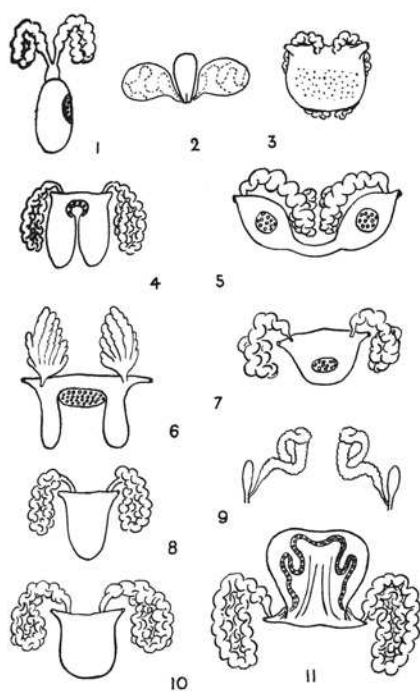
Baldwin et al. (1971) relatam a existência de um feromônio produzido por casais de *R. prolixus* durante a cópula que seria atraente para outros machos. Estes autores também ressaltaram a importância da alimentação dos machos na atividade sexual destes insetos. Eles sugerem que a alimentação afeta o desenvolvimento da atração sexual, já que machos não alimentados desta espécie não responderam ao sinal químico emitido por casais durante a cópula.

Posteriormente, Manrique & Lazzari (1995) constataram que machos de *Triatoma infestans* exibem um comportamento similar ao de *R. prolixus*, agregando-se em volta de casais em cópula, comportamento este não observado em fêmeas. Estes resultados evidenciaram a existência de um sinal de agregação de machos que é liberado durante a cópula, promovendo aparentemente cópulas sucessivas da mesma fêmea com vários dos machos (Lazzari, comunicação pessoal).

Ondarza et al. (1986, 1987) relatam que *Triatoma mazzottii* possui um feromônio sexual que atua como “afrodisíaco” e que é liberado pelas fêmeas. Em outro estudo, Guerenstein & Guerin (2004) compararam os voláteis emitidos por adultos de *R. Gina Barcelos Pontes*

prolixus, *T. infestans* e *Dipetalogaster maximus* perturbados ou casais de *R. prolixus* em cópula. Através da microextração em fase sólida, cromatografia gasosa e espectrometria de massa os autores detectaram concentrações diferentes de ácido isobutírico nos dois contextos (perturbação e cópula). Segundo os autores, a liberação do composto em concentrações mais altas estaria relacionada a um comportamento de perturbação enquanto que concentrações mais baixas poderiam funcionar como atraente.

Os adultos da subfamília Triatominae possuem “glândulas de cheiro” associadas aparentemente com a produção de feromônios. Em 1930, Brindley descreveu as “glândulas do primeiro segmento abdominal”, que foram posteriormente denominadas glândulas de Brindley. No mesmo trabalho a autora descreveu morfologicamente um segundo tipo glandular, denominado glândulas metasternais (GMs), nos Heteroptera (Fig. 1) incluindo a descrição das glândulas metasternais de *R. prolixus* (Fig.2). Um outro tipo glandular, a glândula ectodermal do aparelho copulador do macho, foi descrita por Barth (1980) em *T. infestans* e posteriormente foi denominada área glandular da genitália do macho (Weirauch, 2003).



METASTERNAL SCENT-GLANDS OF HETEROPTERA.

Figura 1-Glândulas metasternais do grupo Heteroptera. 1-*Corixa*; 2-*Limnotrechus thoracicus*; 3-*Salda litorallis*; 4-*Anthocoris nemoralis*; 5-*Dysdercus howardi*; 6-*Cimex lectularius*; 7-*Nabis lativentris*; 8-*Scolopostheus affinis*; 9-*Rhodnius prolixus*; 10-*Phytocoris varipes*; 11-*Palomena prasina* (Segundo Brindley, 1930).

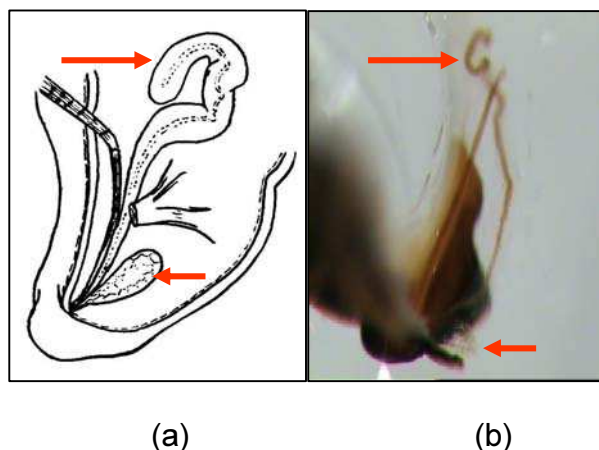


Figura 2- Glândula Metasternal de *Rhodnius prolixus*. (a) Desenho esquemático (Segundo Brindley, 1930) e (b) imagem salva mediante uso de microscópio estereoscópico (aumento 62X, Programa KontronS 300, Zeiss, Alemanha), destacando um ducto secretor (setas acima) e um reservatório (setas abaixo) da glândula.

Rossiter e Staddon (1983) demonstraram que as glândulas metasternais de *Dipetalogaster maximus* produzem 3-metil-2-hexanona. Cruz López et al. (1995) identificaram os produtos das glândulas de Brindley de *T. infestans*, reforçando a possível função de defesa destas, e a presença do ácido isobutírico como principal composto. Nenhum produto volátil foi detectado por estes autores nas glândulas metasternais de *T. infestans*. Rojas et al. (2002) fizeram uma nova investigação dos compostos presentes nas glândulas de Brindley de *R. prolixus* encontrando seis compostos: ácido acético, ácido isobutírico, ácido capróico e três compostos não identificados. As glândulas de Brindley produzem compostos que aparentemente estão associados com a defesa possuindo função de alarme para os triatomíneos (Ward 1981; Manrique et al 2006). Porém, a função das glândulas metasternais e dos seus produtos, assim como da área glandular da genitália do macho, ainda é desconhecida.

Diversos comportamentos associados com a reprodução e mediados por odores podem existir nestes insetos. Sabe-se que o vôo possa ser relevante na dispersão de algumas espécies de triatomíneos (Sjogren & Ryckman, 1966; Lehane & Schofield, 1976; Noireau et al., 2001). Entretanto, não existem estudos que

tenham analisado potenciais mecanismos de reconhecimento ou de orientação a curta ou longa distância. Pontes et al. (dados não publicados), demonstraram que machos de *R. prolixus* são capazes de iniciar o vôo de maneira orientada em resposta a correntes de ar transportando odores emitidos por fêmeas. Entretanto, a origem desses sinais químicos que modulariam a orientação do vôo de *R. prolixus*, ainda é desconhecida.

Desta forma, os experimentos desenvolvidos ao longo deste trabalho tiveram o objetivo de identificar sinais químicos envolvidos na comunicação sexual de *R. prolixus*, analisando a provável função dos odores produzidos pelas glândulas metasternais neste contexto comportamental.



Objetivos

2- Objetivos

2.1-Objetivo Geral

Identificar odores envolvidos na comunicação sexual de *R. prolixus* e sua potencial função.

2.2-Objetivos específicos

- Caracterizar quimicamente os compostos produzidos pelas glândulas metasternais de *R. prolixus*.
- Determinar a identidade quiral dos compostos mais abundantes.
- Identificar o sinal químico liberado durante a cópula que induz a agregação de machos.
- Analisar se os produtos das glândulas metasternais afetam o sucesso da cópula.
- Analisar se adultos virgens emitem espontaneamente algum composto volátil produzido pelas glândulas metasternais.
- Verificar se a alimentação e o foto-período interferem na emissão espontânea de odores por adultos virgens de *R. prolixus*.



Materiais e Métodos

3- Materiais e Métodos

3.1-Insetos

Os triatomíneos utilizados nos experimentos foram provenientes de uma colônia procedente de Honduras e mantidos no insetário do Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas do Instituto René Rachou. Os insetos foram submetidos às condições controladas de temperatura e umidade ($26 \pm 2^\circ\text{C}$; 60 ± 10 U. R.) e alimentados semanalmente em galinhas (*Gallus gallus*).

Ninfas de 5^o estágio de *R. prolixus* foram separadas por sexo e após a sua ecdise imaginal mantidas virgens até a realização dos experimentos. Os insetos foram treinados num ciclo de iluminação 12:12 L/E por pelo menos três dias antes do início de cada experimento.

3.2-Compostos químicos

2-butanona, 2-pentanona, (*R*)-2-butanol, (*S*)-2-butanol, 2-metil-3-buten-2-ol, 3-pentanol, 2-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 3-hexanol e 2-metil-1-butanol foram comprados da Sigma-Aldrich, Brasil. Devido à não disponibilidade de algumas amostras comerciais, a síntese dos compostos foi realizada pelos pesquisadores Björn Bohman e C. Rikard Unelius, do Departamento de Química da Universidade de Kalmar, na Suécia. (*S*)-3-metil-2-butanol, (*S*)-2-pentanol, (*S*)-4-metil-2-pentanol e 2-metil-3-penten-2-ol foram sintetizados a partir de metil-crotonato de acordo com Stavinoha et al. (1981).

3.3- Identificação dos compostos produzidos pelas GMs

Todos os insetos utilizados para a extração de GMs tinham 20 dias de idade após ecdise e se encontravam em jejum. Para evitar a emissão de compostos das glândulas exócrinas devida à sua perturbação, antes da retirada das glândulas os insetos foram mantidos durante cinco minutos em freezer (-18°C). A extração das glândulas foi feita através de um corte no metatórax ventral dos insetos com o auxílio de um microscópio estereoscópico.

Posteriormente as glândulas foram colocadas em frascos de 2 ml e armazenadas em freezer (-18°C) para análise subsequente em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa (CG-EM, CG-Shimadzu 17A; MS-Shimadzu 5050A).

Foram feitas quatro amostras de glândulas de fêmea e quatro de macho. Cada amostra foi constituída por 12 glândulas extraídas de pelo menos seis insetos. Em cada caso, foram preparadas amostras controles com fragmentos de tecidos e cutícula extraídos de uma coxa do terceiro par de patas dos mesmos insetos. Através da análise das amostras controle foi permitir excluir aqueles compostos dos triatomíneos que não fossem encontrados exclusivamente nas GMs.

As amostras foram sonicadas durante cinco minutos e depois aquecidas a 50°C/30 min. Os odores foram capturados através da exposição de uma fibra de micro-extração em fase sólida (SPME) no interior dos frascos que continham as amostras. A fibra de SPME utilizada tinha 2 cm de comprimento e 50/30 µm de largura, recoberta com divinilbenzeno (DVB), carboxeno (CAR) e polidimetilsiloxano (PDMS) (SUPELCO, USA). A fibra foi exposta às amostras durante 10 minutos a uma temperatura de 50°C. Após a adsorção dos voláteis na fase sólida, a fibra foi inserida durante um minuto no injetor do cromatógrafo gasoso para a dessorção térmica dos analitos.

A coluna cromatográfica utilizada foi do tipo SupelcoWax-10; 30 m; 0,25 mm i.d.; 0,25 µm. O injetor do cromatógrafo gasoso foi programado a 230°C e utilizado no modo *splitless*. O gás de arraste utilizado foi Hélio (He) numa velocidade de 30 cm/s. O programa de temperatura utilizado para o forno do CG é descrito a seguir: 40°C durante cinco minutos, aquecimento subsequente para 120 °C a 3 °C/min. e finalmente para 200°C a 15°C/min. A interface foi aquecida a 250°C e a energia de ionização utilizada foi de 70 eV.

A identificação dos compostos presentes na glândula foi feita a partir da comparação dos resultados obtidos com amostras das GMs e amostras controle. Desta forma, os compostos detectados nos dois tipos de amostras, controle e de GMs, foram descartados como produtos das GMs de *R. prolixus*.

O tempo de retenção e o espectro de massa de cada composto presente exclusivamente nas GMs foram registrados e, em todos os casos, confirmados através da co-injeção de padrões sintéticos dos compostos.

A estereoquímica da maioria dos compostos quirais foi determinada mediante cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-FID) (Shimadzu 17 A) e CG-EM (Shimadzu 17A acoplado Shimadzu 5050A). Para isso, as amostras de glândulas foram aquecidas a 50°C por 30 minutos e uma fibra de SPME (2 cm, DVB/CAR/PDMS-50/30 µm, SUPELCO, USA) foi exposta num intervalo de tempo variável que dependeu da abundância dos diferentes compostos. A fibra foi exposta no injetor do CG durante um minuto para dessorção dos voláteis. Para as análises no CG-FID foi utilizado hélio como gás de arraste (31 cm/s) e as injeções foram feitas no modo *splitless*. O injetor e o detector foram utilizados a uma temperatura de 225°C. O forno foi utilizado numa condição isotérmica a uma temperatura de 80°C para 4-metil-3-penten-2-ol e 30°C para os outros compostos. A coluna utilizada nas análises foi do tipo CYCLOSIL β (30 m x 0.25 mm i.d x 0,25 µm film, J & W Scientific). Devido à ocorrência de sobreposição de picos de diferentes compostos utilizando a técnica descrita acima, uma segunda coluna foi utilizada (GammaDex 225 column 30 m x 0.25 mm i.d x 0,25 µm film; SUPELCO) numa temperatura de 30°C para todos os compostos. O tempo de retenção dos compostos da amostra foi comparado com o dos padrões sintéticos e foi feita uma co-injeção a fim de confirmar a identidade de todos os enantiômeros.

3.4- Emissão espontânea de compostos das GMs por adultos virgens

Adultos virgens foram utilizados nos ensaios assim que atingiram a idade de sete dias após a ecdise. Grupos de três insetos adultos foram colocados em frascos de vidro de 10 ml tampados com pano tipo tule e contendo um papel de filtro no interior como substrato para os insetos. Foram feitos três grupos para cada uma das seguintes séries experimentais: 1) fêmeas não alimentadas, 2) fêmeas alimentadas no 9º dia após a ecdise, 3) machos não alimentados e, 4) machos alimentados no 9º dia após a ecdise.

A captura dos compostos em cada série experimental foi realizada nas primeiras três horas da escotofase ou da fotofase durante 12 dias consecutivos. Em cada caso, uma fibra de SPME (DVB/CAR/PDMS-50/30µm) foi exposta por uma hora no interior do frasco que continha os insetos. Decorrido este tempo, a fibra foi retraída e injetada logo em seguida no CG-EM, onde foi feita a análise e posterior identificação dos compostos emitidos pelos insetos espontaneamente. A coluna utilizada na técnica de CG-EM foi do tipo SupelcoWax-10; 30 m; 0,25 mm i.d.; 0,25 µm. A fibra de SPME foi inserida no injetor a 230 °C no modo *split* (1:5) durante um minuto. Hélio (He) foi utilizado como gás de arraste numa velocidade de 30 cm/s. O programa de temperatura utilizado foi de 50 °C durante um minuto, aquecimento para 75 °C a 10 °C/min e finalmente para 240 °C a 15 °C/min. A interface foi aquecida a 250 °C e a energia de ionização utilizada foi de 70 eV.

3.5- Odores das GMs emitidos durante a cópula

Para aumentar a probabilidade de cópula, foram utilizados insetos adultos alimentados com 10 dias de idade após ecdise e testados 10 dias depois. Cada casal foi colocado dentro de um frasco de vidro de 10 ml evitando a sua perturbação, i.e. sem a utilização de pinças. Este procedimento foi feito com o auxílio de um pequeno pedaço de papel que era oferecido aos insetos como substrato e depois cuidadosamente transferido junto com eles para o frasco. A partir do início da cópula, uma fibra de SPME (2 cm, DVB/CAR/PDMS-50/30 µm, SUPELCO, USA) foi exposta no interior do recipiente, sendo retirada uma hora depois. Logo em seguida, a fibra foi exposta no injetor do GC-EM, utilizando o mesmo programa de temperatura e forma de injeção descritas no experimento acima. Neste experimento foram realizadas 20 repetições e a identificação dos compostos emitidos durante a cópula foi feita utilizando informações de espectro de massa e tempo de retenção.

3.6- Relevância dos odores das GMs para o sucesso da cópula

Neste experimento foi determinada a proporção de casais de *R. prolixus* que copularam quando submetidos a diferentes tratamentos. Foram realizadas 20 repetições de cada uma das seguintes séries experimentais:

- 1- casais sem oclusão das glândulas metasternais (controle positivo).
- 2- casais cujos machos tiveram os orifícios das GMs ocluídos.
- 3- casais cujos machos receberam um tratamento semelhante, porém sem tampar as GMs (controle).
- 4- casais cujas fêmeas tiveram os orifícios das GMs ocluídos.
- 5- casais cujas fêmeas receberam um tratamento semelhante, porém sem tampar as GMs (controle).

A oclusão das GMs foi feita 24 horas antes da realização dos ensaios com parafina (Sigma-Aldrich) aquecida a 41,5 °C, mediante a utilização de um micro-cauterizador Max Wax (Eletron Microscopy Sciences, USA). Os procedimentos de oclusão das glândulas foram realizados com o auxílio de um microscópio estereoscópico. Grupos de cinco insetos do mesmo sexo e correspondentes à mesma série experimental foram mantidos em frascos até a realização do experimento. Em cada ensaio, um casal foi colocado dentro de uma placa de Petri (diâmetro: 10 cm, altura: 2 cm) cujo substrato foi previamente coberto com papel de filtro. Esse procedimento foi realizado cuidadosamente com auxílio de um pedaço de papel de filtro pra evitar a perturbação dos insetos. Os ensaios tinham duração de uma hora e mediante observação direta foi registrada a ocorrência ou não da cópula. Este tempo foi estipulado a partir de resultados obtidos anteriormente em estudos de cópula com casais de *R. prolixus*.

3.7- Análise estatística

Todas as comparações realizadas entre os resultados obtidos no experimento de emissão espontânea foram analisadas utilizando o teste de Qui-quadrado (χ^2). As comparações entre as diferentes séries do experimento que analisou a relevância dos odores das GMs para o sucesso da cópula

também foram realizadas utilizando o teste de Qui-quadrado (χ^2). O nível de significância utilizado em todos os ensaios foi de 95%.

Metasternal Gland Volatiles and Sexual Communication in the Triatomine Bug, *Rhodnius prolixus*

Gina B. Pontes & Björn Bohman & C. Rikard Unelius & Marcelo G. Lorenzo

Received: 15 June 2007 / Revised: 26 November 2007 / Accepted: 9 January 2008 / Published online: 4 March 2008
Springer Science + Business Media, LLC 2008

Abstract Twelve compounds produced by the metasternal glands (MGs) of the triatomine bug *Rhodnius prolixus* were identified by solid phase microextraction (SPME) combined with coupled gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) using achiral and chiral columns. All substances were ketones or alcohols, and the same compound profile was found in the secretions produced by either sex. The most abundant compounds were 2-methyl-3-buten-2-ol, (2S)-pentanol, (3E)-2-methyl-3-penten-2-ol, and (2R/2S)-4-methyl-3-penten-2-ol. Emission of these compounds was detected more frequently from females than males, and females released them more frequently during the early hours of the scotophase, the period when sexual activity in this species is at its peak. These compounds were also detected in the headspace above mating pairs. Finally, the occlusion of the MG orifices of male or female bugs with paraffin resulted in a significant decrease in copulation frequency compared to sham-operated insects. Together, these data suggest that the MG secretions of *R. prolixus* may be involved in sexual communication.

Keywords *Rhodnius prolixus* · Sexual behavior · Metasternal glands · Pheromone · Volatiles · Identification

G. B. Pontes · M. G. Lorenzo (*)
Laboratory of Triatomines and Chagas Disease Epidemiology,
Instituto René Rachou/FIOCRUZ,
30190002 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
e-mail: marcelo@cqqr.fiocruz.br

B. Bohman · C. R. Unelius
School of Pure and Applied Natural Sciences,
University of Kalmar,
SE-391 82 Kalmar, Sweden

Introduction

Rhodnius prolixus Stål 1859 (Heteroptera: Reduviidae) is the main vector of Chagas disease in northern South America and in parts of Central America (Schofield 1994). This species is well adapted to live in rural houses and is considered to be of major epidemiological importance (Monteiro et al. 2003). Approximately 16–18 million people in Latin America are infected with the Chagas disease parasite, *Trypanosoma cruzi*, and another 120 million are at risk (WHO 2005).

Baldwin et al. (1971) reported that copulating pairs of *R. prolixus* emit a pheromone that is attractive to males. This phenomenon has also been observed for another vector of Chagas disease, the bug *Triatoma infestans* (Manrique and Lazzari 1995). Relatively little is known about the mechanisms of long- or short-distance orientation that mediate sexual encounters between adults of species in the subfamily Triatominae, although Baldwin et al. (1971) suggested that feeding triggers the development of sexual attraction in *R. prolixus* and that unfed males of this species do not respond to the apparent odor emitted by mating pairs.

R. prolixus adults have a pair of metasternal glands (MGs) that open to the ventral metathorax (Brindley 1930). Their function and the chemical identity of any secretions are unknown. Another set of glands of this insect, the Brindley's glands, which secrete isobutyric acid as the most abundant compound, are likely associated with alarm and defense functions (Ward 1981; Cruz López et al. 1995; Rojas et al. 2002; Manrique et al. 2006). It has been suggested that compounds produced by Brindley's glands are involved in the sexual chemical communication of triatomines (Cruz López et al. 2001; Rojas et al. 2002; Guerenstein and Guerin 2004).

In a recent study, Manrique et al. (2006) suggested that the secretions of the MGs of *T. infestans* are involved both in sexual and alarm communication, and that the secretions of Brindley's glands are restricted to alarm and defensive roles. These authors identified several highly volatile ketones and alcohols produced by the MGs and showed that the contents of these glands are emitted by adults of this species during copulation.

Our primary objective in this study was to identify volatile secretions produced by the MGs of *R. prolixus*. We further tested whether the MG compounds are emitted at different phases of the light/dark cycle by virgin males and females and examined if mating pairs of this species emit these substances. Finally, we tested whether the compounds emitted from these glands influence copulation.

Methods and Materials

Insects Insects were reared at $26\pm 2^\circ\text{C}$ and $60\pm 10\%$ r.h. Groups of fifth instars were sorted by sex and placed in separate flasks to keep them unmated until use in experiments. All insects used were kept under the 12:12 L:D photoperiod for at least 3 d before any experiment. Virgin insects were used for all experiments, and their nutritional status was varied according to the experiment performed. For odor-identification studies, unfed insects were dissected at d 20 after ecdysis. For the detection of emission of MG compounds, insects were fed at d 10, and used 20 d after ecdysis. For the remaining two experiments (i.e., detection of emission of MG odors during mating and evaluation of the effect of gland occlusion on mating success), insects were used at d 20 after being fed at d 10. All assays were performed at $26\pm 2^\circ\text{C}$ and $60\pm 10\%$ r.h.

Identification of Compounds Produced by Metasternal Glands Samples of 12 glands were obtained from six insects and stored in 2-ml vials sealed with Teflon®/silicone-lined caps. Control samples were prepared with pieces of tissue and cuticle from hind leg coxae. Female and male tissue was stored at -8°C for not more than 10 d before analysis. No change of the chemical profile was observed after storage when compared with freshly prepared samples.

Gland samples were sonicated (Thornton T14, Inpec Eletrônica, Brazil, 40 kHz) for 5 min and then heated at 50°C for 30 min. A solid phase microextraction (SPME) fiber (2 cm, DVB/CAR/PDMS-50/30 μm , Supelco, Bellefonte, PA, USA) was exposed in the headspace of the samples (in vials) for 10 min at 50°C immediately before analysis by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). GC-MS analysis was performed by using coupled Shimadzu 17A-5050A

machines. Desorption time in the splitless injection port of the GC was 1 min. Helium at 30 cm s^{-1} was used as carrier gas. Transfer line and GC injector temperatures were 250 and 230°C , respectively. Analyses were performed by using a SupelcoWax-10 column ($30\text{ m}\times 0.25\text{ mm i.d.}\times 0.25\text{ }\mu\text{m}$ film; Supelco), with an oven program of 40°C for 5 min, 3°C min^{-1} to 120°C , then $15^\circ\text{C min}^{-1}$ to 200°C .

Tentative identification of volatile compounds was based on the comparison of retention indices (Kováts 1965) and mass spectra with data from the literature and spectral library (NIST-02). All tentative identifications were confirmed by peak enhancement in co-injections with authentic synthetic samples (Birkett et al. 2004). A typical procedure for co-injection/peak enhancement is given for 2-pentanol: A gland sample was prepared and analyzed as described. After a chromatogram was obtained, the gland sample was treated again according to the same protocol (i.e., sonicated, heated, and sampled by SPME). In parallel, a sample of synthetic standard was prepared: $1\text{ }\mu\text{l}$ of the compound was absorbed on a small piece of filter paper ($1\times 1\text{ cm}$) in a 10-ml open vial. The vial was heated at 50°C for 3 min and cooled to ambient temperature for 1 min. The same SPME fiber was exposed to the standard sample for 2 sec, and the odors were desorbed from the fiber into the GC injector. The results of both injections were compared and the identity of the compound confirmed when three criteria were fulfilled. First, the peak from the MG compound and the synthetic compound overlapped fully. Second, the peak area increased in the second injection. Third, no difference between the mass spectral profiles was observed after a scan-by-scan analysis.

The stereochemistry of chiral compounds was determined by GC with flame-ionization detection (FID; Shimadzu 17A) and GC-MS analysis. Gland samples were heated at 50°C for 30 min, and the SPME fiber was exposed in the headspace for a given time depending on the relative abundance of a compound. The method used for analysis was the same as for the GC-MS analysis, except the carrier gas velocity was 31 cm sec^{-1} , the injector and detector temperatures were both 225°C , and a CYCLO-SILB column ($30\text{ m}\times 0.25\text{ mm i.d.}\times 0.25\text{ }\mu\text{m}$ film, J & W Scientific) at either 80°C , for 4-methyl-3-penten-2-ol, or 30°C , for the other compounds, was used. Because a number of peaks overlapped with this column and conditions, chiral GC-MS analysis was carried out by using a GammaDex 225 column ($30\text{ m}\times 0.25\text{ mm i.d.}\times 0.25\text{ }\mu\text{m}$ film) at 30°C . The retention times of compounds were compared with synthetic standards, and co-injection (peak enhancement) was carried out to confirm the identities of the enantiomers of all compounds. The configuration of 2-methyl-3-penten-2-ol was confirmed by co-injection with the synthetic (E)-isomer, derived from trans-methyl crotonate (for synthesis details, see below).

Emission of MG Compounds by Virgin Adults Groups of three virgin adults of the same sex were separated 7 d after ecdysis and transferred into 10-ml vials covered with gauze with a piece of filter paper inside as a substrate for the bugs. These vials were enclosed separately in 150-ml closed plastic containers so as to isolate each group of bugs. We worked with groups of insects to increase both the likelihood of emission and the amount of MG odors (preliminary assays with individual insects failed probably because of low levels of compounds). Each treatment included three groups of three insects. The different series of assays monitored odor emission by: (1) unfed females during the dark phase; (2) unfed females during the light phase; (3) females fed at d 9 after ecdysis, during the dark phase; (4) females fed at d 9 after ecdysis, during the light phase; (5) unfed males during the dark phase; (6) unfed males during the light phase; (7) males fed at d 9 after ecdysis, during the dark phase; and (8) males fed at d 9 after ecdysis, during the light phase. Odor sampling with a SPME fiber was carried out for 1 hr for each treatment. Volatile compounds on the fiber were desorbed immediately after sampling the headspace. This procedure was repeated every second day over a period of 12 d with all groups, i.e., giving a total of six samples per group of three insects and 18 samples for each of the eight treatments. Control samples were obtained by SPME analyses of vials containing a piece of filter paper.

The data from studies of emission of MG compounds by *R. prolixus* adults were analyzed both for individual substances and for pooled samples. This allowed the comparison of emission activity between series (treatments). Every time a MG odor was detected over the samples, this was recorded as a “detection event”.

Emission of MG Compounds During Copulation One *R. prolixus* female and one male were gently transferred onto a piece of filter paper inside a 10-ml vial, so as to avoid disturbance and the consequent emission of Brindley's glands' products (Manrique et al. 2006). The vial was closed with a Teflon®/silicone-lined cap. After copulation had begun, volatiles present in the headspace were sampled for 60 min with a SPME fiber. Volatile compounds were analyzed immediately after sampling the headspace. Twenty assays were performed. Each pair of insects was used only once and then discarded.

Odors Emitted by MGs and Possible Effect on Mating in *R. prolixus* A pair of bugs was gently introduced into a Petri dish (10×2 cm) lined with a piece of filter paper and covered with glass to prevent escape. Whether the pair copulated or not was observed for 60 min; if the pair did not commence copulation within this time, it was considered that no copulation occurred. To evaluate the relevance

of MG odors for the success of copulation, the proportion of mating pairs under different treatments was compared: (1) pairs in which males had the MG orifices occluded with paraffin (N=20), (2) pairs in which females had the MG orifices occluded with paraffin (N=20), and (3) pairs in which both males and females had the MG orifices occluded with paraffin (N=20). To test whether this treatment affected the behavior of the insects, two series of control assays were performed: (4) a group in which sham males had paraffin applied on a different area of the cuticle without covering the MG orifices (N=20), and (5) a group in which sham females had paraffin applied on a different area of the cuticle without covering the MG orifices (N=20). An additional control series (6) evaluated the mating frequency in intact pairs (N=20). All experiments were performed at 26±2°C and 60±10% r.h. The behavior of insects was studied during the first half of the dark phase of their activity cycle.

Chemicals 2-Butanone, 2-pentanone, (2R)-2-butanol, (2S)-2-butanol, 2-methyl-3-buten-2-ol, 3-pentanol, 2-pentanol, 4-methyl-2-pentanol, 3-hexanol, and 2-methyl-1-butanol were purchased from Sigma-Aldrich (Brazil). (2S)-3-Methyl-2-butanol, (2S)-2-pentanol, and (2S)-4-methyl-2-pentanol were purchased from Lancaster Synthesis (UK). (3E)-2-Methyl-3-penten-2-ol was synthesized from methyl crotonate according to Stavinoha et al. (1981), and 4-methyl-3-penten-2-ol was synthesized according to Johnson and Rickborn (1970).

(3E)-2-Methyl-3-penten-2-ol Methyl crotonate (0.96 g, 9.6 mmol) was added dropwise at <-10°C under nitrogen to an ether solution of 1.6 M methyllithium (20-ml, 32 mmol) over 30 min. The mixture was stirred for an additional 3 hr at 0°C before Baekströms reagent (celite/Na₂SO₄, 1:1 w/w) was added. The mixture was filtered and concentrated in vacuo, giving (3E)-2-methyl-3-penten-2-ol as a colorless liquid (0.57 g, 60%). ¹HNMR: δ: 5.63 (m, 2H), 1.68 (d, 4.5 Hz, 3H), and 1.30 (s, 6H). ¹³CNMR: δ: 139.37, 122.16, 70.89, 29.97, and 17.87 ppm.

4-Methyl-3-penten-2-ol Sodium borohydride (0.19 g, 5.0 mmol) was dissolved in ethanol (50%, 10-ml). 4-Methyl-3-penten-2-one (mesityl oxide, 1.0 g, 10.0 mmol) was added dropwise, while stirring at 0°C. The reaction mixture was stirred at ambient temperature overnight. K₂CO₃ was added until the solution was saturated, after which the product was extracted with diethyl ether (2×20-ml). The ether phase was washed with brine (20-ml) and dried over MgSO₄. Evaporation of the solvent gave 4-methyl-3-penten-2-ol as a colorless liquid (0.88 g, 87%). ¹HNMR: δ: 5.20 (d, 8.6 Hz, 1H), 4.55 (dq, 8.4, 6.3 Hz, 1H), 1.71 (s, 3H), 1.68 (s, 3H), and 1.22 (d, 6.3 Hz, 3H).

^{13}C NMR: δ : 134.43, 129.57, 65.03, 25.87, 23.84, and 18.23 ppm.

A mixture enriched in (2S)-4-methyl-3-penten-2-ol was obtained from the racemate by a lipase-catalyzed reaction (Amano PS immobilized on diatomite, Sigma-Aldrich, Sweden; Brenna et al. 1998). Racemic 4-methyl-3-penten-2-ol (20 mg, 0.20 mmol) and vinyl acetate (100 mg, 0.86 mmol) were dissolved in dichloromethane (1-ml). Amano PS-DI (20 mg) was added to the mixture, which was left for 5 hr, with occasional shaking. Chiral GC-MS analysis showed a product enriched in the S-enantiomer. The assignment of the stereochemistry was based on the well-known stereochemical preference of the Amano-PS lipase (Kazlauskas et al. 1991). A mixture enriched in (3S)-hexanol was obtained according to the same protocol.

For all synthesized compounds, ^1H -NMR and ^{13}C -NMR spectra of CDCl_3 solutions were recorded at 500 and 125 MHz by using a Varian Unity spectrometer. Chemical shifts were expressed in ppm in relation to tetramethylsilane. The starting materials were obtained from commercial suppliers and used without further purification. NMR data corresponded well with literature data (Ando et al. 1982; Gau et al. 1999).

Statistical Analyses The results, expressed as the numbers of mating pairs per group of bugs, with or without their glands occluded, were analyzed by means of a Chi-square test followed by multiple comparisons using the Bonferroni

correction. Therefore, only comparisons having $P < 0.003$ were considered to show a significant difference.

Results

Identification of Compounds Produced by MGs Our results showed that the MGs of *R. prolixus* are the sources of a complex mixture of volatile substances. Twelve ketones and alcohols were identified in the MGs of *R. prolixus*, with the most abundant compound being 2-methyl-3-buten-2-ol, followed by 2-pentanol, (3E)-2-methyl-3-penten-2-ol, and 4-methyl-3-penten-2-ol (Table 1). The same substances were detected in the MGs of both sexes. The chiral alcohols 2-butanol, 2-pentanol, 4-methyl-2-pentanol, and 3-hexanol were found as S-enantiomers only, while 4-methyl-3-penten-2-ol (mesityl alcohol) was found as a mixture of the two enantiomers (Table 1). Because 3-methyl-2-butanol and 2-methyl-1-butanol were present at very low concentrations and/or co-eluted with other major compounds on both of the columns used, the chiral analysis was not unequivocal.

Emission of MG Compounds by Virgin Adults MG compounds were consistently detected in the headspace of adult bugs (Fig. 1, Table 2). Detection events (i.e., each time any MG compound was detected) were recorded more frequently in both females and males during the scotophase than the

Table 1 Compounds identified in metasternal glands of *R. prolixus*

Compound	RT ^a	Retention Index ^b	Relative Amount ^c (%) ♀	Relative Amount ^d (%) ♂	Relative Amount ^e (%) ♀ + ♂
2-Butanone	2.53	909	— ^f	— ^f	— ^f
2-Pentanone	3.68	979	— ^f	— ^f	— ^f
(2S)-Butanol	4.92	1,030	5.7±1.4	2.2±0.7	4.0±2.1
2-Methyl-3-buten-2-ol	5.48	1,048	61±10	62.2±7.2	61±8.6
3-Methyl-2-butanol	7.31	1,108	1.1±0.5	0.9±0.3	1.0±0.4
3-Pentanol	7.99	1,120	1.4±0.4	1.1±0.2	1.2±0.4
(2S)-Pentanol	8.50	1,131	20±4.9	21±5.3	20±5.0
(3E)-2-Methyl-3-penten-2-ol	10.07	1,166	6.1±3.0	5.3±1.5	5.7±2.3
(2S)-4-Methyl-2-pentanol	10.80	1,181	— ^f	— ^f	— ^f
(3S)-Hexanol	12.00	1,207	— ^f	— ^f	— ^f
2-Methyl-1-butanol	12.49	1,217	3.5±5.1 ^g	3.3±4.1 ^g	3.4±4.5 ^g
(2S/2R)-4-Methyl-3-penten-2-ol	14.99	1,267	2.1±1.3	2.5±0.8	2.3±1.0

^a Retention time (SupelcoWax-10 column)

^b Retention indices calculated according to Kováts (1965)

^c Relative amount (mean and SD) from eight female samples

^d Relative amount (mean and SD) from eight male samples

^e Relative amount (mean and standard deviation) from all 16 samples

^f Average amount $\leq 0.5\%$ of total amount of compounds in sample

^g Three (one ♂ and two ♀) out of 16 samples contained 10.5–13.1%, and the remaining 13 samples 0.0–3.4%

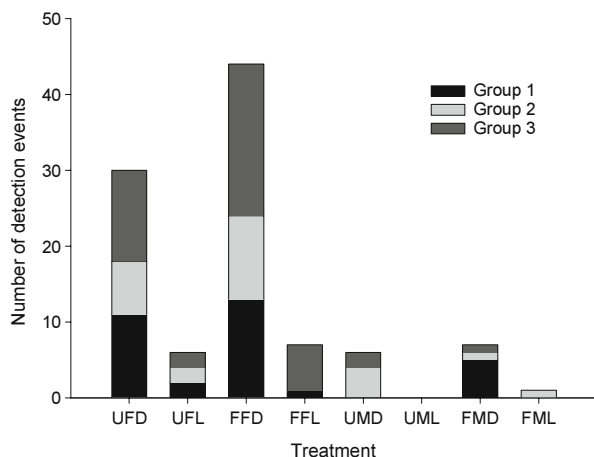


Fig. 1 Number of detection events of various *R. prolixus* metasternal gland compounds in different groups (each of three individuals) of fed/unfed males and females during the light and dark phases. UFD Unfed females during dark phase, UFL unfed females during light phase, FFD fed females during dark phase, FFL fed females during light phase, UMD unfed males during dark phase, UML unfed males during light phase, FMD fed males during dark phase, FML fed males during light phase

photophase (Fig. 1, Table 2). In general, more detection events were recorded from females than males under all experimental conditions (Fig. 1, Table 2). There was no apparent difference between unfed and fed insects.

Nine out of the 12 compounds found in the MGs were detected in the headspace over females over all the different treatments (Table 2), whereas only three of them were found in the headspace over males (Table 2). 2-Methyl-3-

buten-2-ol was the most frequently detected compound in these analyses (Table 2).

Emission of MG Compounds During Copulation In 19 out of 20 assays with pairs, a successful copulation resulted. The average duration of copulation was 49.7 ± 3.6 min. At least one of the compounds identified in the MGs was detected during 70% of the copulations. The most abundant compound produced by the MGs (2-methyl-3-buten-2-ol) was detected in 40% of the copulations. The compound most frequently found during copulation (in 60% of the samples) was 2-methyl-1-butanol. 2-Pentanone was detected in 10% of the assays.

Relevance of the Odors Emitted by MGs for the Success of Mating The percentage of copulation of untreated control pairs was 95% (Fig. 2, N=20). This was not significantly different from the percentages of copulation observed in sham-operated male and female treatments (Fig. 2). However, occlusion of female MG orifices or male MG orifices resulted in significant ($P < 0.003$) decreases in copulation frequencies (30%, N=20 and 15%, N=20, respectively). Occlusion of both male and female orifices also resulted in a significant ($P < 0.003$) decrease (relative to the controls) of mating percentage (15%, N=20).

Discussion

The results show that the metasternal glands of *R. prolixus* are a rich source of volatile compounds. GC-MS analysis

Table 2 The detection of *Rhodnius prolixus* metasternal gland compounds in various treatments, related to sex, feeding status, and time of day

Compound	UFD	UFL	FFD	FFL	UMD	UML	FMD	FML
2-Butanone	1	0	3	0	0	0	0	0
2-Pentanone	2	0	2	0	0	0	0	0
(2S)-Butanol	3	1	8	1	0	0	0	0
2-Methyl-3-buten-2-ol	7	2	11	3	4	0	6	1
3-Methyl-2-butanol	5	0	4	0	0	0	0	0
3-Pentanol	0	0	0	0	0	0	0	0
(2S)-Pentanol	4	1	5	1	1	0	0	0
(3E)-2-Methyl-3-penten-2-ol	0	1	0	1	0	0	0	0
(2S)-4-Methyl-2-pentanol	0	0	0	0	0	0	0	0
(3S)-Hexanol	0	0	0	0	0	0	0	0
2-Methyl-1-butanol	7	1	11	1	1	0	1	0
(2S/R)-4-Methyl-3-penten-2-ol	0	1	0	1	0	0	0	0
Total	29	7	44	8	6	0	7	1

Numbers indicate the detection frequency for each compound (18 SPME samples per treatment).

UFD Unfed female sampled during dark phase, UFL unfed female sampled during light phase, FFD fed female sampled during dark phase, FFL fed female sampled during light phase, UMD unfed male sampled during dark phase, UML unfed male sampled during light phase, FMD fed male sampled during dark phase, FML fed male sampled during light phase

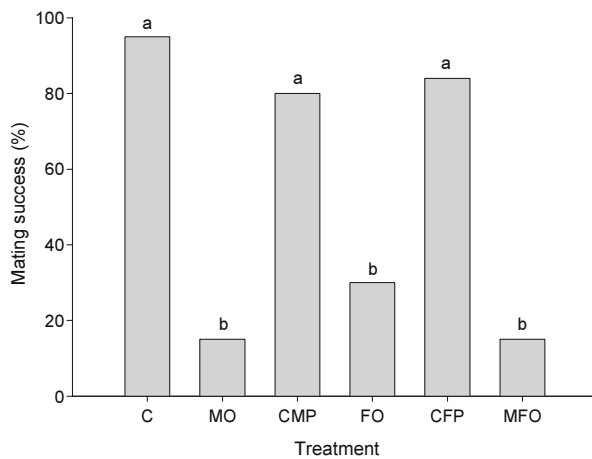


Fig. 2 Copulation (%) of *R. prolixus* pairs: C Control (intact) pairs, MO males with occluded MG orifices, CMP control males treated with paraffin on a different part of their body surface, FO females with occluded MG orifices, CFP control females treated with paraffin on a different part of their body surface, MFO males and females with occluded MG orifices. Different letters atop treatments represent significant differences (chi-square test followed by Bonferroni multiple comparisons, $P < 0.003$)

revealed a mixture of 12 volatile ketones and alcohols, with the most abundant compounds being 2-methyl-3-buten-2-ol, (2S)-pentanol, (3E)-2-methyl-3-penten-2-ol, and the enantiomers of 4-methyl-3-penten-2-ol. None of these compounds had previously been reported in a triatomine species. However, 2-methyl-3-buten-2-ol has been reported as part of the aggregation pheromones of several species of bark beetles (Giesen et al. 1984; Klimetzek et al. 1989; Schlyter et al. 1992) and also as part of the alarm pheromone of the hornet wasp, *Vespa crabro* (Veith et al. 1984). 2-Pentanol has been found in the alarm pheromone of hornet wasps (Ono et al. 2003; Ono 2005), as an attractant to fruits for the coleopterans, *Carpophilus hemipterus* and *Conotrachelus nenuphar* (Phelan and Lin 1991; Prokopy et al. 2001), and as part of the defensive secretions of *Polyzosteria* and related cockroaches (Wallbank and Waterhouse 1970). To our knowledge, 2-methyl-3-penten-2-ol and 4-methyl-3-penten-2-ol have not been reported as semiochemicals for any insect species. Minor components of the secretions, 2-butanone, 2-methyl-1-butanol, and 3-hexanol have been found previously in MG secretions of *T. infestans* by Manrique et al. (2006).

Interestingly, the saturated alcohols we identified in *R. prolixus* all had an (S)-configuration, suggesting a common enzymatic system in their biosynthesis. In accord with what is known about the biosynthesis of 2-methyl-3-buten-2-ol in bark beetles (Lanne et al. 1989; Martin et al. 2003; Seybold et al. 2006), it is conceivable that a common allylic

carbocation in the biosynthetic pathway gives rise to both (3E)-2-methyl-3-penten-2-ol and 4-methyl-3-penten-2-ol. Hydration at the allylic positions of the carbocation would form 2-methyl-3-penten-2-ol and 4-methyl-3-penten-2-ol. The latter addition appears not to be stereoselective as both enantiomers of 4-methyl-3-penten-2-ol are formed.

We demonstrated that the volatile compounds found in the MGs of *R. prolixus* are emitted by virgin adult bugs of both sexes. Emission of these compounds was detected more frequently from females than males. Females also released these chemicals more frequently during the early hours of the scotophase, the period when sexual activity in this species is at its peak (Manrique, personal communication). That these compounds may be involved in sexual communication is suggested by their detection, albeit in low amounts (e.g., 10–100 pg for 2-pentanol) over copulating pairs of *R. prolixus*. That only three of the MG compounds were detected over copulating pairs could have been due to the very low concentration of compounds emitted by bugs. It is worth noting that the SPME collections for analysis of MG content were of headspace above 12 glands heated to 50°C, whereas, at most, the headspace above a pair of bugs emitting volatiles consisted of the contents of four glands at 26°C. For most of the compounds identified in the glands (i.e., from two MGs), the amount was close to the detection limit of our instrument. Manrique et al. (2006) detected 3-pentanone, the main component of the MG secretions of *T. infestans*, over copulating pairs, and suggested that this species may use MG odors for communication during mating. A role for the MG odors in the sexual behavior of *R. prolixus* was further suggested by our occlusion experiments in which occlusion of the MG orifices of either males or females resulted in a significant decrease in copulation, relative to the various controls. A similar result was obtained for *T. infestans* (Crespo and Manrique 2007).

It is worth noting that we did not detect any Brindley's gland secretions during our sampling of copulating pairs. These secretions have previously been detected (Ríos Candelaria 1999; Guerenstein and Guerin 2004) over *R. prolixus* mating pairs, and it has been suggested that they may be involved in sexual communication. However, it cannot be excluded that the detection of Brindley's gland compounds in those studies may have been the result of an alarm response (Manrique et al. 2006) rather than a sexual signal. Further work is needed to clarify the role of Brindley's glands secretions in the sexual behavior of *R. prolixus*.

Overall, our data show that the release of compounds found in the MGs of adult *R. prolixus* corresponds with sexual activity of this species, and that furthermore, females

appear to release greater quantities of these compounds than males. However, whether these chemicals actually mediate sexual behavior in this species is unknown. Further work is required to determine whether the compounds are directly involved in mediating sexual behavior of adults and, if so, what is their precise role. If these chemicals are attractive to adult *R. prolixus*, they could prove useful as chemical baits in traps for monitoring or controlling *R. prolixus* populations, thereby limiting the transmission of Chagas disease to humans. The development of new methods for controlling *R. prolixus* is critical as certain populations have already developed resistance to the pyrethroid insecticides used in control programs (Zerba 1999).

Acknowledgements We thank Dr. C. Lazzari and Dr. G. Manrique for reviewing the manuscript and the reviewers for their valuable comments. We also thank Dr. C. Zani for kindly allowing access to the GC-MS set-up. This work was supported by Instituto René Rachou/FIOCRUZ, CAPES, FAPEMIG (Brazil), by the Swedish International Development Cooperation Agency (SIDA) and by the University of Kalmar (Sweden).

References

- ANDO, W., SATO, R., YAMASHITA, M., AKASAKA, T., and MIYAZAKI, H. 1982. Quenching of singlet oxygen by 1,3,5-triaryl-2-pyrazolines. *J. Org. Chem.* 48:542–546.
- BALDWIN, W. F., KNIGHT, A. G., and LYNN, K. R. 1971. A sex pheromone in the insect *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Can. Entomol.* 103:18–22.
- BIRKETT, M. A., BRUCE, T. J. A., MARTIN, J. L., SMART, L. E., OAKLEY, J., and WADHAMS, L. J. 2004. Responses of female orange wheat blossom midge, *Sitodiplosis mosellana*, to wheat panicle volatiles. *J. Chem. Ecol.* 30:1319–1328.
- BRINDLEY, M. D. H. 1930. On the metasternal scents-glands of certain Heteroptera. *Trans. Ent. Soc. Lond.* 78:199–208.
- BRENNA, E., FRONZA, G., FUGANTI, C., IGHETTI, A., and SERRA, S. 1998. Enzyme-mediated preparation of the single enantiomers of the olfactory active components of the woody odorant timberol. *Helv. Chim. Acta.* 82:1762–1773.
- CRESPO, J., and MANRIQUE, G. 2007. Mating behavior of the hematophagous bug *Triatoma infestans*: Role of Brindley's and metasternal glands DOI 10.1016/j.jinsphys.2007.03.014.
- CRUZ-LÓPEZ, L., MORGAN, E. D., and ONDARZA, R. N. 1995. Brindley's gland exocrine products of *Triatoma infestans*. *Med. Vét. Entomol.* 9:403–406.
- CRUZ-LÓPEZ, L., MALO, E. A., OJAS, J. C., and MORGAN, E. D. 2001. Chemical ecology of triatomine bugs: vectors of Chagas disease. *Med. Vét. Entomol.* 15:351–357.
- GAU, A. H., LIN, G. L., UANG, B. J., LIAO, F. L., and WANG, S. L. 1999. Regio- and diastereoselective ene reaction of 4-phenyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione with chiral allylic alcohols and their derivatives. *J. Org. Chem.* 64:2194–2201.
- GIESEN, H., OHNLE, U., VITE, J. P., PAN, M. L., and FRANCKE, W. 1984. The aggregation pheromone of the Mediterranean pine bark-beetle *Ips (Orthotomicus) erosus*. *Z. Angew. Entomol.* 98:95–97.
- GUERENSTEIN, P. G., and GUERIN, P. M. 2004. A comparison of volatiles emitted by adults of three triatomine species. *Entomol. Exp. Appl.* 111:151–155.
- JOHNSON, M. R., and RICKBORN, B. 1970. Sodium borohydride reduction of conjugated aldehydes and ketones. *J. Org. Chem.* 35:1041–1045.
- KAZLAUSKAS, R. J., WEISSFLOCH, A. N. E., APPAPORT, A. T., and CUCCIA, L. A. 1991. A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*. *J. Org. Chem.* 56:2656–2665.
- KLIMETZEK, D., BARTELS, J., and FRANCKE, W. 1989. The pheromone system of the elm bark beetle *Pteleobius vittatus* (F.) (Col., Scolytidae). *J. Appl. Entomol.* 107:518–523.
- KOVÁTS, E. 1965. Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system, pp. 229–247, in J. C. Giddings, and R. A. Keller (eds.). *Advances in Chromatography*, Vol. 1. Edward Arnold Ltd., London.
- LANNE, B. S., IVARSSON, P., JOHNSSON, P., BERGSTRÖM, G., and WASSGREN, A. B. 1989. Biosynthesis of 2-methyl-3-buten-2-ol, a pheromone component of *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytidae). *Insect Biochem.* 19:163–167.
- MANRIQUE, G., and LAZZARI, C. R. 1995. Existence of sex pheromone in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae): I-Behavioural Evidence. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 90:645–648.
- MANRIQUE, G., VITTA, A. C., FERREIRA, R. A., ZANI, C. L., UNELIUS, C. R., LAZZARI, C. R., DIOTAIUTI, L., and LORENZO, M. G. 2006. Chemical communication in Chagas disease vectors. Source, identity, and potential function of volatiles released by the metasternal and Brindley's glands of *Triatoma infestans* adults. *J. Chem. Ecol.* 32:2035–2052.
- MARTIN, D., BOHLMANN, J., GERSHENZON, J., FRANCKE, W., and SEYBOLD, S. J. 2003. A novel sex-specific and inducible monoterpene synthase activity associated with a pine bark beetle, the pine engraver, *Ips pini*. *Naturwissenschaften* 90:173–179.
- MONTEIRO, F. A., BARRETT, T. V., FITZPATRICK, S., CORDON-OSALES, C., FELICIANGELI, D., and BEARD, C. B. 2003. Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. *Mol. Ecol.* 12:997–1006.
- ONO, M., TERABE, H., HORI, H., and SASAKI, M. 2003. Components of giant hornet alarm pheromone. *Nature* 424:637–638.
- ONO, M. 2005. Semiochemicals that regulate social behaviour of hornets. *Aroma Res.* 6:230–236.
- PHELAN, P. L., and LIN, H. 1991. Chemical characterization of fruit and fungal volatiles attractive to dried-fruit beetle, *Carpophilus hemipterus* (L.) (Coleoptera: Nitidulidae). *J. Chem. Ecol.* 17:1253–1272.
- PROKOPY, R. J., PHELAN, P. L., WRIGHT, S. E., MINALGA, A. J., BARGER, R., and LESKEY, T. C. 2001. Compounds from host fruit odor attractive to adult plum curculios (Coleoptera: Curculionidae). *J. Entomol. Sci.* 36:122–134.
- ROJAS, J. C., RÍOS-CANDELARIA, E., CRUZ LÓPEZ, L., SANTIESTEBAN, A., BOND-COMPEAN, J. G., BRINDIS, Y., and MALO, E. A. 2002. A reinvestigation of Brindley's gland exocrine compound of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Entomol.* 39:256–265.
- RÍOS-CANDELARIA, E. 1999. Análisis químico y conductual de los compuestos volátiles emitidos por *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae), vector de la enfermedad de Chagas. PhD dissertation. Universidad Autónoma de Chiapas, México.
- SCHLYTER, F., BIRGERSSON, G., BYERS, J. A., and BAKKE, A. 1992. The aggregation pheromone of *Ips duplicatus* and its role in competitive interactions with *I. typographus*. *Chemoecology* 3:103–112.

- SCHOFIELD, C. J. 1994. *Triatominae, biología y control*. Euro-communic Publications, United Kingdom.
- SEYBOLD, S. J., HUBER, D. P. W., LEE, J. C., GRAVES, A. D., and BOHLMANN, J. 2006. Pine monoterpenes and pine bark beetles: a marriage of convenience for defense and chemical communication. *Phytochem. Rev.* 5:143–178.
- STAVINOHA, J. L., MARIANO, P. S., LEONE-BAY, A., SWANSON, R., and BRACKEN, C. 1981. Photocyclizations of N-allyliminium salts leading to the production of substituted pyrrolidines. *J. Am. Chem. Soc.* 103:3148–3160.
- VEITH, H. J., KOENIGER, N., and MASCHWITZ, U. 1984. 2-Methyl-3-butene-2-ol, a major component of the alarm pheromone of the hornet *Vespa crabro*. *Naturwissenschaften* 71:328–329.
- WALLBANK, B. E., and WATERHOUSE, D. F. 1970. The defense secretions of *Polyzosteria* and related cockroaches. *J. Insect Physiol.* 16:2081–2096.
- WARD, J. P. 1981. A comparison of the behavioural responses of the haematophagous bug, *Triatoma infestans* to synthetic homologues of two naturally occurring chemicals (n- and isobutyric acid). *Physiol. Entomol.* 6:325–329.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2005. Report of the Scientific Working Group on Chagas Disease. <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/default.htm>.
- ZERBA, E. N. 1999. Susceptibility and resistance to insecticides of Chagas disease vectors. *Medicina-Buenos Aires* 59:41–46.



Considerações finais

4- Considerações finais

O comportamento sexual dos triatomíneos tem sido estudado fundamentalmente de maneira descritiva (Lima, XXXX; Manrique & Lazzari, 1994; Pires et al. 2004). Sabe-se que os machos de várias espécies de triatomíneos mostram um comportamento típico de salto frente à presença de outros indivíduos e através do qual iniciam suas tentativas de cópula (Manrique & Lazzari, 1994; Pires et al., 2004). Os mesmos autores relatam que freqüentemente as fêmeas de triatomíneos rejeitam as tentativas de cópula dos machos, e sugerem que mediante esse mecanismo as fêmeas possam escolher parceiros sexuais que lhes garantam uma melhor descendência. Ainda nestes trabalhos, foi descrito que as fêmeas apresentam vários tipos de comportamentos de rejeição de tentativas de cópula, cuja freqüência parece variar entre as diferentes espécies estudadas. Porém, a utilização de sinais químicos durante este processo de interação entre sexos nunca foi posta em evidência.

A existência de processos de comunicação química no contexto sexual é pouco conhecida. Sabe-se apenas que machos de *R. prolixus* e *T. infestans* agregam em torno de casais em cópula (Baldwin et al 1971; Manrique & Lazzari, 1995). Esses autores sugerem que essas agregações de machos são mediadas por sinais químicos emitidos durante a cópula. Aparentemente, as fêmeas de *T. infestans* realizam cópulas sucessivas com vários dos machos que fazem parte dessas agregações (Lazzari, comunicação pessoal). O mesmo fato parece acontecer com fêmeas de *R. prolixus* (dados não publicados). Por outro lado, fêmeas de *P. megistus* normalmente não realizam mais de uma cópula na sua vida adulta. Portanto, parecem existir diferentes estratégias reprodutivas entre as fêmeas de algumas das espécies deste grupo.

Os trabalhos existentes na literatura que analisam o comportamento dos insetos da subfamília Triatominae não descrevem nenhum processo de comunicação que medeie o encontro de machos e fêmeas a longa ou curta distância. Isto é devido à falta de estudos que tenham testado tais hipóteses em desenhos experimentais adequados, como por exemplo, olfatômetros ou túneis de

vento. A possibilidade de existir orientação em voo mediada por odores nunca foi estudada em triatomíneos. Num trabalho paralelo, temos demonstrado que machos de *R. prolixus* aumentam a atividade de voo em presença de odores de fêmeas virgens (Pontes et al, em preparação). Além disso, os machos desta espécie iniciam o voo com aparente anemotaxia positiva somente em presença de correntes de ar que carregam odores de fêmea (Pontes et al., em preparação).

O presente estudo descreve a identidade química dos compostos produzidos pelas GMs de *R. prolixus* e estabelece uma ligação entre estas secreções altamente voláteis e a comunicação sexual destes insetos. A identificação química juntamente com a caracterização da quiralidade dos compostos é de extrema importância em qualquer estudo envolvendo feromônios, uma vez que é possível que apenas um dos isômeros de um determinado composto seja biologicamente ativo (Mori, 1989).

Alguns dos compostos identificados neste trabalho já foram descritos como feromônios de agregação, alarme ou como parte de substâncias de defesa de outras espécies de insetos de diversas ordens como Coleóptera, Hymenoptera e Diptera (PheroBase, 2007). Estes dados ressaltam a importância desses compostos como substâncias biologicamente ativas responsáveis, em alguns dos casos, pela transferência de informações entre indivíduos destas ordens.

Os resultados do presente estudo mostraram que alguns dos compostos produzidos pelas GMs são emitidos espontaneamente por adultos virgens dos dois sexos. Porém, esta emissão foi visivelmente mais intensa em fêmeas e durante a fase escura do seu ciclo diário. A possibilidade de que exista um comportamento de “chamada” química nesta espécie permite propor novas hipóteses que poderão ser testadas de maneira experimental. É possível, por exemplo, testar se fêmeas cujas glândulas metasternais foram previamente ocluídas mantêm a atratividade frente a machos, como demonstrado anteriormente nos experimentos de voo.

Além disso, a redução do sucesso da cópula na ausência de odores produzidos pelas glândulas metasternais de machos e de fêmeas,

separadamente, parece indicar que existem processos de reconhecimento sexual entre indivíduos de ambos os sexos. O aprofundamento desses estudos permitirá compreender melhor as interações entre indivíduos de diferentes sexos e determinar a real relevância dos odores emitidos por fêmeas e machos neste contexto.

A variedade dos compostos identificados, o fato de que preferencialmente fêmeas emitem espontaneamente os compostos das GMs durante a noite, e de que na ausência destes o sucesso da cópula é fortemente reduzido, parece sugerir que a comunicação química entre machos e fêmeas de *R. prolixus* seja mediada por odores destas glândulas tanto a longa como a curta distância.

Diante destes resultados, ainda se faz necessário testar a atratividade dos compostos das GMs em ensaios de olfatométrie e túneis de vento. É necessário determinar se há orientação a estes odores durante o vôo destes insetos, o que demonstraria a existência de mecanismos de orientação a longa distância. Ainda, é preciso caracterizar possíveis respostas de orientação anemotática em olfatômetros para determinar se há uso de odores em fases subseqüentes da seqüência comportamental que leva a realização da cópula. Além disso, estudos de eletrofisiologia serão necessários para a compreensão dos mecanismos envolvidos na resposta dos receptores antenais. Estes estudos podem permitir estabelecer perfis de dose-resposta para aqueles compostos das GMs capazes de estimular receptores olfativos. A obtenção de tais perfis é importante para poder formular misturas de odores em concentrações adequadas à fisiologia desta espécie. Isso é relevante porque, potencialmente, compostos das GMs que se mostrem biologicamente ativos poderão ser utilizados na preparação de iscas químicas para a captura ou detecção de adultos de *R. prolixus*.

Iscas químicas são utilizadas para a detecção e o controle de inúmeras espécies de insetos. No caso dos triatomíneos, tais ferramentas poderiam ser utilizáveis em associação com armadilhas ou em dispositivos que simplesmente detectem a presença de adultos. Além disso, feromônios sexuais podem potencialmente servir ao desenho de estratégias de confundimento sexual. Novas

ferramentas de controle de vetores são necessárias e poderão ajudar aos programas destinados a evitar a transmissão da doença de Chagas. Essas novas opções de controle são particularmente relevantes para aquelas espécies que já demonstraram ter desenvolvido resistência a inseticidas (Zerba, 1999).



Referências Bibliográficas

5-Referências Bibliográficas

BALDWIN, W. F., KNIGHT, A. G., & LYNN, K. R. 1971. A sex pheromone in the insect *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Can. Ent.* 103:18-22.

BARTH, R. 1980. A glândula ectodermal do aparelho copulador do *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 75: 119-124.

BLUM, M. S. 1969. Alarm Pheromone. *Ann. Rev. Entomol.* 14: 57-80.

BORDEN, J. H., CHONH, L., McCLEAN, J. A., SLESSOR, K. N., & MORI, K. 1976. *Gnathotrichus sulcatus*: Synergistic response to enantiomers of the aggregation pheromone sulcatol. *Science.* 192:894-896.

BORDEN, J. H., HANDLEY, J. R., McCLEAN, S. A., SILVERSTEIN, R. M., CHONG, L., SLESSOR, K. N., JOHNSTON, B. D., & SCHULER, H. R. 1980. Enantiomer-based specificity in pheromone communication by two sympatric *Gnathotrichus* species (Coleoptera: Scolytidae). *J. Chem. Ecol.* 6:445-455.

BRINDLEY, M. D. H. 1930. On the metasternal scents-glands of certain Heteroptera. *Trans. Ent. Soc. Lond.* 78 (II): 199-208.

BYRNE, K. J., SWIGAR, A. A., SILVERSTEIN, R. M., BORDEN, J. H., & STOKKINK, E. 1974. Sulcatol: Population aggregation in the scolytid beetle, *Gnathotrichus sulcatus*. *J. Insect Physiol.* 20:1895-1900.

CRUZ LÓPEZ, L., MORGAN, E.D., & ONDARZA, R.N. 1995. Brindley's gland exocrine products of *Triatoma infestans*. *Med. Vet. Ent.* 9: 403-406.

DAVID, C. T. & BIRCH, M. C. 1989. Pheromones and insect behavior. P. 17-35. *In*: Jutsum, A. R. & Gordon, R.F. S. (eds.), *Insect pheromone in plant protection*. John Wiley & Sons, New York. 369 p.

DICKE, M. & SABELIS, M. W. 1988. Infochemical terminology: should it be based in cost-benefit analysis rather than origin of compounds? *Funct. Ecol.* 2:131-139.

DUSENBERY, D. B. 1992. Sensory Ecology: how organisms acquire and respond to information. Freeman W. H. (ed.), New York, USA, p.558.

EICEMAN, G. A. 2000. Gas Chromatography. In: R.A. Meyers (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory, and Instrumentation*, pp. 10627. Chichester: Wiley.

FERREIRA, J. T. B. 2001. A estrutura química: Código de comunicação. In: E. F. & Della Lucia, T. M. C. (eds.), *Feromônios de insetos*. Vilela, Rolos, Ribeirão Preto.

GAMBOA, C. J. 1963. Comprobación de *Rhodnius prolixus* extradomiciliado en Venezuela. *Bol. Oficina. Sanit. Panamer.* 54, 18-25.

GUERENSTEIN, P. G. & GUERIN, P. M. 2004. A comparison of volatiles emitted by adults of three triatomine species. *Ent. Exp. et Applicata.* 111: 151-155.

LEHANE M. J. & SCHOFIELD C. J. 1976. Preliminary report on flight by some triatomine bugs. *Transac. Royal Society of Trop. Medic. and Hyg.* 70: 520.

LENT, H. & WYGODZINSKY, P. 1979. Revision of the Triatominae (Reduviidae, Hemiptera) and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 163, 125-520.

MANRIQUE, G. & LAZZARI, C.R. 1994. Sexual behaviour and stridulation during mating in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 89(4):629-33.

MANRIQUE, G. & LAZZARI, C.R. 1995. Existente of sex pheromone in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae): I-Behavioural Evidence. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 90(5): 645-648.

MANRIQUE, G., VITTA, A. C., FERREIRA, R. A., ZANI, C. L., UNELIUS, C. R., LAZZARI, C. R., DIOTAIUTI, L., & LORENZO, M. G. 2006. Chemical communication in Chagas disease vectors. Source, identity, and potential function of volatiles released by the metasternal and Brindley's glands of *Triatoma infestans* adults. *J. Chem. Ecol.* 32(9):2035-52.

MORI, K. 1989. Synthesis of optically active pheromone. *Tetrahedron.* 45(11):3233-3298.

NOIREAU, F. & DUJARDIN, J. P. 2001. Flight and nutritional status of sylvatic *Triatoma sordida* and *Triatoma guasayana*, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 96 (3): 385–389.

ONDARZA, R. N., MARTÍNEZ-GUTIÉRREZ, A., & MALO, E. A. 1986. Evidence for the presence of sex and aggregation pheromones from *Triatoma mazzottii* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Econom. Ent.* 79 (3):689-692.

ONDARZA, R. N., MARTÍNEZ-GUTIÉRREZ, A., MALO, E. A. & ROJAS, J. C. 1987. Actividad afrodisiaca de la feromona sexual *Triatoma mazzottii* Usinger. *Southw. Ent.* 12 (4):327-333.

PIRES, H.H., LORENZO, M.G., LAZZARI, C.R., DIOTAIUTI, L. & MANRIQUE, G. 2004. The sexual behaviour of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae): an experimental study. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 99(3):295-300.

PHEROBASE. 2007. Database of insects pheromones and semiochemicals. <http://www.pherobase.com/database/compound>. Acessado em 02 de janeiro, 2007.

ROJAS, J.C., MALO, E. A, MARTÍNEZ-GUTIÉRREZ, A. & ONDARZA, R. N. 1990. Mating Behavior of *Triatoma mazzottii* (Hemiptera: Reduviidae) Usinger. *Ann. Ent. Society of America*. 83(3):598-602.

ROJAS, J.C., RIOS-CANDELARIA, E., CRUZ LÓPEZ, L., SANTIESTEBAN, A., BOND-COMPEAN, J. G., BRINDIS, Y., & MALO, E. A. 2002. A reinvestigation of Brindley's gland exocrine compound of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Ent.* 39(2):256-265.

ROSSITER, M. & STADON, B. W. 1983. 3-Methyl-2-hexanone from the triatominae bugs *Dipetalogaster maximus* (Uhler) (Heteroptera: Reduviidae). *Experientia*. 39:256-265.

SANDOVAL, C. M., GUTIÉRREZ, S. L., AMAYA, M., ESTEBAN, L., ARIZA, H., & ANGULO, V. M. 2000. High density of *Rhodnius prolixus* in a rural house in Colombia. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 94: 372-373.

SCHOFIELD, C. J. 1994. *Triatominae, biología y control*. United Kingdom: Eurocommunica Publications, 79p.

SCHOFIELD, C. J. & DUJARDIN, J. P. 1999. Theories on the evolution of *Rhodnius*. *Actual Biol.* 21(71), 183-197.

SHOREY, H. H. 1973. Behavioral Responses to Insect Pheromones. *Ann. Rev. of Entomol.* 18: 349-380.

SJOGREN, R.D. and RYCKMAN, R.E. 1966. Epizootiology of *Trypanosoma cruzi* in southwestern North America. 8. Nocturnal flights of *Triatoma protracta* (Uhler) as indicated by collections at black light traps (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *J. Me.d Entomol.* 3(1):81-92.

VALENTE, A. L. P. & AUGUSTO, A. 1999. Microextração por fase sólida. *Química nova*. 23(4):523-530.

WARD, J. P. 1981. A comparison of the behavioural responses of the haematophagous bug, *Triatoma infestans* to synthetic homologues of two naturally occurring chemicals (*n*- and isobutyric acid). *Physiol. Entomol.* 6:325-329.

WEIRAUCH, C. 2003. Glandular areas associated with the male genitalia in *Triatoma rubrofasciata* (Triatomine, Reduviidae, Hemiptera) and other Reduviidae. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 98(6):773-776.

WHO (2005). Report of the Scientific Working Group on Chagas Disease Buenos Aires, Argentina 17-20 April 2005. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/default.htm> (acesso em 1 de dezembro de 2006).

WIGGLESWORTH, V. B. 1950. The Principles of Insect Physiology. 4th edition, pp 544.

ZERBA, E. N. (1999). Susceptibility and resistance to insecticides of Chagas disease vectors. *Medicina-Buenos Aires* 59:41-46.

“Foi o tempo que dedicaste a tua rosa, que fez da tua rosa tão importante.”

Antoine de Saint-Exupéry