

Capítulo 15

Investigación, desarrollo y
escalamiento de feromonas
de insectos

Chapter 15

Research, development and
scaling of insect pheromones

Felipe Borrero-Echeverry¹

¹ Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA)

Contenido

Introducción746

Desarrollo de bioensayos747

Aislamiento de feromonas748

Caracterización y síntesis de feromonas751

Formulación753

Validación757

Agradecimientos757

Referencias758

Resumen

Durante los últimos 50 años las feromonas se han establecido en el mercado como componentes fundamentales de las estrategias de manejo integrado de plagas y de vigilancia fitosanitaria. El proceso de investigación y desarrollo de las feromonas para el control de insectos fue establecido en la década de los setenta y ha cambiado poco desde entonces. Este proceso se basa en el desarrollo de bioensayos, el aislamiento de feromonas, la caracterización e identificación de los compuestos que hacen parte de estas, la síntesis química de los compuestos, su formulación y la validación en condiciones de laboratorio y de campo. Este capítulo reseña este proceso y menciona los métodos más comunes que se utilizan en la actualidad.

Palabras clave

Aislamiento de feromonas, análisis y síntesis químico, bioensayos, dispensadores de feromona, formulación

Abstract

Over the past 50 years pheromones have become established in the market as integral parts of integrated pest management, and phytosanitary vigilance programs. The research and development process for the development of insect pheromones for pest control was established in the 70s and has remained mostly the same since. This procedure is based on the development of bioassays, the extraction of the pheromone, it's characterization and identification of the chemical compounds, the synthesis of these compounds, their formulation into appropriate dispensers, and finally, its validation under laboratory and field conditions. This chapter provides an overview of this process and the most common methods used to date.

Keywords

Bioassays, chemical analysis and synthesis, formulation, pheromone dispensers, pheromone isolation

Introducción

Las feromonas son compuestos químicos utilizados por organismos (en este caso, insectos) en la comunicación intraespecífica (ver Capítulo 8 para más información sobre las feromonas y sus usos en el control de plagas). Desde la caracterización de la primera feromona —la del gusano de la seda *Bombyx mori*, por Adolf Butenandt en 1959 (Butenandt, Beckmann, Stamm, & Hecker, 1959)—, el proceso de

investigación y desarrollo de feromonas ha cambiado poco, a pesar de los grandes desarrollos tecnológicos. A grandes rasgos, el proceso consiste en el desarrollo de un bioensayo confiable, el aislamiento de la feromona, su caracterización química, su verificación, síntesis, formulación y validación en laboratorio y en campo. A continuación, se describe el proceso paso a paso (figura 15.1).

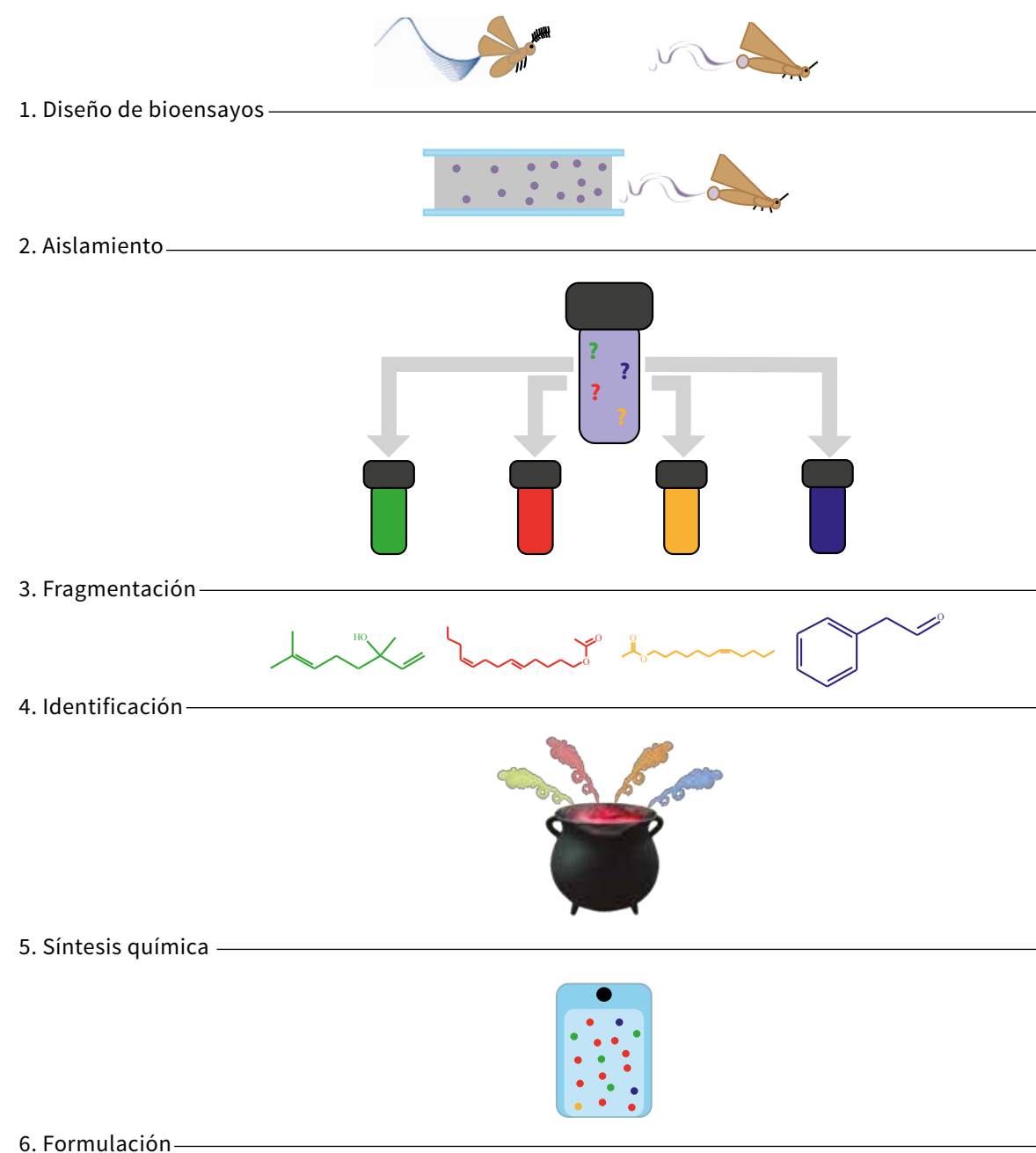


Figura 15.1. Esquema simplificado del proceso de investigación y desarrollo de feromonas.

Fuente: Elaboración propia

Desarrollo de bioensayos

El bioensayo —primer paso en la investigación y desarrollo de las feromonas— es también uno de los procedimientos más importantes a lo largo del desarrollo de estas, pues es, además, el método de verificación de su funcionamiento. El diseño de los bioensayos depende de la biología y ecología de la especie estudiada, sin embargo, independientemente del diseño, debe cumplir con ciertos requerimientos.

En el desarrollo de feromonas comerciales, todos los bioensayos deben demostrar atracción intraespecífica de forma consistente y reproducible. Según la especie, también es importante que se puedan diferenciar los comportamientos relacionados con dicha atracción y con el comportamiento sexual, por ejemplo, la activación (un comportamiento característico cuando un insecto percibe la feromona por primera vez), los patrones de locomoción particulares y los comportamientos de cortejo. Además, estos bioensayos deben asegurar que los insectos respondan a señales químicas liberadas por conespecíficos y no a otros estímulos (visuales, táctiles, auditivos, etc.). Normalmente, esto se logra mediante el aislamiento de los insectos que están liberando la feromona detrás de una malla o rejilla de poro lo suficientemente gruesa (~ 1 mm) que permita el flujo de aire sin crear turbulencia.

Finalmente, el sistema debe estar libre de contaminantes volátiles (olores ambientales) que puedan influenciar el comportamiento de los insectos, lo cual se logra con filtros de carbón activado para purificar el aire utilizado en los bioensayos.

Dos de los métodos de bioensayo más comunes en el estudio de feromonas son los olfatómetros en Y (*Y-tube* o *Y-maze*, en inglés) y los túneles de viento. El principio de ambos es el mismo. Ambos son sistemas cerrados con una corriente de aire controlada y continua que arrastra olores hacia el insecto que se está evaluando. El olfatómetro en Y está diseñado para evaluar insectos que caminan y, por su forma, permite evaluar la preferencia de un insecto hacia uno de dos olores (aunque, cuando se evalúan feromonas, normalmente se evalúa la feromona contra aire puro) (figura 15.2A). Los túneles de viento, por su parte, suelen ser más grandes, ya que se utilizan en ensayos

con insectos voladores, que requieren de más espacio para moverse (figura 15.2B). Cabe resaltar que, en ensayos con insectos voladores muy pequeños, se han utilizado olfatómetros en Y. También existen diferentes tipos de olfatómetros (cuadrados, de cuatro brazos, etc.), los cuales suelen ser diseñados por los investigadores para responder a preguntas concretas o para trabajar con un tipo de insecto en particular (Howse, Stevens, & Jones, 2013).

La selección del bioensayo apropiado para una investigación depende del insecto que se quiera estudiar. Algunos de los factores importantes que se deben tener en cuenta al diseñar el bioensayo son las condiciones ambientales, el comportamiento de llamado del insecto (liberación de feromona), el comportamiento de respuesta de individuos conespecíficos, el periodo de actividad, el estado de madurez y fisiológico de los insectos, y las condiciones físicas en las cuales los insectos llevan a cabo el comportamiento.

Las condiciones ambientales —principalmente, la humedad relativa (Royer & McNeil, 1993; Webster & Cardé, 1982), la intensidad lumínica, la temperatura (Cardé & Roelofs, 1973; Schal & Cardé, 1986) y la presión atmosférica (para los insectos voladores) (Marchand & McNeil, 2000; Pellegrino et al., 2013)— son sumamente importantes, ya que si estas se salen de los rangos apropiados para la especie, se incrementa la variabilidad o se puede inhibir por completo el comportamiento de llamado o la respuesta a la feromona. De manera similar, cada especie tiene un periodo de llamado propio. Algunas de ellas liberan feromonas a lo largo de todo su periodo activo, mientras que otras solo las liberan durante cortos periodos del día o de la noche (Fatzinger, 1973; Hammack, 1995; Landolt & Sivinski, 1992). Fuera de estos periodos, es poco probable que los insectos receptores respondan a la feromona de forma adecuada, aunque la haya en el ambiente.

Del mismo modo, cada especie llega a la madurez sexual en diferente momento. Si los individuos son muy jóvenes o viejos, la producción de feromona puede ser muy baja o su composición puede estar errada (Shorey, McFarland, & Gaston, 1968; Spurgeon,

2003). Por otra parte, el sistema olfativo de los insectos puede estar subdesarrollado en adultos jóvenes o deteriorado en adultos viejos (Boughton & Fadamiro, 1996; Haniotakis & Pittara, 1994; Ó'Ceallacháin & Ryan, 1977). Finalmente, el estado fisiológico de los insectos es importante, por ejemplo, la hidratación es fundamental para el comportamiento adecuado de estos, mientras que la alimentación puede ser menos importante, dado que muchos de ellos no necesitan alimentarse en estado adulto (Landolt & Sivinski, 1992; Lebreton et al., 2015; Saveer et al., 2012).

Aislamiento de feromonas

Luego de tener un bioensayo fiable, es necesario aislar la feromona para su posterior análisis químico. Existen

muchos métodos para aislar las feromonas volátiles, que se aplican según el tipo de insecto y de las capacidades de análisis químico que se tengan disponibles. Los insectos producen feromonas en cantidades sumamente bajas (nanogramos/min o inclusive picogramos/min), por lo que es necesario que el método utilizado logre capturar una cantidad suficiente de los compuestos para que estos puedan ser detectados. Además, el método de extracción de la feromona debe tratar de reducir los contaminantes, ya sean ambientales o provenientes del insecto.

Cuando se identificó la feromona del gusano de la seda (*Bombyx mori*), esta se extrajo directamente —mediante capilaridad— de las glándulas de medio millón de hembras (Butenandt et al., 1959). Hoy en día, la extracción de feromonas directamente de las glándulas que las producen sigue siendo el método más utilizado en polillas, ya que la glándula es conspicua

y de fácil acceso, aunque ya no se hace mediante capilaridad. Actualmente, las glándulas de las polillas (o de otros insectos) se diseccionan, y la feromona se extrae en un solvente orgánico (normalmente hexano o diclorometano). De esta forma, y gracias a mejores métodos de análisis químico, el número de individuos necesarios se puede reducir a decenas o inclusive a insectos individuales (Bjostad, Gaston, & Shorey, 1980;

Saveer et al., 2014). Aislar feromonas directamente de las glándulas permite extraer grandes cantidades de la sustancia y, al mismo tiempo, reducir la cantidad de contaminantes provenientes del insecto. Sin embargo, este método es destructivo y no funciona para muchos tipos de insectos que no tienen glándulas de feromonas de fácil acceso o cuyo lugar de producción no se conoce (figura 15.3A).

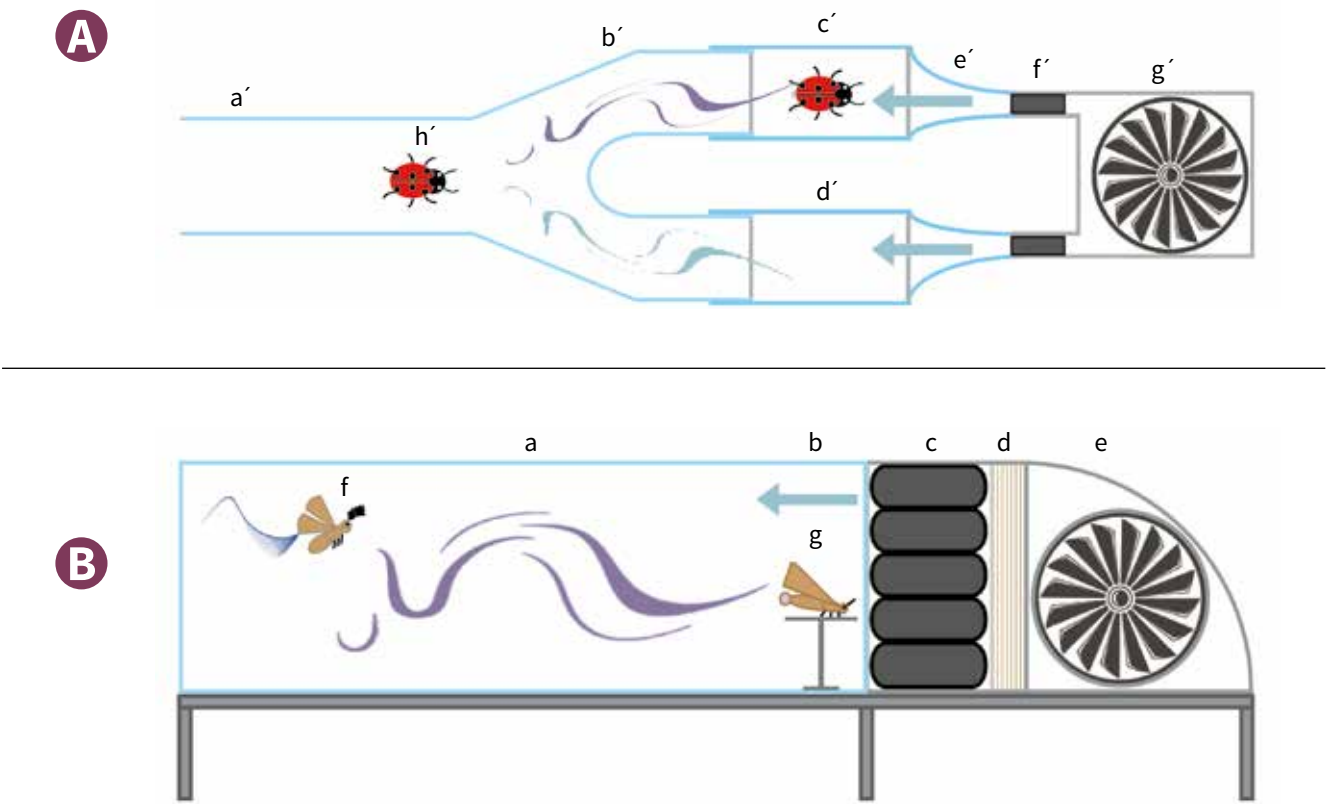


Figura 15.2. Ejemplos de bioensayos utilizados en el estudio de feromonas. A. Olfatómetro en Y: a'. Base en vidrio; b'. Bifurcación; c'. Cámara con fuente de feromona; d'. Cámara control; e'. Dirección del viento; f'. Filtro de carbón activado; g'. Ventilador o fuente de viento; h'. Insecto que responde al estímulo. B. Túnel de viento: a. Cámara de vuelo de vidrio o acrílico; b. Dirección del viento; c. Filtros de carbono activado; d. Filtro de aire de partículas gruesas; e. Ventilador graduable; f. Insecto que responde al estímulo; g. Fuente de feromona.

Fuente: Elaboración propia

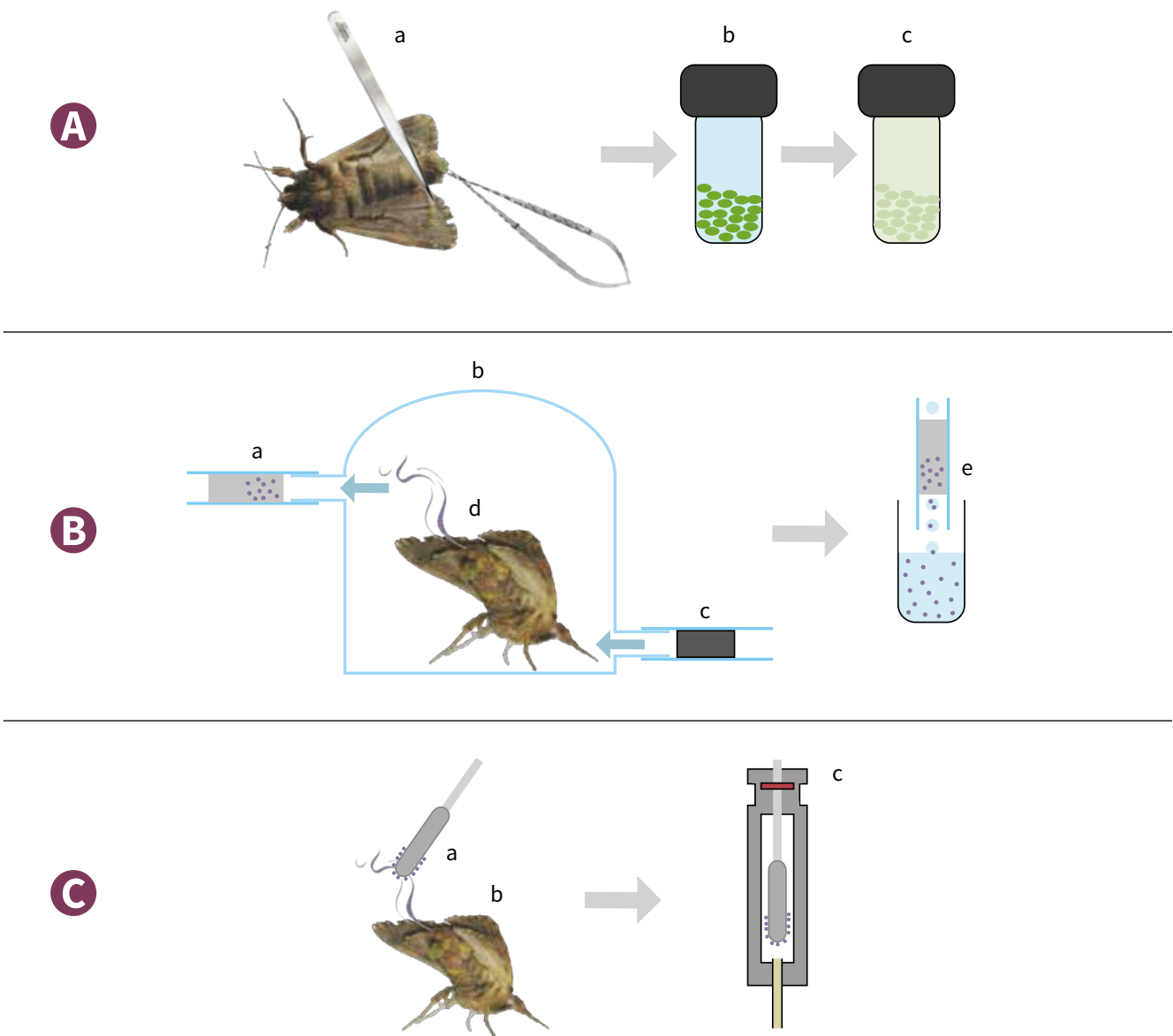


Figura 15.3. Métodos de extracción o aislamiento de feromonas. A. Disección de glándulas y extracción por solventes: a. Disección de la glándula de feromonas; b. Las feromonas son trasladadas a un vial con solvente orgánico; c. El solvente extrae el contenido y la feromona queda en solución para uso en bioensayos o análisis. B. *Dynamic headspace extraction*: a. Trampa de volátiles con matriz adsorbente; b. Recipiente sellado de vidrio; c. Filtro de carbón activado; d. insecto liberando la feromona; e. Extracción de los compuestos de la feromona por lavados de la trampa con solventes para obtener la feromona en solución. C. Aislamiento de feromona mediante SPME: a. Fibra adsorbente de microextracción por fase sólida; b. Insecto liberando feromona; c. La fibra es inyectada directamente en un cromatógrafo de gases para el análisis de la feromona.

Fuente: Elaboración propia

En el caso de estos últimos, se aplican otros métodos. Uno de ellos es el lavado de los insectos completos en solventes orgánicos. Aunque este método puede extraer la feromona, también va a extraer una gran cantidad de contaminantes, principalmente, ácidos grasos e hidrocarburos cuticulares. Este método puede ser útil para extraer feromonas no volátiles, pero no es recomendado para los compuestos volátiles. Para estos últimos se dispone hoy en día de dos métodos muy comunes para aislar las feromonas directamente del aire.

El primero de ellos es la “extracción dinámica de espacio de cabeza” (*dynamic headspace extraction*, DHE), que consiste en aislar los insectos en un ambiente hermético y hacer circular aire (previamente purificado con un filtro de carbón activado) dentro del recipiente. Este aire es forzado a salir a través de una trampa de volátiles que consiste en una matriz porosa adsorbente como TENAX, Super-Q (hoy en día discontinuado) o Porapak-Q. Los volátiles adsorbidos por estas trampas posteriormente se eluyen, utilizando un solvente orgánico. Al igual que los extractos glandulares, los volátiles se pueden conservar para su análisis posterior o su uso en bioensayos, lo cual no es posible con otros métodos (Blight, 1990; Rodríguez, Paliza, & Nazareno, 2017).

Esta es una de las grandes ventajas de dichas trampas, ya que idealmente siempre se debería verificar que la feromona aislada tenga el mismo efecto que aquella producida por los insectos. Sin esta verificación, es imposible estar seguros de que se aislaron todos los compuestos de la feromona, lo que puede llevar a un análisis incorrecto, con la consecuente pérdida de tiempo y de recursos.

Entre las principales desventajas de este método están las siguientes: normalmente se requieren muchos insectos para coleccionar cantidades suficientes de las feromonas, el sistema de extracción es engorroso, se requiere de electricidad —lo que resulta poco práctico en condiciones de campo— y de tiempos de muestreo de varias horas (Blight, 1990; Jones & Oldham, 1999) (figura 15.3B).

Para solucionar los inconvenientes logísticos del uso de DHE, se pueden utilizar microextractores en fase sólida

(*solid-phase microextraction*, SPME). Las fibras de SPME fueron desarrolladas por Arthur Pawliszyn y consisten en fibras de dióxido de silicio (sílica) recubiertas con una capa delgada de un polímero absorbente líquido como el polidimetilsiloxano (PDMS) o de un adsorbente sólido (Pawliszyn, Pawliszyn, & Pawliszyn, 1997). Estas fibras coleccionan moléculas en el aire de forma pasiva, es decir, dependen de la difusión de las partículas en el aire. Por esta razón, la cantidad de moléculas que coleccionan es muy baja: normalmente se requiere de tiempos de colecta de varias horas o hasta de días enteros. Sin embargo, tales fibras se han utilizado exitosamente para coleccionar y aislar feromonas de muchos insectos, bien de insectos individuales —colocando la fibra cerca de la glándula de feromona—, bien de grupos de insectos —aislándolos para aumentar la cantidad de feromona en el aire— (Borg-Karlson & Mozuraitis, 1996; Malosse, Ramirez-Lucas, Roach, & Morin, 1995; Wang, Geertsema, Van Nieuwerkerken, & Löfstedt, 2015).

Como alternativa, varios estudios han usado las fibras de SPME de forma directa —frotando las glándulas expuestas con la fibra— y han obtenido resultados similares a aquellos que se obtienen mediante la extracción con solventes (Gago et al., 2013; Millar et al., 2010). Sin embargo, una de las dificultades más grandes de este método es la fragilidad de las fibras, pues el contacto directo puede dañar su recubrimiento o la fibra misma.

Otros problemas de este método son, por un lado, su alto costo —las fibras cuestan cerca de US\$300 cada una (aunque pueden reutilizarse)— y, por otro, que, una vez utilizadas, se debe analizar la muestra lo más pronto posible para evitar su contaminación (Pawliszyn et al., 1997) (figura 15.3C). Una alternativa reciente para reducir el costo del uso de las fibras de SPME —en especial, para uso directo— es la utilización de fibras ópticas desechables recubiertas con PDMS. A estas se les hace una extracción por solventes después de ser utilizadas, con lo cual se llega a resultados similares a los de los métodos de extracción directa de las glándulas y a aquellos en los que se usa DHE (Dynamic Headspace Extraction). Estas fibras desechables permiten hacer extracciones rápidas a una gran cantidad de individuos, a bajo costo (Lievers & Groot, 2016).

Caracterización y síntesis de feromonas

La caracterización de las feromonas requiere que los compuestos individuales de la muestra aislada sean separados para su posterior identificación. Cuando se inició el estudio de las feromonas de los insectos, se utilizaron métodos como la destilación, para separar los compuestos más volátiles de los ácidos grasos más pesados, y la cromatografía de capa fina, para separar los diferentes compuestos gracias a diferencias en su polaridad (Carlson et al., 1972). Las bandas generadas en las placas se extraían utilizando solventes para su posterior identificación. Desde mediados de los años sesenta, se comenzó a utilizar la cromatografía de gases (GC, por su sigla en inglés) para separar los compuestos y obtener el tiempo de retención y la cantidad relativa de cada uno mediante un detector de ionización de llama (FID, por su sigla en inglés). La desventaja de la GC es que es un método destructivo, es decir, la muestra no se puede recuperar y reutilizar. Sin embargo, su gran sensibilidad, rapidez y versatilidad (dado que se pueden utilizar columnas diferentes para separar compuestos de diferentes tipos, como isómeros E/Z y R/S) han llevado a que sea el método estándar hoy en día (Blight, 1990; Howse et al., 2013; Lanucara, Holman, Gray, & Evers, 2014).

La identificación de los compuestos se puede llevar a cabo mediante métodos químicos y físicos. El método o métodos utilizados depende de la complejidad y la naturaleza del compuesto de interés. Dentro de los métodos físicos, el más común, gracias a su sensibilidad, es la espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases (GC-MS, por sus siglas en inglés). La espectrometría de masas da información sobre el peso molecular, la composición elemental de la molécula y su estructura. Este método rompe las moléculas a través de impactos con electrones para formar un patrón de cationes (el espectrómetro), cada uno con una relación de masa/carga eléctrica (m/z) específica. Una vez obtenidos, los espectrómetros pueden ser analizados por un experto o comparados con librerías de espectrómetros —la del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, por su sigla en inglés) es la más común— (Blight, 1990). En esta comparación se tiene la probabilidad de que el espectrómetro obtenido sea igual al de compuestos

conocidos, sin embargo, aunque esta probabilidad sea alta, se debería llevar a cabo una verificación en la que se compare el espectro obtenido de la muestra con el espectro obtenido de un estándar sintético del compuesto.

Otros métodos incluyen la espectroscopia infrarroja (IR), la espectrometría ultravioleta-visible (UV-Vis), la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR) y la comparación de índices de retención de Kováts. La espectroscopia infrarroja es un buen método para determinar el “esqueleto” (la estructura general de la cadena de carbonos de la molécula) y potencialmente (dependiendo sobre cuál carbono estén localizados) algunos grupos funcionales. Aunque actualmente existen espectrómetros infrarrojos acoplados a cromatógrafos de gases, la mayoría de estos equipos todavía requiere de muestras puras. La espectrometría UV-Vis sirve para determinar si un compuesto tiene o no un sistema conjugado y puede ayudar a determinar el tipo de conjugación (Howse et al., 2013). La NMR es un método no destructivo que permite determinar grupos funcionales, estructura 3D y, en algunos casos, la estereoisomería. Sin embargo, requiere cantidades relativamente grandes de muestra purificada, y los espectros de moléculas grandes (en este caso feromonas no volátiles) pueden ser difíciles de interpretar (Lanucara et al., 2014).

Por último, el uso de índices de retención de Kováts puede dar información acerca del tamaño molecular, la polaridad y los grupos funcionales asociados de una molécula. Este método se basa en determinar el tiempo en el que se eluye un compuesto en un cromatógrafo de gases, en relación con los tiempos en los que se eluyen los diferentes n-alcenos. El índice de Kováts estandariza estos valores para que sean relativamente independientes de las condiciones experimentales y puedan ser comparados con listas de índices reportados para llegar a una aproximación de la identidad de un compuesto (Kováts, 1958).

Los métodos químicos suelen estar ligados al uso de GC-MS, ya que se basan en la comparación del espectrograma original con aquel que se genera luego de que la molécula sea alterada por una reacción química. A continuación, se mencionan algunas de

las reacciones más importantes en la determinación de estructura de las feromonas de los insectos: la hidrogenación catalítica rompe los enlaces dobles y triples entre átomos de carbono o en anillos epoxídicos; la ruptura de cada enlace doble agrega dos átomos de hidrógeno, lo cual incrementa el peso molecular en dos, esto permite determinar el número de estos enlaces (Navarro & Navarro, 2004); de forma similar, las reducciones con hidruros metálicos reducen, a su vez, los enlaces dobles entre átomos de carbono y átomos de oxígeno, lo que reduce aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos orgánicos a alcoholes (Gaylord, 1957). Además, existen procesos oxidativos que pueden ayudar a determinar la posición de enlaces dobles o grupos funcionales.

La ozonólisis, por su parte, rompe la cadena de carbono donde hay enlaces dobles entre átomos de carbono y genera aldehídos y cetonas en la posición en la que se encontraban estos enlaces. Así, dos (o más) moléculas resultantes suelen ser más fáciles de identificar y, a partir de estas, se puede reconstruir la molécula original (Schwartz, Raible, Mott, & Dussault, 2006). La oxidación mediante cromio (VI) afecta únicamente alcoholes primarios, secundarios y aldehídos, sin oxidar cetonas, enlaces entre carbonos o anillos aromáticos (Howse et al., 2013). Aunque existen muchos otros métodos para la identificación de compuestos de feromonas, estos son los relevantes para el objetivo de este libro. La síntesis química y biosíntesis por parte de los insectos de las feromonas es un tema complejo y específico de cada compuesto (véase Blomquist & Vogt, 2003; Jurenka, 2004; Prestwich & Blomquist, 2014). En cualquier caso, es necesario resaltar que la síntesis de feromonas a baja escala es normalmente un proceso costoso y que requiere de un escalamiento para que estas puedan ser llevadas al mercado.

En contraste, la síntesis de feromonas por parte de los insectos se lleva a cabo principalmente por reacciones enzimáticas, a partir de precursores comunes. En las polillas, por ejemplo, la mayoría de los compuestos de sus feromonas se sintetizan a partir de ácidos grasos saturados, como el ácido palmítico (16 carbonos) o sus precursores. Este precursor puede ser alargado mediante la adición de dos carbonos al extremo terminal (Zabin, 1951) o acortado mediante oxidación beta (Löfstedt & Bengtsson, 1988), para

formar ácidos grasos precursores de diferentes longitudes. Estos ácidos grasos saturados luego son convertidos en ácidos grasos mono o poliinsaturados mediante la actividad de Δ desaturasas (Liénard et al., 2008; Liénard et al., 2014; Löfstedt & Bengtsson, 1988). La biosíntesis de feromonas es un tema extenso y que varía mucho en los diferentes órdenes de insectos. Para más información sobre la biosíntesis de las feromonas en otros grupos de insectos, se recomienda el trabajo de Jurenka (2004).

Una vez sintetizada una feromona, es importante volver al bioensayo estandarizado para verificar que los compuestos puros, sintetizados, tengan la misma actividad que los compuestos originalmente aislados. Una de las dificultades de este proceso es que muchas de las feromonas de los insectos no son un solo compuesto, sino una mezcla de varios en proporciones específicas (Andersson et al., 2009; Bartelt et al., 2009; Batista-Pereira et al., 2006; Bengtsson et al., 2014; Gries et al., 2015). El resultado obtenido por cromatografía de gases da las cantidades relativas de los compuestos en la muestra, es decir, permite conocer su proporción. Sin embargo, que un compuesto se encuentre en la muestra no significa que sea parte de la feromona. En 1957, Schneider y Kaissling (1957) desarrollaron la electroantenografía (EAG) para solucionar este problema. La electroantenografía consiste en conectar la antena de un insecto, su principal órgano olfativo, a dos electrodos para medir los impulsos nerviosos que genera o no genera esta cuando es expuesta a un olor en particular. De esta forma, se puede saber si un insecto tiene la capacidad de detectar un compuesto o no. Hoy en día, es común que los equipos de EAG estén acoplados a cromatógrafos de gases (gas-chromatographic-electroantennogram detector, GC-EAD, por sus siglas en inglés), lo que permite determinar cuáles compuestos dentro de una muestra son percibidos por la antena y cuáles no (figura 15.4).

No obstante, el hecho de que una antena responda a un compuesto dentro de la mezcla no significa que el compuesto sea parte de la feromona del insecto. La antena puede estar respondiendo a contaminantes en la muestra, a precursores de la síntesis de un compuesto de la feromona o a otros compuestos que resultan de la síntesis de esta. Por ejemplo, el limoneno, compuesto responsable del olor a limón y a naranja, es percibido por varias especies de insectos (Alhmedi,

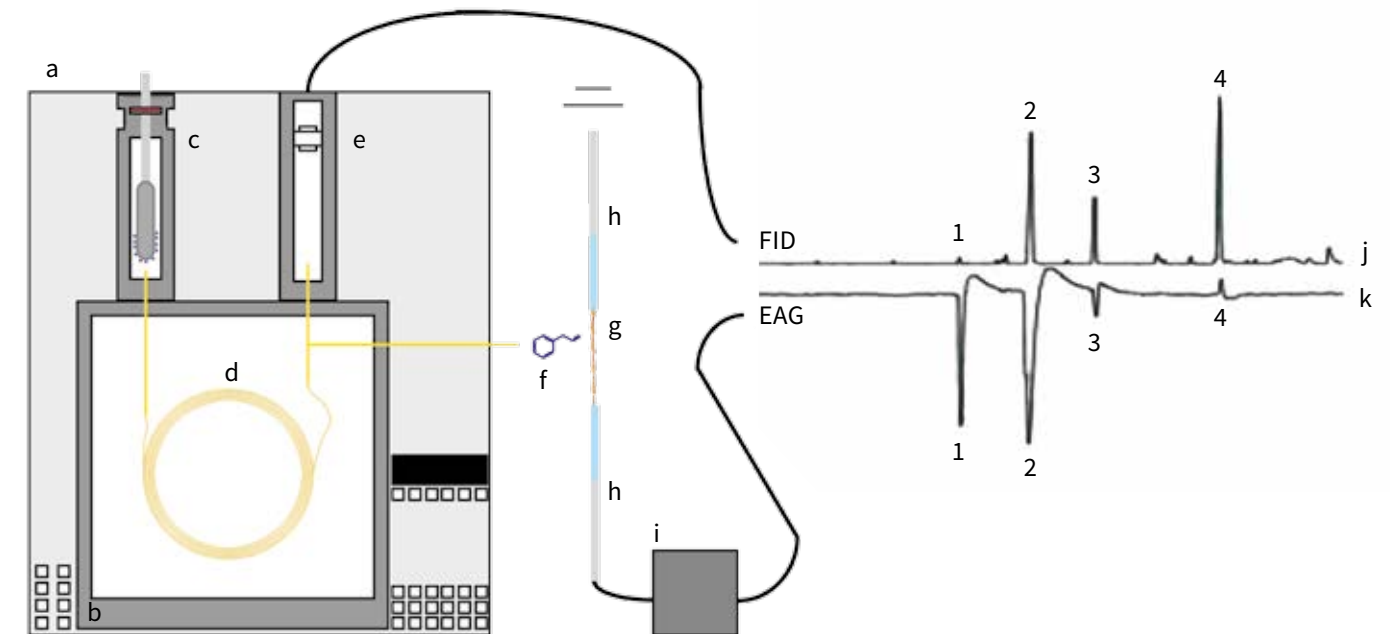


Figura 15.4. Cromatografía de gases acoplada a electroantenografía. a. Cromatógrafo de gases; b. Horno; c. Inyector; d. Columna de separación; e. Detector por ionización de llama (FID); f. Bifurcación que permite dividir los compuestos entre el FID y el electroantenógrafo; g. Antena del insecto de interés; h. Electrodos; i. Amplificador de señal IDAC; j. Trazo del FID que muestra cantidades relativas y el orden de elución de los compuestos en la muestra; k. Trazo del electroantenógrafo que muestra a cuáles compuestos responde la antena.

Fuente: Elaboración propia

Haubruge, & Francis, 2010; Borrero-Echeverry et al., 2015; Miller, 2007; Wei, Yang, Hao & Du, 2008). También es un compuesto que se encuentra en la mayoría de los detergentes y productos de limpieza, lo que lo convierte en un contaminante común en las muestras de laboratorio. Aunque el limoneno se ha encontrado en muestras de feromona de *Spodoptera littoralis* (como un contaminante), y esta polilla responde a él (Borrero-Echeverry et al., 2015), este no hace parte de la feromona de dicha especie (Saveer et al., 2014). Sin embargo, este compuesto sí hace parte de la feromona del coleóptero *Alphitobius diaperinus* (Bartelt et al., 2009). Es por esto que siempre se debe volver al bioensayo para asegurarse de que la mezcla determinada muestre una atracción similar a aquella producida por los insectos. De no ser así, la mezcla puede tener algún compuesto que no hace parte de ella, el cual puede inhibir la atracción de los insectos. Así mismo, a la mezcla le pueden faltar compuestos

o las proporciones pueden estar equivocadas (si se asume que los compuestos fueron identificados correctamente). Una vez se ha determinado cuál es la composición correcta de la feromona y los compuestos se han sintetizado, se puede pasar a la formulación de esta.

Formulación

La formulación de las feromonas depende principalmente de su función. Las formulaciones para monitoreo, captura masiva y estrategias de *lure and kill* ('atraer y matar') suelen ser más simples que aquellas usadas en estrategias de interrupción de la cópula. Sea cual fuere el uso que se le vaya a dar a la feromona, se deben tener en cuenta varios factores tanto técnicos como de mercado para su formulación.

La principal consideración técnica que se debe tener en cuenta en el proceso de formular una feromona es la mezcla que se va a utilizar. La mayoría de las formulaciones de feromonas consisten en diferentes sistemas que permiten que la feromona sea liberada lentamente a lo largo del tiempo (membranas, resinas, ceras). La consideración más importante en la formulación de feromonas es la tasa de liberación de los diferentes compuestos dentro de la mezcla. Dado que cada compuesto tiene una volatilidad diferente, relacionada directamente con el tipo de formulación, estos no necesariamente se pueden formular en la misma proporción en que fueron detectadas en las glándulas de los insectos o a través de DHE. Para lograr esto, hay que verificar la emisión de la feromona por el dispensador y modificar el contenido de cada compuesto respectivamente.

El segundo aspecto técnico que se debe tener en cuenta es la degradación de los compuestos en el dispensador. La formulación de los dispensadores debe proteger los compuestos de factores ambientales como la luz UV, la oxidación y la lluvia. Muchos compuestos que hacen parte de las feromonas de los insectos pueden ser degradados por la radiación UV o por la oxidación. Del mismo modo, muchos compuestos con isómeros no son estables y tienden a llegar a un equilibrio entre ellos (E/Z o R/S). En los dispensadores, esto debe tenerse en cuenta, de modo que se intente reducir al máximo los efectos de la radiación UV o de la oxidación en la feromona que contienen (Brown & McDonough, 1986; Cork et al., 2008; Møttus et al., 1997). También es necesario que los dispensadores ofrezcan alguna protección contra la lluvia, para que las feromonas tengan una mayor vida útil (Knight et al., 2004). Finalmente, se debe considerar la cantidad de feromona que se dosifica en el dispensador, de lo cual depende la vida útil de este.

La duración del dispensador en campo también es importante para el mercadeo de las feromonas, ya que, dependiendo de su propósito, puede ser necesario que las formulaciones duren un ciclo de cultivo entero o una fracción específica de este según la dinámica de la plaga en el sistema productivo. Una dosis más alta que la requerida significa un gasto innecesario, y una dosis muy baja, que no logre cubrir el tiempo deseado, significaría que los agricultores o agencias

de control tendrían que comprar más dispensadores, lo cual eleva los costos de esta tecnología y la hace potencialmente menos atractiva en el mercado.

También se debe tener en cuenta la sostenibilidad del producto. Hoy en día, el mercado está cambiando radicalmente hacia el uso de productos más amigables con el medioambiente. Los desechos plásticos cada vez son menos deseables, lo cual ha hecho que el desarrollo de los dispensadores de feromonas esté cambiando el uso de membranas y dispensadores plásticos por el de dispensadores biodegradables (Lance et al., 2016). Sakurada y Suzuki (2002) han patentado dispensadores genéricos biodegradables a partir de poliésteres alifáticos. Rama et al. (2011) han desarrollado dispensadores para el control de *Spodoptera littoralis* a base de celulosa y biopolímeros con buenos resultados. Hellmann et al. (2011) han desarrollado nanofibras a base de celulosa como dispensadores biodegradables, y varios grupos han trabajado con parafinas para solucionar este problema (Atterholt et al., 1999; De Lame et al., 2007).

Si bien existen varios métodos para utilizar las feromonas en el control de plagas, estos se pueden dividir, a grandes rasgos, en métodos de inundación (interrupción de la cópula) y métodos de captura (monitoreo, capturas masivas, *lure and kill*) (en el capítulo 8 de este libro, “Las feromonas en el control de insectos”, se amplían estos temas). La gran diferencia entre las dos estrategias es la cantidad de feromona que se utiliza en cada una. Las estrategias de inundación se basan en saturar el ambiente de un cultivo con feromona, lo cual requiere una cantidad muy grande de esta, mientras que las estrategias de captura utilizan puntos de liberación discretos y, por ende, cantidades menores de feromona. Estos requerimientos han sido, en consecuencia, los responsables del desarrollo y diversificación de las formulaciones de feromonas.

Para monitoreo y captura masiva, normalmente se utilizan tapones de caucho cargados de feromona o dispensadores de plástico semipermeables (figura 15.5a). La primera de estas formulaciones tiene la ventaja de ser de bajo costo. Sin embargo, por lo general, tiene una duración baja (uno o dos meses, según la carga original y la temperatura) y es susceptible a cambios en las proporciones de los

compuestos (Brown & McDonough, 1986; Møttus et al., 1997). En contraste, los dispensadores plásticos semipermeables pueden tener una cantidad mucho mayor de feromona, lo que hace que funcionen varios meses y a mayor distancia, además, le brindan mayor estabilidad a los compuestos (figuras 15.5b y 15.5c) (Baker et al., 2016).

La mayor variedad de dispensadores de feromona ha sido desarrollada para estrategias de inundación. Las estrategias de manejo que acuden a la interrupción de la cópula se utilizan, por lo general, en grandes áreas o a escala regional (Witzgall et al., 2010), lo cual implica grandes cantidades de feromona. Este problema se puede afrontar de dos formas. La primera es utilizar un número menor de dispensadores que liberen cantidades mayores de feromona (megadispositores o mesodispensadores) y la segunda es utilizar un gran número de dispensadores pequeños más ampliamente distribuidos. Ambos métodos han sido utilizados con éxito en diferentes sistemas productivos (Light, Grant, Haff, & Knight, 2017; McGhee, Gut, & Miller, 2014). La decisión sobre el tipo de dispensador dependerá, sobre todo, del área que se va a tratar y de otros costos asociados, como la mano de obra requerida (Miller & Gut, 2015).

Los megadispositores se utilizan en concentraciones de solo unas pocas unidades: 2 o 3 por hectárea. Los dispensadores MSTRS (*metered semiochemical timed release system*) liberan grandes cantidades de feromona (miligramos) en aerosol de forma automática cada cierta cantidad de tiempo (10-20 minutos), únicamente durante el periodo activo del insecto al que se quiere afectar (Baker et al., 2016; Shorey & Gerber, 1996b). Aunque estos dispensadores se han utilizado en varios sistemas (Baker et al., 1997; Shorey & Gerber, 1996a; 1996b), su alto costo (de equipos y de feromona) y los problemas con la dispersión homogénea de la feromona en el área designada (por dinámicas climáticas) han llevado a que se prefiera el uso de mesodispensadores (Baker et al., 2016). Estos últimos (± 20 dispensadores por hectárea) tienen una mejor cobertura de área y, aunque pueden ser MSTRS que liberen cantidades menores, también pueden ser dispensadores plásticos similares a los utilizados para monitoreo y capturas, que tienen mayor carga de feromona y una mayor tasa de liberación (Baker et al., 2016; Miller & Gut, 2015).

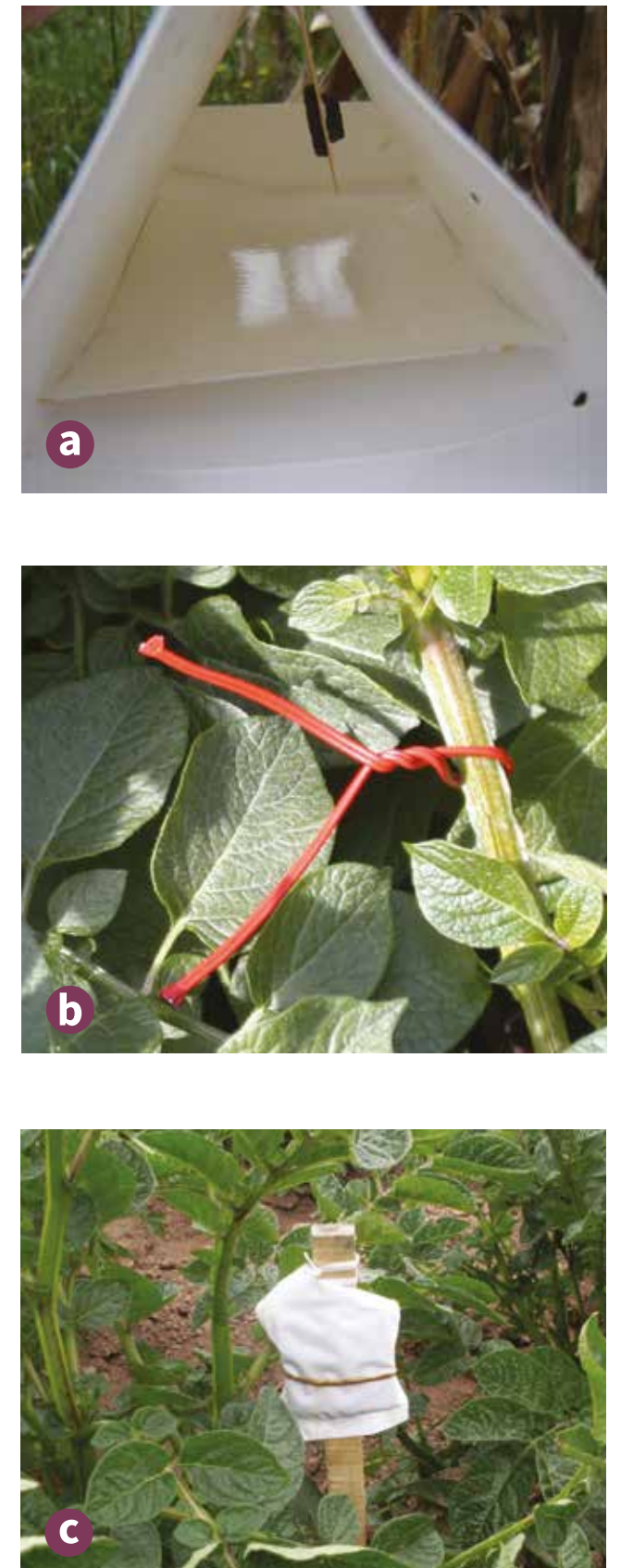


Figura 15.5. Ejemplos de feromonas formuladas. a. Tapones de caucho en una trampa pegajosa delta; b. Dispensador tipo “Rope” de Shin-Etsu Chemical; c. Dispensador de membrana semipermeable tipo “Baggie” de ChemTica International.

Las estrategias posibles si se usa un gran número de dispensadores (entre cien y millones de dispensadores por hectárea) son bastante variadas y se cuentan entre las más exitosas (Lance et al., 2016; Witzgall et al., 2010). Los dispensadores de aplicación manual (entre 100 y 1.000 por hectárea) son semejantes a aquellos que se usan para el monitoreo y captura: son de plástico o de polímeros sintéticos que emiten feromonas (varios $\mu\text{g/hora}$) durante varios meses (normalmente entre dos y seis). A pesar de su éxito, los altos costos de mano de obra en los países donde más se utilizan (Estados Unidos y varios países de Europa) han llevado a que se desarrollen formulaciones que se puedan aplicar con maquinaria.

Una de las soluciones, en este sentido, ha sido la microencapsulación de feromona en diferentes polímeros, como el alginato (Hall et al., 1982; Heuskin, Lorge, et al., 2011; Heuskin, Verheggen, Haubruge, Wathélet, & Lognay, 2011). Las feromonas microencapsuladas normalmente tienen diámetros cercanos a 30 μm (lo cual permite que se apliquen con equipos convencionales) y se utilizan en densidades de más de un millón de partículas por hectárea, que en conjunto liberan hasta 100 g de feromona y tienen una duración en campo de cerca de un mes (Hall et al., 1982; Miller & Gut, 2015). Aunque las feromonas microencapsuladas han funcionado en algunos casos, como el de la polilla oriental de las frutas (Il'Ichev et al., 2006), los resultados han sido poco consistentes. Además, por su corta duración, se requieren varias aplicaciones a lo largo de la temporada de cultivo.

Para el manejo de insectos en áreas aún más grandes (cientos de miles de hectáreas), como es el caso de la polilla gitana (*Lymantria dispar*) en los Estados Unidos, se han desarrollado formulaciones que se pueden aplicar con maquinaria de fumigación o desde el aire, como emulsiones de parafina (Atterholt et al., 1999; Onufrieva et al., 2010; Stelinski et al., 2005), nanofibras huecas de resinas poliacetiladas (Gaston et al., 1977) y escamas plásticas laminadas (hoy en día, formuladas con base en polímeros biodegradables) (Kydonieus & Beroza, 1981). La gran desventaja de estas formulaciones es su baja persistencia en el ambiente y baja adherencia al follaje, así como su deterioro por la lluvia. Aunque estas desventajas se pueden solucionar parcialmente con aditivos (adherentes y protectantes), siguen siendo obstáculo para su inserción en el mercado (Miller & Gut, 2015).

Una alternativa para los futuros desarrollos en feromonas es el uso de ingeniería genética para crear plantas que sintetizen estos compuestos de forma constitutiva. Esto permitiría proteger los cultivos de forma sostenible, ya que no sería necesaria la producción y aplicación de dispensadores. En 2015 se desarrolló la primera variedad transgénica de trigo que sintetiza la feromona de alarma de varias especies de áfidos: el (E)- β -farneceno (Bruce et al., 2015). Aunque en el laboratorio se observó un buen efecto de control mediante la repelencia de áfidos y la atracción de parasitoides, estos resultados no pudieron validarse en campo, posiblemente debido a una baja población de áfidos en campo durante el año en el que se llevó a cabo la evaluación.

Validación

Como se ha dicho antes, el efecto de toda feromona formulada debe ser validado tanto en laboratorio como en campo. Lo más importante es verificar que la feromona liberada por el dispensador sea igual de activa que la feromona producida por los insectos. También se debe evaluar la duración de los dispensadores, para tener una aproximación de su vida útil tanto en almacenamiento como en campo. Finalmente, se debe evaluar la proporción en la que se liberan los diferentes compuestos a lo largo del tiempo, ya que esta puede cambiar y se puede perder la eficacia de la feromona. Estas validaciones se deben llevar a cabo a lo largo del tiempo, en diferentes lotes de producción y diferentes tiempos de almacenamiento (Mayer & Mitchell, 1998).

Una vez validada la formulación en condiciones controladas, se deben realizar evaluaciones en campo para determinar cómo las condiciones climáticas afectan la vida útil de los dispensadores. Además, es necesario verificar que la feromona, en combinación con otras sustancias volátiles ambientales, esté funcionando de forma adecuada. Existen interacciones con los volátiles producidos por las plantas o con la polución que ocasionan modificaciones en el comportamiento de los insectos. Estas interacciones usualmente no se evidencian en el laboratorio (Borrero-Echeverry, 2016; Hatano et al., 2015; Party et al., 2013; Pregitzer et al., 2012). Además, se ha visto que las feromonas pueden variar en su composición entre diferentes poblaciones de la misma especie, lo cual significa que una feromona estudiada, formulada y verificada en una localidad puede no funcionar en otra (Batista-Pereira et al., 2006; Bengtsson et al., 2014; Unbehend et al., 2013). Por lo tanto, es necesario hacer una evaluación constante de estas para prevenir o corregir oportunamente sus deficiencias.

Agradecimientos

El autor agradece a los revisores y editores por sus contribuciones a este capítulo, y a Alba Marina Cotes por la invitación a participar como autor de este libro.

Referencias

Alhmedi, A., Haubruge, E., & Francis, F. (2010). Identification of limonene as a potential kairomone of the harlequin ladybird *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *European Journal of Entomology*, 107(4), 541-548.

Andersson, M. N., Haftmann, J., Stuart, J. J., Cambron, S. E., Harris, M. O., Foster, S. P., ... Hillbur, Y. (2009). Identification of sex cheromone components of the Hessian fly, *Mayetiola destructor*. *Journal of Chemical Ecology*, 35(1), 81-95. doi:10.1007/s10886-008-9569-1.

Atterholt, C. A., Delwiche, M. J., Rice, R. E., & Krochta, J. M. (1999). Controlled release of insect sex pheromones from paraffin wax and emulsions. *Journal of Controlled Release*, 57(3), 233-247. doi:10.1016/S0168-3659(98)00119-9.

Baker, T. C., Dittl, T., & Mafra-Neto, A. (1997). Disruption of sex pheromone communication in the blackheaded fireworm in Wisconsin cranberry marshes by using MSTRS devices. *Journal of Agricultural Entomology*, 14(4), 449-457.

Baker, T. C., Myrick, A. J., & Park, K. C. (2016). Optimizing the point-source emission rates and geometries of pheromone mating disruption mega-dispensers. *Journal of Chemical Ecology*, 42(9), 896-907. doi:10.1007/s10886-016-0769-9.

Bartelt, R. J., Zilkowski, B. W., Cossé, A. A., Steelman, C. D., & Singh, N. (2009). Male-produced aggregation pheromone of the Lesser Mealworm beetle, *Alphitobius diaperinus*. *Journal of Chemical Ecology*, 35(4), 422-434. doi:10.1007/s10886-009-9611-y.

Batista-Pereira, L. G., Stein, K., De Paula, A. F., Moreira, J. A., Cruz, I., Figueiredo, M. D., ... Correa, A. G. (2006). Isolation, identification, synthesis, and field evaluation of the sex pheromone of the Brazilian population of *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Chemical Ecology*, 32(5), 1085-1099. doi:10.1007/s10886-006-9048-5.

Bengtsson, M., Boutitie, A., Jósваи, J., Toth, M., Andreadis, S., Rauscher, S., ... Witzgall, P. (2014). Pheromone races of *Cydia splendana* (Lepidoptera, Tortricidae) overlap in host plant association and geographic distribution. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 2, 46. doi:10.3389/fevo.2014.00046.

Bjostad, L. B., Gaston, L. K., & Shorey, H. H. (1980). Temporal pattern of sex pheromone release by female *Trichoplusia ni*. *Journal of Insect Physiology*, 26(7), 493-498. doi:10.1016/0022-1910(80)90122-5.

Blight, M. M. (1990). Techniques for isolation and characterization of volatile semiochemicals of phytophagous insects. In A. R. McCaffery, & I. D. Wilson (Eds.), *Chromatography and isolation of insect hormones and pheromones* (pp. 281-288). Boston, EE. UU.: Springer.

Blomquist, G. J., & Vogt, R. G. (2003). *Insect pheromone biochemistry and molecular biology: The biosynthesis and detection of pheromones and plant volatiles*. San Diego, EE. UU.: Elsevier.

Borg-Karlson, A.-K., & Mozuraitis, R. (1996). Solid phase micro extraction technique used for collecting semiochemicals. Identification of volatiles released by individual signalling *Phyllonorycter sylvella* moths. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 51(7-8), 599-602. doi:10.1515/znc-1996-7-820.

Borrero-Echeverry, F. (2016). *Social and environmental olfactory signals mediate insect behavioral ecology and evolution* (tesis doctoral). Swedish University of Agricultural Sciences, Alnarp, Sweden.

Borrero-Echeverry, F., Becher, P. G., Birgersson, G., Bengtsson, M., Witzgall, P., & Saveer, A. M. (2015). Flight attraction of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera, Noctuidae) to cotton headspace and synthetic volatile blends. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 3, 56. doi:10.3389/fevo.2015.00056.

Boughton, A., & Fadamiro, H. Y. (1996). Effect of age and sex on the response of walking *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae) to its male-produced aggregation pheromone. *Journal of Stored Products Research*, 32(1), 13-20. doi:10.1016/0022-474x(95)00040-e.

Brown, D. F., & McDonough, L. M. (1986). Insect sex pheromones: Formulations to increase the stability of conjugated dienes. *Journal of Economic Entomology*, 79(4), 922-927. doi:10.1093/jee/79.4.922.

Bruce, T. J. A., Aradottir, G. I., Smart, L. E., Martin, J. L., Caulfield, J. C., Doherty, A., ... Pickett, J. A. (2015). The first crop plant genetically engineered to release an insect pheromone for defence. *Scientific Reports*, 5, 11183. doi:10.1038/srep11183.

Butenandt, A., Beckmann, R., Stamm, D., & Hecker, E. (1959). Über den sexuallockstoff des seidenspinners *Bombyx mori*. Reindarstellung und konstitution. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 14, 283-284.

Cardé, R. T., & Roelofs, W. L. (1973). Temperature modification of male sex pheromone response and factors affecting female calling in *Holomelina immaculata* (Lepidoptera:Arctiidae). *The Canadian Entomologist*, 105(12), 1505-1512. doi:10.4039/Ent1051505-12.

Carlson, D. A., Mayer, M. S., Silhacek, D. L., James, J. D., Beroza, M., & Bierl, B. A. (1971). Sex attractant pheromone of the house fly: isolation, identification and synthesis. *Science*, 174(4004), 76-78.

Cork, A., De Souza, K., Hall, D. R., Jones, O. T., Casagrande, E., Krishnaiah, K., & Syed, Z. (2008). Development of PVC-resin-controlled release formulation for pheromones and use in mating disruption of yellow rice stem borer, *Scirpophaga incertulas*. *Crop Protection*, 27(2), 248-255. doi:10.1016/j.cropro.2007.05.011.

DeLame, F. M., Miller, J. R., Atterholt, C. A., & Gut, L. J. (2007). Development and evaluation of an emulsified paraffin wax dispenser for season-long mating disruption of *Grapholita molesta* in commercial peach orchards. *Journal of Economic Entomology*, 100(4), 1316-1327. doi:10.1603/0022-0493(2007)100[1316:DAEOAE]2.0.CO;2.

Fatzinger, C. W. (1973). Circadian rhythmicity of sex pheromone release by *Dioryctria abietella* (Lepidoptera: Pyralidae (Phycitinae)) and the effect of a diel light cycle on its precopulatory behavior. *Annals of the Entomological Society of America*, 66(5), 1147-1153. doi:10.1093/aesa/66.5.1147.

Gago, R., Allison, J. D., McElfresh, J. S., Haynes, K. F., McKenney, J., Guerrero, A., & Millar, J. G. (2013). A tetraene aldehyde as the major sex pheromone component of the Promethea moth (*Callosamia promethea* (Drury)). *Journal of Chemical Ecology*, 39(10), 1263-1272. doi:10.1007/s10886-013-0349-1.

Gaston, L. K., Kaae, R., Shorey, H., & Sellers, D. (1977). Controlling the pink bollworm by disrupting sex pheromone communication between adult moths. *Science*, 196(4292), 904-905. doi:10.1126/science.870967

Gaylord, N. G. (1957). Reduction with complex metal hydrides. *Journal of Chemical Education*, 34(8), 367. doi:10.1021/ed034p367.

Gries, R., Britton, R., Holmes, M., Zhai, H., Draper, J., & Gries, G. (2015). Bed bug aggregation pheromone finally identified. *Angewandte Chemie*, 54(4), 1151-1154. doi:10.1002/anie.201409890.

Hall, D. R., Nesbitt, B. F., Marrs, G. J., Green, A. S. J., Champion, D. G., & Critchley, B. R. (1982). Development of microencapsulated pheromone formulations. In B. A. Leonhardt, & M. Beroza (Eds.), *Insect pheromone technology: Chemistry and applications* (pp. 131-143). Washington, EE. UU.: American Chemical Society.

Hammack, L. (1995). Calling behavior in female Western Corn Rootworm beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 88(4), 562-569. doi:10.1093/aesa/88.4.562.

Haniotakis, G. E., & Pittara, I. S. (1994). Response of *Bactrocera (Dacus) oleae* males (Diptera: Tephritidae) to pheromones as affected by concentration, insect age, time of day, and previous exposure. *Environmental entomology*, 23(3), 726-731. doi:10.1093/ee/23.3.726.

Hatano, E., Saveer, A., Borrero-Echeverry, F., Strauch, M., Zakir, A., Bengtsson, M., ... Dekker, T. (2015). A herbivore-induced plant volatile interferes with host plant and mate location in moths through suppression of olfactory signaling pathways. *BMC Biology*, 13, 75. doi:10.1186/s12915-015-0188-3.

Hellmann, C., Greiner, A., & Wendorff, J. H. (2011). Design of pheromone releasing nanofibers for plant protection. *Polymers for Advanced Technologies*, 22(4), 407-413. doi:10.1002/pat.1532..0

Heuskin, S., Lorge, S., Godin, B., Leroy, P., Frere, I., Verheggen, F. J., ... Lognay, G. (2011a). Optimisation of a semiochemical slow-release alginate formulation attractive towards *Aphidius ervi* Haliday parasitoids. *Pest Management Science*, 68(1), 127-136. doi:10.1002/ps.2234.

Heuskin, S., Verheggen, F. J., Haubruge, E., Wathélet, J.-P., & Lognay, G. (2011b). The use of semiochemical slow-release devices in integrated pest management strategies. *Biotechnologie Agronomie Societe et Environnement*, 15(3), 459-470.

Howse, P., Stevens, J., & Jones, O. T. (2013). *Insect pheromones and their use in pest management*. Dordrecht, Holanda: Springer Science & Business Media.

Il'ichev, A. L., Stelinski, L. L., Williams, D. G., & Gut, L. J. (2006). Sprayable microencapsulated sex pheromone formulation for mating disruption of oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae) in Australian peach and pear orchards. *Journal of Economic Entomology*, 99(6), 2048-2054. doi:10.1603/0022-0493-99.6.2048.

Jones, G. R., & Oldham, N. J. (1999). Pheromone analysis using capillary gas chromatographic techniques. *Journal of Chromatography A*, 843(1-2), 199-236. doi:10.1016/S0021-9673(99)00446-x.

Jurenka, R. (2004). Insect pheromone biosynthesis. In S. Schulz (Ed.), *The chemistry of pheromones and other semiochemicals I* (pp. 97-132). Berlin, Alemania: Springer.

Knight, A. L., Larsen, T. E., & Ketner, K. C. (2004). Rainfastness of a microencapsulated sex pheromone formulation for Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Economic Entomology*, 97(6), 1987-1992. doi:10.1603/0022-0493-97.6.1987.

Kováts, E. (1958). Gas chromatographische charakterisierung organischer verbindungen. Teil 1: retentionsindices

aliphatischer halogenide, alkohole, aldehyde und ketone. *Helvetica Chimica Acta*, 41(7), 1915-1932. doi:10.1002/hlca.19580410703.

Kydonieus, A. F., & Beroza, M. (1981). The Hercon dispenser formulation and recent test results. In M. Everett (Ed.), *Management of Insect Pests with Semiochemicals* (pp. 445-453). Boston, EE. UU.: Springer.

Lance, D. R., Leonard, D. S., Mastro, V. C., & Walters, M. L. (2016). Mating disruption as a suppression tactic in programs targeting regulated lepidopteran pests in US. *Journal of Chemical Ecology*, 42(7), 590-605. doi:10.1007/s10886-016-0732-9.

Landolt, P. J., & Sivinski, J. (1992). Effects of time of day, adult food, and host fruit on incidence of calling by male Caribbean Fruit Flies (Diptera: Tephritidae). *Environmental Entomology*, 21(2), 382-387. doi:10.1093/ee/21.2.382.

Lanucara, F., Holman, S. W., Gray, C. J., & Eysers, C. E. (2014). The power of ion mobility-mass spectrometry for structural characterization and the study of conformational dynamics. *Nature Chemistry*, 6(4), 281-294. doi:10.1038/nchem.1889.

Lebreton, S., Trona, F., Borrero-Echeverry, F., Bilz, F., Grabe, V., Becher, P. G., ... Witzgall, P. (2015). Feeding regulates sex pheromone attraction and courtship in *Drosophila* females. *Scientific Reports*, 5, 13132. doi:10.1038/srep13132.

Liénard, M. A., Strandh, M., Hedenström, E., Johansson, T., & Löfstedt, C. (2008). Key biosynthetic gene subfamily recruited for pheromone production prior to the extensive radiation of Lepidoptera. *BMC Evolutionary Biology*, 8, 270. doi:10.1186/1471-2148-8-270.

Liénard, M. A., Wang, H.-L., Lassance, J.-M., & Löfstedt, C. (2014). Sex pheromone biosynthetic pathways are conserved between moths and the butterfly *Bicyclus anynana*. *Nature Communications*, 5, 3957. doi:10.1038/ncomms4957.

Lievers, R., & Groot, A.T. (2016). Disposable polydimethylsiloxane (PDMS)-coated fused silica optical fibers for sampling pheromones of moths. *PLoS One*, 11(8), e0161138. doi:10.1371/journal.pone.0161138.

Light, D. M., Grant, J. A., Haff, R. P., & Knight, A. L. (2017). Addition of pear ester with sex pheromone enhances disruption of mating by female codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) in walnut orchards treated with meso dispensers. *Environmental Entomology*, 46(2), 319-327. doi:10.1093/ee/nvw168.

Löfstedt, C., & Bengtsson, M. (1988). Sex pheromone biosynthesis of (E,E)-8,10-dodecadienol in codling moth *Cydia pomonella* involves E9 desaturation. *Journal of Chemical Ecology*, 14(3), 903-915. doi:10.1007/bf01018782.

Malosse, C., Ramirez-Lucas, P., Rochat, D., & Morin, J.-P. (1995). Solid-phase microextraction, an alternative method for the study of airborne insect pheromones (*Metamasius hemipterus*, Coleoptera, Curculionidae). *Journal of High Resolution Chromatography*, 18(10), 669-670. doi:10.1002/jhrc.1240181013.

Marchand, D., & McNeil, J. N. (2000). Effects of wind speed and atmospheric pressure on mate searching behavior in the aphid parasitoid *Aphidius nigripes* (Hymenoptera: Aphidiidae). *Journal of Insect Behavior*, 13(2), 187-199. doi:10.1023/a:1007732113390.

Mayer, M. S., & Mitchell, E. R. (1998). Rapid measure of sex pheromone emission from plastic rope dispensers: Example of utility in sexual communication disruption of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Phytoparasitica*, 26(2), 117-125. doi:10.1007/bf02980678.

McGhee, P. S., Gut, L. J., & Miller, J. R. (2014). Aerosol emitters disrupt codling moth, *Cydia pomonella*, competitively. *Pest Management Science*, 70(12), 1859-1862. doi:10.1002/ps.3732.

Miller, D. R. (2007). Limonene: attractant kairomone for white pine cone beetles (Coleoptera: Scolytidae) in an eastern white pine seed orchard in western North Carolina. *Journal of Economic Entomology*, 100(3), 815-822.

Millar, J. G., McElfresh, J. S., Romero, C., Vila, M., Marí-Mena, N., & Lopez-Vaamonde, C. (2010). Identification of the sex pheromone of a protected species, the Spanish Moon Moth *Graellsia isabellae*. *Journal of Chemical Ecology*, 36(9), 923-932. doi:10.1007/s10886-010-9831-1.

Miller, J. R., & Gut, L. J. (2015). Mating disruption for the 21st century: matching technology with mechanism. *Environmental Entomology*, 44(3), 427-453. doi:10.1093/ee/nvv052.

Möttus, E., Nömm, V., Williams, I. H., & Liblikas, I. (1997). Optimization of Pheromone Dispensers for Diamondback Moth *Plutella xylostella*. *Journal of Chemical Ecology*, 23(9), 2145-2159. doi:10.1023/B:JOEC.0000006435.13481.ba.

Navarro, D. M., & Navarro, M. (2004). Catalytic hydrogenation of organic compounds without H2 supply: An electrochemical system. *Journal of Chemical Education*, 81(9), 1350. doi:10.1021/ed081p1350.

Ó'Ceallacháin, D. P., & Ryan, M. F. (1977). Production and perception of pheromones by the beetle *Tribolium confusum*. *Journal of Insect Physiology*, 23(10), 1303-1309. doi:10.1016/0022-1910(77)90074-9.

Onufrieva, K. S., Thorpe, K. W., Hickman, A. D., Tobin, P. C., Leonard, D. S., & Anderson Roberts, E. (2010). Effects of SPLAT® GM sprayable pheromone formulation on gypsy moth mating success. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 136(2), 109-115. doi:10.1111/j.1570-7458.2010.01009.x.

Party, V., Hanot, C., Busser, D. S., Rochat, D., & Renou, M. (2013). Changes in odor background affect the locomotory response to pheromone in moths. *PLoS One*, 8(1), e52897. doi:10.1371/journal.pone.0052897.

Pawliszyn, J., Pawliszyn, B., & Pawliszyn, M. (1997). Solid phase microextraction (SPME). *The Chemical Educator*, 2(4), 1-7. doi:10.1007/s00897970137a.

Pellegrino, A. C., Penaflor, M. F., Nardi, C., Bezner-Kerr, W., Guglielmo, C. G., Bento, J. M., & McNeil, J. N. (2013). Weather forecasting by insects: modified sexual behaviour in response to atmospheric pressure changes. *PLoS One*, 8(10), e75004. doi:10.1371/journal.pone.0075004.

Pregitzer, P., Schubert, M., Breer, H., Hansson, B. S., Sachse, S., & Krieger, J. (2012). Plant odorants interfere with detection of sex pheromone signals by male *Heliothis virescens*. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 6, 42. doi:10.3389/fncel.2012.00042.

Prestwich, G. D., & Blomquist, G. J. (Eds.). (2014). *Pheromone biochemistry*. Londres, Reino Unido: Academic Press.

Rama, F., Reggiori, F., & Albertini, A. (2011). Control of *Spodoptera littoralis* (Bsdv.) by biodegradable, low dosage, slow-release pheromone dispensers. *IOBC/WPRS Bulletin*, 72, 59-66.

Rodriguez, S. A., Paliza, M. L., & Nazareno, M. A. (2017). Influence of adsorbent nature on the dynamic headspace study of insect semiochemicals. *Australian Journal of Chemistry*, 70(8), 902-907. doi:10.1071/CH17064.

Royer, L., & McNeil, J. N. (1993). Effect of relative humidity conditions on responsiveness of European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) males to female sex pheromone in a wind tunnel. *Journal of Chemical Ecology*, 19(1), 61-69. doi:10.1007/BF00987471.

Sakurada, T., & Suzuki, H. (2002). Google patent No. EP0816430 B1. Biodegradable sustained-release preparation, biodegradable pheromone dispenser and biodegradable pest controlling agent. Recuperado de https://www.google.com/patents/EP0816430B1.

Saveer, A. M., Becher, P. G., Birgersson, G., Hansson, B. S., Witzgall, P., & Bengtsson, M. (2014). Mate recognition and reproductive isolation in the sibling species *Spodoptera littoralis* and *Spodoptera litura*. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 2, 18. doi:10.3389/fevo.2014.00018.

Saveer, A. M., Kromann, S. H., Birgersson, G., Bengtsson, M., Lindblom, T., Balkenius, A., ... Ignell, R. (2012). Floral to green: Mating switches moth olfactory coding and preference. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1737), 2314-2322. doi:10.1098/rspb.2011.2710.

Schal, C., & Cardé, R. T. (1986). Effects of temperature and light on calling in the tiger moth *Holomelina lamae* (Freeman)(Lepidoptera: Arctiidae). *Physiological Entomology*, 11(1), 75-87. doi:10.1111/j.1365-3032.1986.tb00392.x.

Schneider, D., & Kaissling, K.-E. (1957). Der bau der antenne des Seidenspinners *Bombyx mori* L. II. Sensillen, cuticulare bildungen und innerer bau. *Zoologische Jahrbücher. Abteilung für Anatomie und Ontogenie der Tiere Abteilung für Anatomie und Ontogenie der Tiere*, 76, 224-250.

Schwartz, C., Raible, J., Mott, K., & Dussault, P. H. (2006). Fragmentation of carbonyl oxides by N-oxides: An improved approach to alkene ozonolysis. *Organic Letters*, 8(15), 3199-3201. doi:10.1021/ol061001k.

Shorey, H. H., & Gerber, R. G. (1996a). Use of puffers for disruption of sex pheromone communication among navel orangeworm moths (Lepidoptera: Pyralidae) in almonds, pistachios, and walnuts. *Environmental Entomology*, 25(5), 1154-1157. doi:10.1093/ee/25.5.1154.

Shorey, H. H., & Gerber, R. G. (1996b). Use of puffers for disruption of sex pheromone communication of codling moths (Lepidoptera: Tortricidae) in walnut orchards. *Environmental Entomology*, 25(6), 1398-1400. doi:10.1093/ee/25.6.1398.

Shorey, H. H., McFarland, S. U., & Gaston, L. K. (1968). Sex pheromones of noctuid moths. XIII. Changes in pheromone quantity, as related to reproductive age and mating history, in females of seven species of Noctuidae (Lepidoptera). *Annals of the Entomological Society of America*, 61(2), 372-376. doi:10.1093/aesa/61.2.372.

Spurgeon, D. (2003). Age dependence of pheromone production by the boll weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Environmental Entomology*, 32(1), 31-38. doi:10.1603/0046-225X-32.1.31.

Stelinski, L., Gut, L., Mallinger, R., Epstein, D., Reed, T., & Miller, J. (2005). Small plot trials documenting effective mating disruption of oriental fruit moth by using high densities of wax-drop pheromone dispensers. *Journal of Economic Entomology*, 98(4), 1267-1274. doi:10.1603/0022-0493-98.4.1267.

Unbehend, M., Hänniger, S., Meagher, R. L., Heckel, D. G., & Groot, A. T. (2013). Pheromonal divergence between two strains of *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Chemical Ecology*, 39(3), 364-376. doi:10.1007/s10886-013-0263-6.

Wang, H.-L., Geertsema, H., Van Nieukerken, E. J., & Löfstedt, C. (2015). Identification of the female-produced sex pheromone of the leafminer *Holocacista capensis* infesting grapevine in South Africa. *Journal of Chemical Ecology*, 41(8), 724-731. doi:10.1007/s10886-015-0611-9.

Webster, R. P., & Cardé, R. T. (1982). Influence of relative humidity on calling behaviour of the female European corn borer moth (*Ostrinia nubilalis*). *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 32(2), 181-185. doi:10.1111/j.1570-7458.1982.tb03200.x.

Wei, J. R., Yang, Z. Q., Hao, H. L., & Du, J. W. (2008). (R)-(+)-limonene, kairomone for *Dastarcus helophoroides*, a natural enemy of longhorned beetles. *Agricultural and Forest Entomology*, 10(4), 323-330.

Witzgall, P., Kirsch, P., & Cork, A. (2010). Sex pheromones and their impact on pest management. *Journal of Chemical Ecology*, 36(1), 21. doi:10.1007/s10886-009-9737-y.

Zabin, I. (1951). On the conversion of palmitic acid to stearic acid in animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 189(1), 355-359.