UENF

Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro

CCT - Centro de Ciências e Tecnologias

LCQUI - Laboratório de Ciências Químicas

CARACTERIZAÇÃO DOS VOLÁTEIS RESPONSÁVEIS PELA INTERAÇÃO CAIROMONAL ENTRE A BROCA-DO-CAFÉ (*Hypothenemus hampei*) E O CAFÉ CONILLON (*Coffea canephora*)

Alexandra Gomes Siqueira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

2005

CARACTERIZAÇÃO DOS VOLÁTEIS RESPONSÁVEIS PELA INTERAÇÃO CAIROMONAL ENTRE A BROCA-DO-CAFÉ (*Hypothenemus hampei*) E O CAFÉ CONILLON (*Coffea canephora*)

Monografia submetida ao corpo docente do Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense - Darcy Ribeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Licenciado em Química.

ALEXANDRA GOMES SIQUEIRA

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
2005

A presente monografia
foi realizada sob a orientação
do Prof. Dr. Paulo Cesar Muniz de Lacerda Miranda.

Monografia aprovada em _____ de _____ de 2005, como parte para a obtenção do título de Licenciado em Química pela Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro, pela comissão examinadora formada pelos professores:

_____

Prof. Dr. Paulo Cesar Muniz de Lacerda Miranda
(LCQUI-CCT-UENF)
Orientador

_____

Profa. Dra. Rosana Giacomini
(LCQUI-CCT-UENF)

_____

Profa. Dra. Maria Cristina Canela Gazotti
(LCQUI-CCT-UENF)

Dedico esta monografia a minha querida família. Em especial a meus pais, José Antonio e Aroldina, por toda paciência e incentivo; a meus irmãos, Alessano e Alienio, pelos exemplos de persistência e garra; e ao meu noivo, Vitor, por todo amor, apoio e estímulo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS pelo dom da vida e pela conclusão desta etapa em minha existência.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram com este trabalho e, em especial:

A minha amada família, por compreender os muitos momentos de ausência durante este curso.

Ao Professor Dr. Paulo Miranda, pela orientação, pela oportunidade, pelo incentivo, pelos ensinamentos no laboratório e em sala de aula, pela ajuda e tolerância nos momentos difíceis, e, pelo exemplo de amor e dedicação ao trabalho.

A professora Dra. Rosana Giacomini, pela presença na banca de avaliação da monografia e pelo exemplo de persistência e garra pela conquista de um ideal.

A professora Dra. Maria Cristina Canela Gazotti, pelas aulas mais “animadas” ao longo do curso, por sempre mostrar-se disposta a ajudar, pela presença na banca de avaliação da monografia e pelo grande exemplo de profissional que é.

A todos os professores que, ao longo do curso, me ensinaram não só com os conteúdos, mas também com seus exemplos.

Aos responsáveis pelo Laboratório de Proteção de Plantas – CCTA/UENF, em especial ao professor José Oscar Gomes Lima, pela oportunidade.

A amiga Rosimar Pereira, pelas horas agradáveis realizando os ensaios biológicos no CCTA.

A todos os meus amigos de Turma e do Curso de Licenciatura em Química. Em especial a aqueles que compartilharam comigo muitos finais de semana estudando na UENF.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro que me proporcionou diversas oportunidades e me concedeu a bolsa de iniciação científica.

SUMÁRIO

ABSTRACT **8**

RESUMO **9**

1. INTRODUÇÃO **10**

2. OBJETIVOS **16**

3. MATERIAIS, METODOLOGIAS E TÉCNICAS **17**

3.1 - IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS 17
3.2 - SÍNTESE DAS SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS 18
3.3 - ENSAIOS BIOLÓGICOS 18
3.4 - ESTUDO DE MATRIZES PARA A LIBERAÇÃO DOS VOLÁTEIS 20

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES **22**

4.1 - CARACTERIZAÇÃO DOS VOLÁTEIS 22
4.2 - SÍNTESE DAS SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS 27
4.3 - ENSAIOS BIOLÓGICOS 30
4.4 - ESTUDO DE MATRIZES PARA LIBERAÇÃO DOS VOLÁTEIS 31

5. CONCLUSÕES **38**

6. BIBLIOGRAFIA **39**

ABSTRACT

The present work investigates the evidences of the cairomonal interaction between the coffee's insect, *Hypothenemus hampei*, and the conillon coffee, *Coffea canephora*, through characterization of the extant volatile compounds at the coffee's bean. Afterwards, biological experiments were made in order to point out the attractiveness between some substances of the coffee and the insect.

The volatile compounds of conillon coffee berry were collected by dynamic headspace technique and analyzed in a gas chromatograph/mass spectrometer. In this first stage of analysis was emphasized the qualitative aspect of the volatile's composition.

It was verified the presence of some characterized substances by first time in the coffee's berry, among them: benzilic alcohol, benzaldehyde, 2-phenylethanol and 2-hexenal. In addition, berry's acquaintance compounds were identified, they are: 2-heptanone, 2-heptyl acetate, methyl salicylate and ethyl salicylate.

Besides, a study of new matrixes was realized to the liberation of the volatile compounds that, in future, will relieve in the insect's infestation control in the farming.

RESUMO

O presente trabalho vem investigar os indícios da interação cairomonal entre a broca-do-café, *Hypothenemus hampei,* e o café conillon, *Coffea canephora* (Variedade robusta, Linden), por meio da caracterização dos voláteis existentes nos grãos de café. Posteriormente foram realizados ensaios biológicos que visaram mostrar a atratividade entre algumas substâncias do café e a praga.

As substâncias voláteis do fruto foram coletadas pela técnica de “headspace” dinâmico e analisados por cromatografia em fase gasosa/espectrometria de massas. Neste primeiro estágio de análise enfatizou-se o aspecto qualitativo da composição dos voláteis.

Verificou-se a presença de algumas substâncias caracterizadas pela primeira vez no fruto do café, sendo elas: o álcool benzílico, o benzaldeído, o 2-feniletanol e o 2-hexenal. Em adição, também foram identificados compostos já conhecidos no fruto, como por exemplo: a 2-heptanona, o acetato de 2-heptila, o salicilato de metila e o salicilato de etila.

Além disso, foi realizado um estudo de novas matrizes para a liberação dos voláteis que futuramente poderá auxiliar no monitoramento da infestação da praga nas lavouras.

1. INTRODUÇÃO

A importância do café na economia mundial é indiscutível. O Café é fundamental para a economia e a política de muitos países em desenvolvimento. Seu cultivo, processamento, comercialização, transporte e mercado proporcionam milhões de empregos em todo o mundo.

Conforme dados da Organização Internacional do Café, existem cerca de 70 países produtores do grão no mundo. Essa multiplicidade de produtores deve-se à extensa faixa apta à produção do cafeeiro. Os principais países produtores concentram-se na América do Sul (Brasil e Colômbia), América Central (Costa Rica) e Ásia (Vietnã). Estes são responsáveis por cerca de 80% da produção mundial. (http://www.pr.gov.br/iapar/café/m&prodcons.html)

A importância da produção de café para o país começou desde a época do Império. A cultura foi inserida no Brasil em 1727, ocorrendo as primeiras exportações em 1731/32, que se tornaram expressivas a partir de 1802 (Camargo, 1953). Apesar da diminuição da participação nas exportações ao longo do tempo, especialmente devido à grande diversificação dos produtos exportados, o café constitui-se, ainda hoje, num item importante entre estes produtos.

A primeira estimativa realizada pela Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) para a safra de café 2005/2006 indica uma produção entre 30,7 e 33,0 milhões de sacas (de 60 quilos cada). Os números são menores que os apurados na safra 2004/2005, que foram de 38,6 milhões de sacas, o que representa uma queda de cerca de 5,6 milhões de sacas do grão, ou uma redução de 14,5% devido ao longo período de estiagem (http://www.conab.gov.br.html).

A broca-do-café, *Hypothenemus hampei* [FERRARI, 1867][1] (*Coleoptera*: *Scolytidae*), é considerada uma das mais importantes pragas da cultura do cafeeiro, atacando frutos de café em qualquer estágio de maturação, de verdes até maduros (cerejas) ou secos (Souza & Reis, 1993). Esta praga é de origem africana e foi reportada pela primeira vez no Brasil no ano de 1913, no município de Campinas, estado de São Paulo (Benassi e Carvalho,1989).

[1] Responsável pela classificação desta praga.

Na Natureza, a existência dos indivíduos está intimamente ligada aos modos de sinalização. A sinalização tátil, visual, auditiva e química são os meios de comunicação amplamente empregados para a sobrevivência de todas as espécies.

No caso dos insetos, a utilização dos odores é fator determinante no seu ciclo de vida. Logo, a organização das atividades sociais e diversos outros comportamentos são determinados pela presença de odores. Neste ponto de vista, o olfato é fundamental na localização de presas, na defesa, na agressividade, na seleção de plantas hospedeiras, na escolha de locais para ovoposição e em muitas outras situações (Vilela e Della Lucia, 2001).

Esta utilização de odores para a sobrevivência é uma maneira de comunicação química entre os indivíduos, vivos ou não vivos, que ocorre de forma elementar para a transferência de informações.

O conhecimento destas mensagens químicas denominadas semioquímicos[2], cujo significado é “sinais químicos”, podem ajudar a controlar a interação química entre emissores e receptores. Através dos semioquímicos se tenta esclarecer este modo de comunicação em todos os aspectos, desde a participação dos compostos químicos até a forma com que os mesmos são transmitidos e receptados (Ferreira *et al.*, 2001).

A utilização do termo semioquímico não se refere apenas às substâncias químicas que liberadas por um determinado organismo provoque uma mudança comportamental em outro organismo, mas também inclui as substâncias que provocam uma mudança fisiológica (Vilela e Della Lucia, 2001).

A ação destas substâncias podem ser intra-específica ou interespecífica, denominados de feromônios ou aleloquímicos, respectivamente. Portanto, no caso dos feromônios acontece uma sinalização química entre indivíduos de uma mesma espécie e com os aleloquímicos ocorre o contrário, a sinalização se dá com indivíduos de espécies diferentes (Ferreira *et al.*, 2001). Assim sendo, os feromônios e os aleloquímicos são considerados subcategorias dos semioquímicos. A classificação dos feromônios e aleloquímicos ocorrem de acordo com o tipo de comportamento que provocam.

[2] Termo primeiramente usado por Nordlund & Lewis, 1976.

Os feromônios podem ser subdivididos em dois grupos: preparadores e desencadeadores. Denominam-se um feromônio preparador os sinais que atuam de forma prolongada na fisiologia e desenvolvimento dos insetos. Já o feromônio desencadeador emite sinais que acarretam em mudança imediata de comportamento. Assim, este último, pode atuar como atraente sexual, incentivar o comportamento de agregação, alarme, dispersão, ser marcador de trilhas e território, entre outros.

Considerando os aleloquímicos, ocorrem as subdivisões em relação ao tipo de indivíduo que está sendo beneficiado na comunicação, tomando como base a presença de emissores e receptores desta sinalização. Os aleloquímicos são agrupados da seguinte forma: alomônio, cairomônio, sinomônio e apneumônio. Os alomônios são sinais químicos que favorecem o emissor, conseqüentemente não favorecendo o receptor. Os cairomônios, ao inverso dos alomônios, beneficiam somente o receptor do sinal. Os sinomônios beneficiam tanto o agente emissor como o receptor do sinal. E, por fim, os apneumônios que se baseiam na liberação de aleloquímicos por materiais em decomposição e atraem, principalmente, insetos coprófagos e saprófagos (Ferreira *et al.*, 2001). Toda esta terminologia usada para a classificação dos semioquímicos pode ser observada na Figura 1.

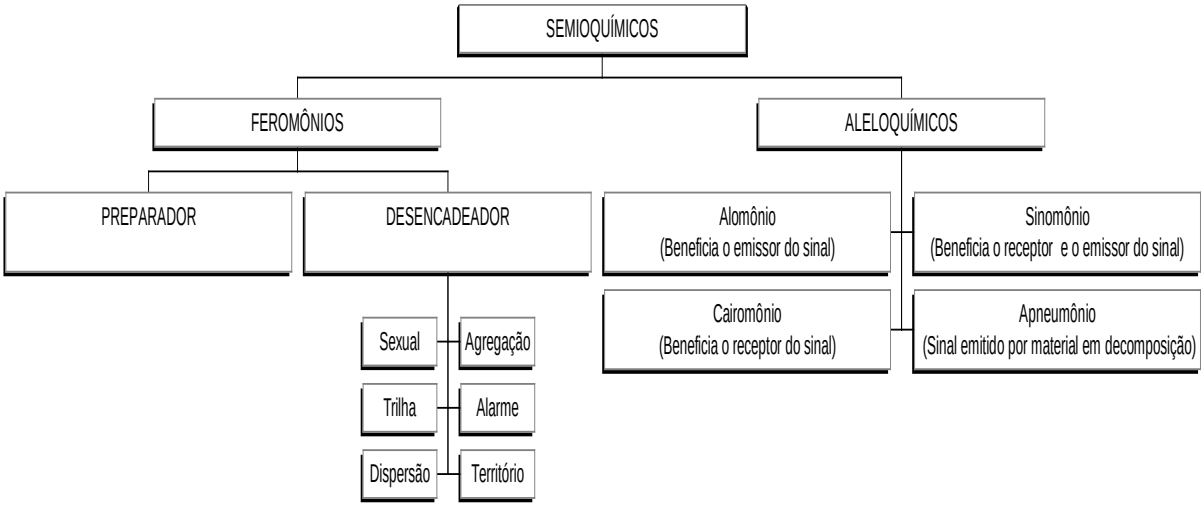


Figura 1: Classificação dos semioquímicos de acordo com o comportamento indicado (Ferreira *et al.*, 2001).

Neste trabalho, iremos abordar a interação cairomonal entre a planta, *Coffea canephora* – o emissor desta sinalização química, e a praga, *Hypothenemus hampei* – receptor e favorecido nesta comunicação.

Os indícios existentes sobre a interação cairomonal entre o *Hypothenemus hampei* e o *Coffea canephora* (GutierrezMartinez, 1996) propõem uma melhor compreensão para as causas da preferência da praga pelos frutos do café. Entretanto, até o momento, esta interação cairomonal ainda não foi devidamente comprovada.

Os resultados encontrados neste trabalho poderão ser utilizados no controle desta e de outras pragas que possuem uma interação química semelhante. Da mesma forma, poderá ser útil na cultura do café arábico, que é mais bem adaptado a maiores altitudes, como em algumas áreas de Itaperuna e cidades circunvizinhas.

O café conillon (*Coffea canephora* var. robusta, Linden) é a variedade de café mais adaptada às baixas altitudes (até 700 m) e aos climas quentes. Logo, é o tipo de cafeeiro mais adequado ao clima e relevo característicos da região de Campos dos Goytacazes e algumas cidades vizinhas de baixas altitudes.

Benassi e Carvalho (1989) verificaram a preferência do ataque da praga em Café arábica em relação ao Café conillon. Entretanto, os fatores climáticos, principalmente as temperaturas mais elevadas, propiciam maior desenvolvimento populacional (Souza e Reis, 1980) e, portanto, maior incidência da broca em café conillon.

O inseto ataca os frutos de todas as espécies de café em diferentes estágios de maturação. A devastação tem origem através de um besouro preto que, na fase adulta, mede cerca de 1,5-2,0 mm (Munoz, 1989). O dano ocasionado por adultos dessa praga é caracterizado pela perfuração dos frutos e pelas galerias nas sementes, onde colocam seus ovos. Ao eclodirem, as larvas se alimentam da semente, o que contribui para o aumento dos prejuízos (Mora, 1991).

As perdas quantitativas, ou dano direto na produção, decorrem da queda dos frutos imaturos atacados pela broca-do-café, da destruição das sementes e pelas sementes que se quebram no beneficiamento por estarem brocadas.

Por outro lado as perdas qualitativas, ou dano indireto, decorrem de sementes brocadas que mesmo quando não se quebram no beneficiamento contribuem para a depreciação na qualidade da bebida (Batista, 1986). Também há favorecimento da entrada de microrganismos que se desenvolvem quando as condições são favoráveis, atingindo os grãos e, conseqüentemente, alterando as propriedades do café (Chalfoun *et al.*, 1984). É importante ressaltar que pode ocorrer dano significativo durante armazenagem, mesmo que por tempos curtos (Mora, 1991).

O controle da broca-do-café tem sido objeto de grandes esforços em todo o mundo. Uma das alternativas é a utilização de inimigos naturais. O Brasil, inclusive, foi pioneiro na tentativa de controlar biologicamente essa praga. Entretanto, este método vem demonstrando não ser satisfatório pela quantidade de efeitos colaterais acarretados pelo desequilíbrio no ecossistema, visto a complexidade de se introduzir um organismo diferente do habitat natural (Barrera, 1990)

A forma de controle mais amplamente utilizada é o uso de defensivos agrícolas, embora seja muito difícil controlar a broca pela aspersão, já que a maior parte do ciclo de vida da praga se passa dentro do fruto. Por isto, os defensivos eficientes têm que agir por contato e ter um tempo de meia-vida grande. Todavia, esta é a alternativa de controle mais viável economicamente e de logística mais simples. O agroquímico clorado Endossulfan e seus análogos comerciais Endocide, Thiodan, Malix, Endossulfol ou Cyclodan (Brun *et al.*, 1989, 1990 e 1994) são os mais efetivos. O nome cientifico do Endossulfan é sulfito de 1,2,3,4,7,7-hexaclorobiciclo [2.2.1] hep-2-teno-5,6-bisidroximetila (Figura 2).

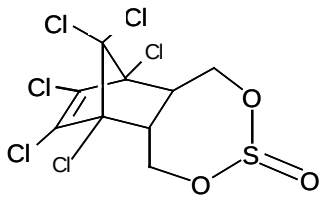


Figura 2: Estrutura do defensivo agrícola Endossulfan.

Este defensivo agrícola é extremamente tóxico e com difícil degradação no meio ambiente, tendo sido banido e/ou severamente restringido em diversos países.

Um problema ainda mais grave é o surgimento de brocas com resistência acentuada aos inseticidas Endossulfan como foi descrito por Brun e colaboradores em 1989, 1990 e 1994.

Neste quadro geral, a utilização de semioquímicos como alternativa no controle da broca-do-café é uma proposta em potencial para a diminuição do uso dos defensivos agrícolas e para a preservação do meio ambiente.

2. OBJETIVOS

A proposta deste trabalho é colaborar para o esclarecimento da interação cairomonal entre o *Coffea canephora* (café conillon, variedade robusta, Linden) e a broca-do-café.

Caracterizar os voláteis presentes no aroma das cerejas do café conillon.

Realizar ensaios biológicos de atratividade de alguns voláteis caracterizados frente à broca-do-café.

Desenvolver uma matriz semi-sólida para a liberação controlada de voláteis adequada para o uso no campo.

3. MATERIAIS, METODOLOGIAS E TÉCNICAS

3.1 - Identificação das substâncias voláteis

As substâncias voláteis presentes no *Coffea canephora* foram determinadas qualitativamente através da técnica de "headspace" dinâmico (Figura 3) e a cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas para a determinação estrutural (Helmig e Greenberg, 1994 e Kok *et al.*, 1996).

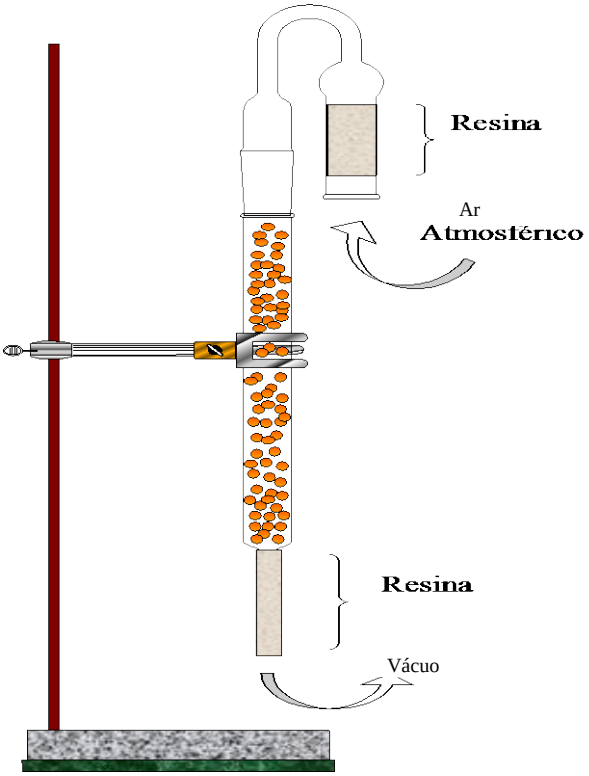


Figura 3: Aparato para o "headspace" dinâmico.

Utilizou-se para a absorção dos compostos as seguintes fases estacionárias: XAD–2®, um polímero de poliestireno, e a Supelpack 2® que também é um polímero de poliestireno, entretanto com uma maior pureza (Mathieu, 1998).

Após um período de 24 horas de aeração, a fase sólida foi retirada do aparato e lavada com diclorometano com alto grau de pureza. As frações obtidas por esta técnica foram submetidas às análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Os resultados serão discutidos posteriormente.

Nas análises cromatográficas utilizou-se o aparelho GCMS/QP5050A, operando com o software Class 5000 versão 2.23. Durante a análise usou-se a cromatografia gás/ líquido, sendo a fase móvel o gás Hélio (atuando sob uma vazão de 31 mL/min) e a fase estacionária o texasilano espalhado na sílica, em uma coluna DB-5.

3.2 - Síntese das substâncias identificadas

Neste trabalho, fez-se necessário sintetizar algumas substâncias caracterizadas para que fossem realizados os ensaios biológicos, no intuito de verificar suas respectivas atratividade e/ ou repulsão em relação a praga. As substâncias sintetizadas foram: o acetato de 2-heptila e o salicilato de etila, pois estas não são comercializáveis.

A síntese do acetato de 2-heptila foi realizada em duas etapas. Primeiro realizamos a redução da 2-heptanona ao álcool 2-heptanol, pelo hidreto de lítio e alumínio ($LiAlH_4$). Obteve-se o acetato de 2-heptila por meio da acilação do 2-heptanol com o anidrido acético.

O salicilato de etila foi sintetizado a partir da esterificação do ácido salicílico em presença do álcool etílico, sendo que o ácido sulfúrico concentrado foi usado como catalisador.

O processo da síntese destas substâncias foi realizado segundo bibliografia recomendada (Soares *et al*., 1988). A caracterização dessas substâncias sintetizadas foi realizada através da análise dos resultados obtidos nos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^{1}H e ^{13}C, Espectrometria de Massa e Infravermelho.

3.3 - Ensaios biológicos

Uma vez identificadas as substâncias voláteis do fruto do café, realizaram-se ensaios biológicos com as de origem sintética (acetato de 2-heptila e salicilato de etila) ou comercial (álcool benzílico, benzaldeído, 2-feniletanol, 2-hexenal, 2-heptanona e salicilato de metila).

O intuito dos ensaios foi detectar quais eram as substâncias responsáveis pela atividade comportamental da praga, ou seja, quais delas geram uma efetiva

atratividade e/ou repulsão. Almejando, desta forma, meios para elucidar a complexa relação praga x planta.

Os ensaios comportamentais com *H. hampei* foram realizados num olfatômetro em “Y” (Figura 4), onde foi verificada a atratividade destas substâncias isoladamente e em algumas misturas das substâncias isoladas em metanol/ etanol (3:1).

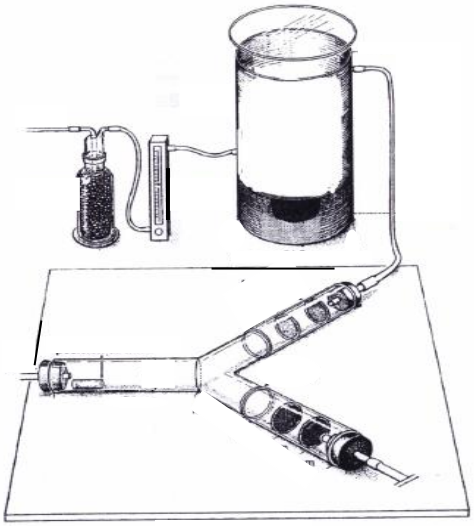


Figura 4: Olfatômetro em “Y”

O olfatômetro em “Y” consiste num tubo de vidro bifurcado que opera horizontalmente e a corrente de ar é produzida por um compressor de ar. Suas dimensões são de aproximadamente 70 cm de comprimento, 50 cm de profundidade e 5 cm de diâmetro. O ar que opera no olfatômetro foi purificado por meio de um filtro de carvão ativado, sendo também a umidade do ar controlada.

O estímulo olfativo, as substâncias identificadas diluídas em metanol/etanol (3:1), foi colocado no final de um dos lados da bifurcação e o controle (estímulo comparativo), que foi uma mistura de metanol/etanol (3:1) (Mora, 1991), colocado no outro lado da bifurcação. 1μL de cada estímulo foi colocado num fruto simulado de algodão. A praga foi liberada no braço maior e a sua resposta final ocorreu quando o inseto deslocou-se para um dos braços menores contendo um dos estímulos.

Nos testes realizados no olfatômetro testou-se 40 fêmeas fecundadas criadas em dieta artificial desenvolvida por Villacorta e Barrera (1993). Foram escolhidas as

fêmeas para os bioensaios por causa das mesmas serem responsáveis pela infestação do fruto, onde perfuram e colocam seus ovos.

Os bioensaios foram realizados numa sala escura, ou seja, possuindo as paredes escuras e com pouca luminosidade para que as cores não interferissem na escolha da praga, entre 15 e 18 h – maior horário de atividade da praga.

A realização destes ensaios aconteceu em conjunto com o Laboratório de Proteção de Plantas – CCTA/UENF, sob a orientação do professor José Oscar Gomes Lima.

3.4 - Estudo de matrizes para a liberação dos voláteis

Segundo estudos anteriores, verificou-se um bom resultado na atração do *H. hampei* por armadilhas baseadas em uma mistura de metanol/etanol (3:1) com taxa de liberação de 60 $mg.dia^{-1}$ (Mora, 1991). A partir deste pressuposto, tentou-se desenvolver um gel constituído por álcool polivinílico / tetraborato de sódio / metanol / etanol / água com o intuito de servir como matriz na liberação dos voláteis identificados.

Nesta matriz, pretende-se colocar as possíveis substâncias e/ou misturas atrativas à praga. Sendo, futuramente, plausível a construção de armadilhas que possuam este atrativo com o intuito de auxiliar no controle e/ou monitoramento da infestação das plantações pela broca.

O álcool polivinílico (Figura 5) é um polímero linear solúvel em água com a cadeia carbônica possuindo um padrão predominante de grupos hidroxilas em átomos de carbono alternados.

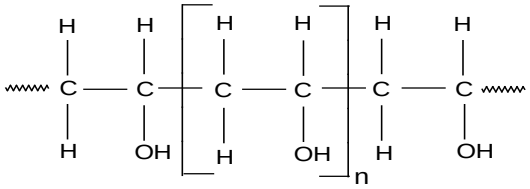


Figura 5: Estrutura do álcool polivinílico (Szafren *et al.*, 1992).

Espera-se que a estrutura reticulada deste gel dificulte a liberação das substâncias voláteis presentes no meio: os álcoois e os demais atrativos.

Foram também realizadas comparações com diferentes concentrações do polímero (álcool polivinílico ou PVA) e do agente de reticulação (tetraborato de sódio ou bórax, $Na_2B_4O_7$) para que possa ser mantida uma taxa de perda de voláteis constante.

Realizaram-se três ensaios diferentes partindo de diferentes concentrações das soluções constituintes da matriz, que podem ser observados, resumidamente, no organograma que segue (Figura 6).

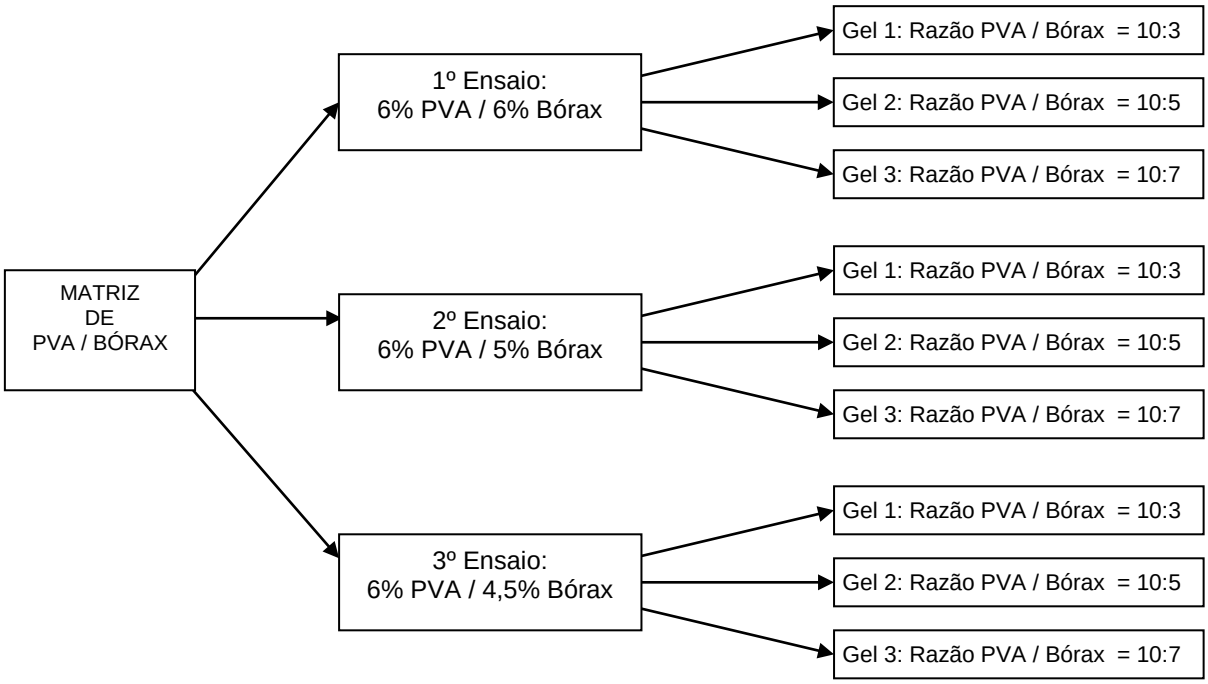


Figura 6: Ensaios realizados para a elaboração da matriz liberadora de voláteis

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 - Caracterização dos voláteis

Algumas substâncias voláteis foram caracterizadas pela primeira vez no fruto do café. Estas substâncias são as seguintes: álcool benzílico (**1**), benzaldeído (**2**), 2-feniletanol (**3**) e 2-hexenal (**4**). Também encontramos substâncias anteriormente descritas (Mathieu, 1996 e 1998) como: a 2-heptanona (**5**), o acetato de 2-heptila (**6**), o salicilato de metila (**7**) e o salicilato de etila (**8**). Todas as estruturas destas substâncias citadas acima podem ser observadas na Figura 7.

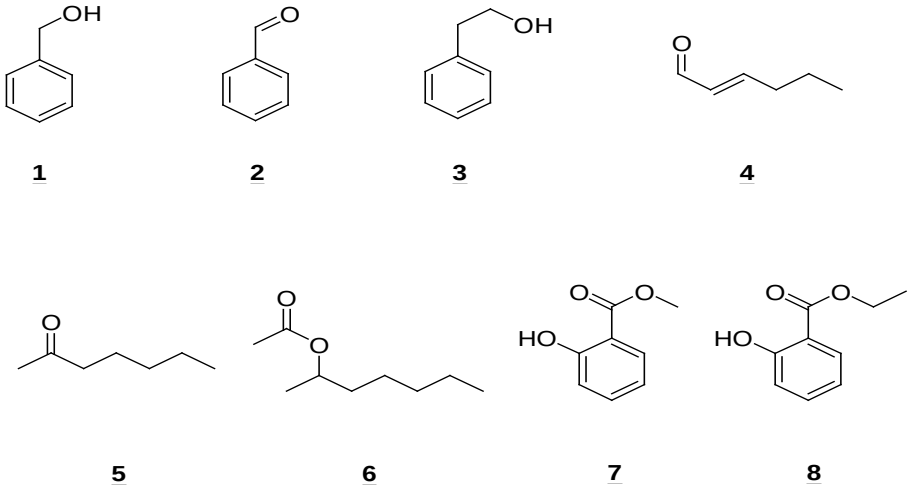


Figura 7: Substâncias Isoladas

O fragmentograma adquirido para o álcool benzílico pode ser observado abaixo.

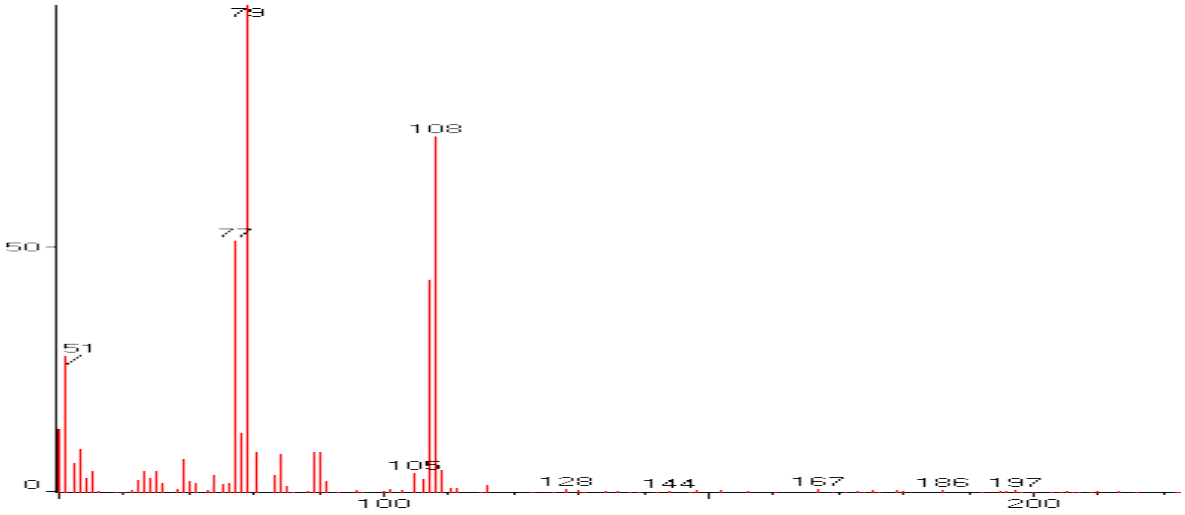


Figura 8: Fragmentograma do álcool benzílico (**1**)

A estrutura do álcool benzílico, bem como as demais substâncias identificadas, foi sugerida pela comparação com o banco de dados dos programas NIST 21 e 107 do aparelho GCMS/QP5050A. A nossa análise do fragmentograma corrobora esta sugestão. Na Figura 9 sugere-se uma seqüência de mecanismos para o aparecimento dos cincos picos principais observados no respectivo fragmentograma.

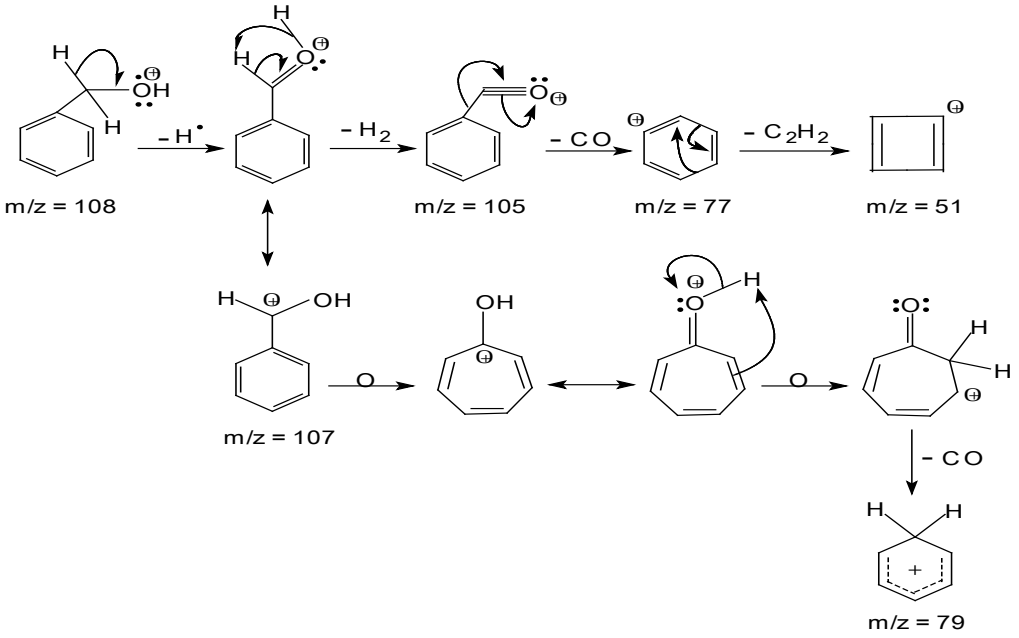


Figura 9: Mecanismo sugerido para o álcool benzílico (**1**)

A estrutura do benzaldeído pode ser confirmada pelo seguinte fragmentograma (Figura 10) e o seu respectivo mecanismo de fragmentação proposto na Figura 11.

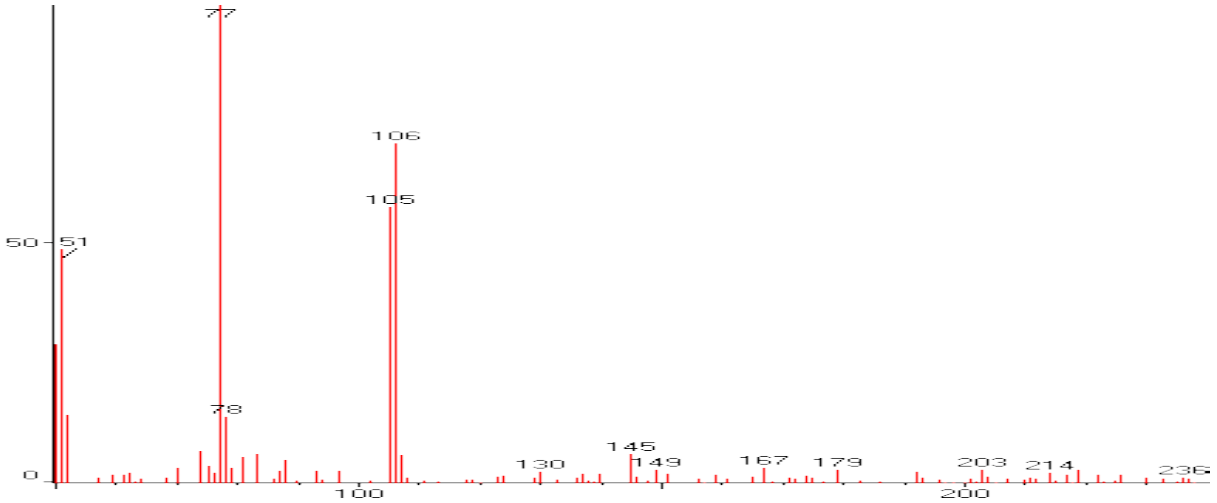


Figura 10: Fragmentograma do benzaldeído (**2**)

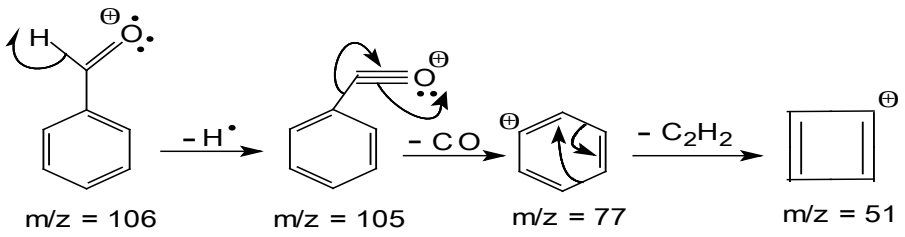


Figura 11: Mecanismo sugerido para a fragmentação do benzaldeído (**2**)

A identificação da substância (**3**), 2-feniletanol, se deu através do fragmentograma abaixo (Figura 12).

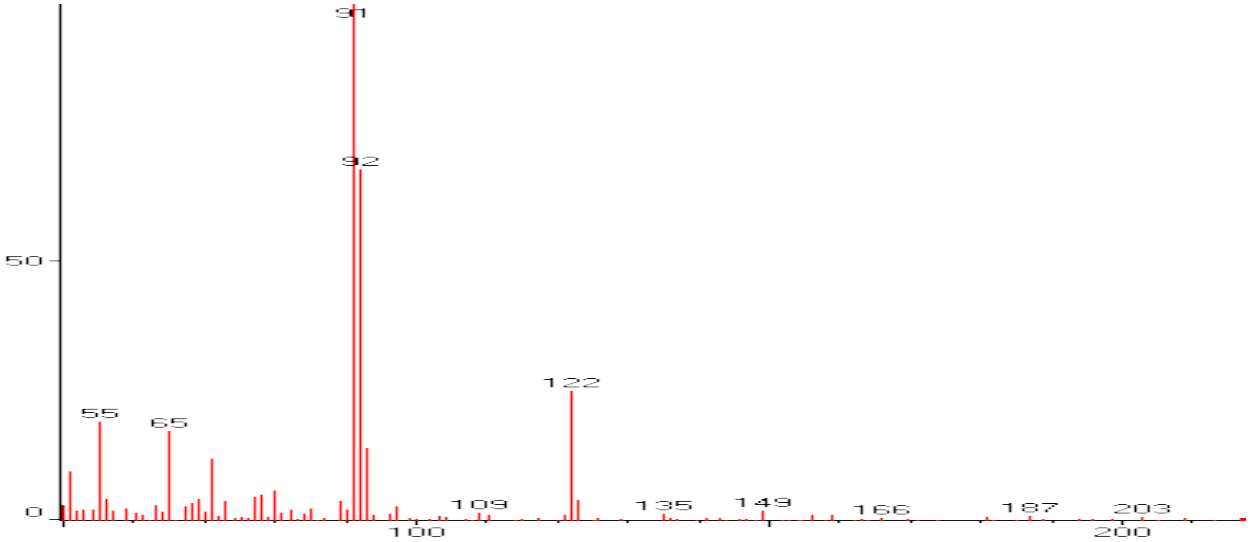


Figura 12: Fragmentograma do 2-feniletanol (**3**)

O mecanismo sugerido para a fragmentação do 2-feniletanol está descrito na Figura 13.

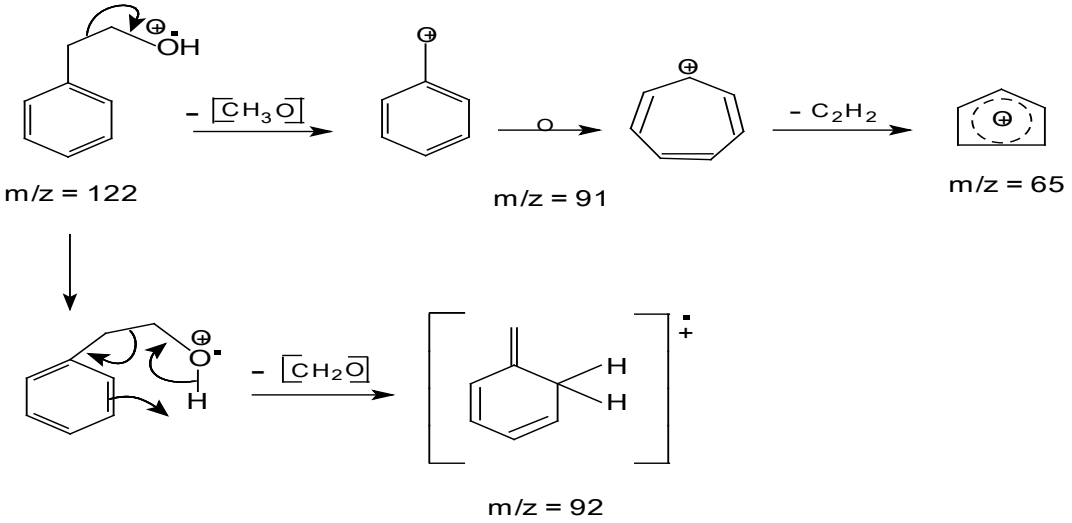


Figura 13: Mecanismo sugerido para a fragmentação do 2-feniletanol (**3**)

A confirmação do 2-hexenal pode ser observada pelo fragmentograma descrito a seguir (Figura 14) e respectiva sugestão para o mecanismo de fragmentação pode ser verificada na Figura 15.

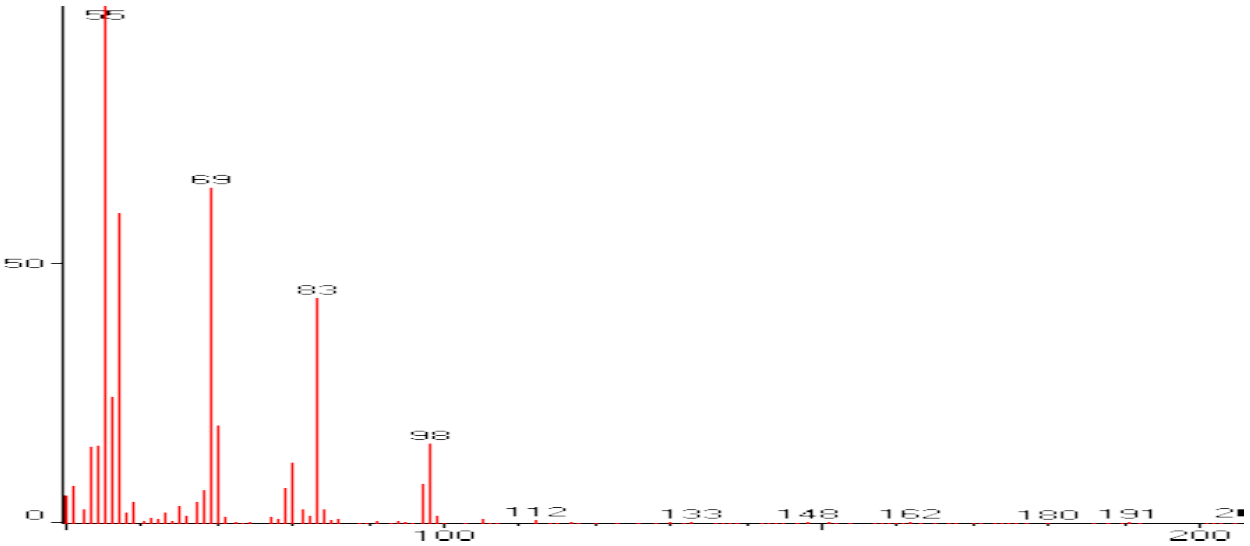


Figura 14: Fragmentograma do 2-hexenal (**4**)

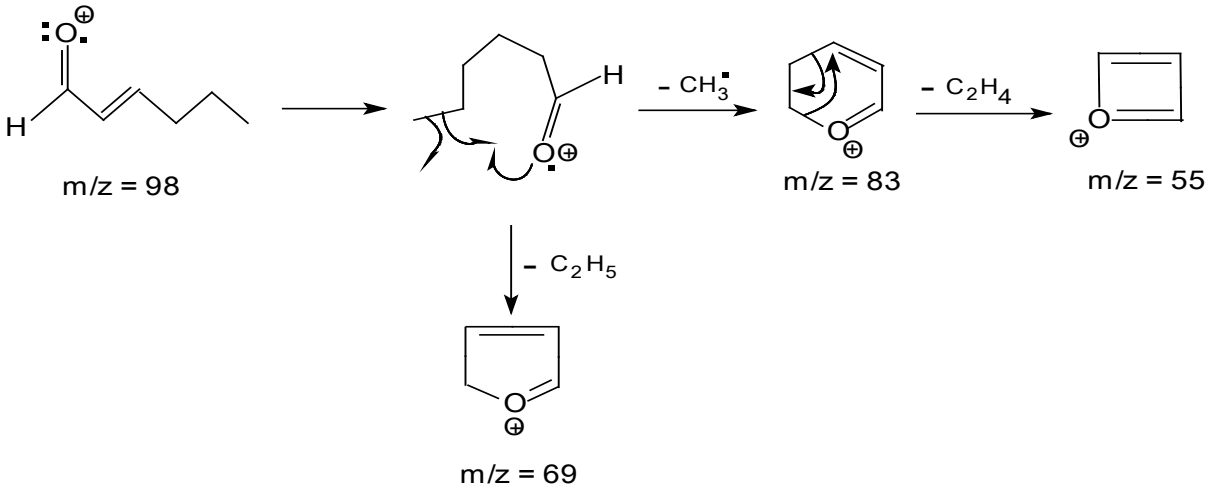


Figura 15: Mecanismo sugerido para a fragmentação do 2-hexenal (4)

O cromatograma da Figura 16 confirma a presença de todas as substâncias identificadas que foram mencionadas anteriormente, com exceção da substância 6 (acetato de 2-heptila) que não apareceu neste cromatograma devido ao estágio de maturação do fruto.

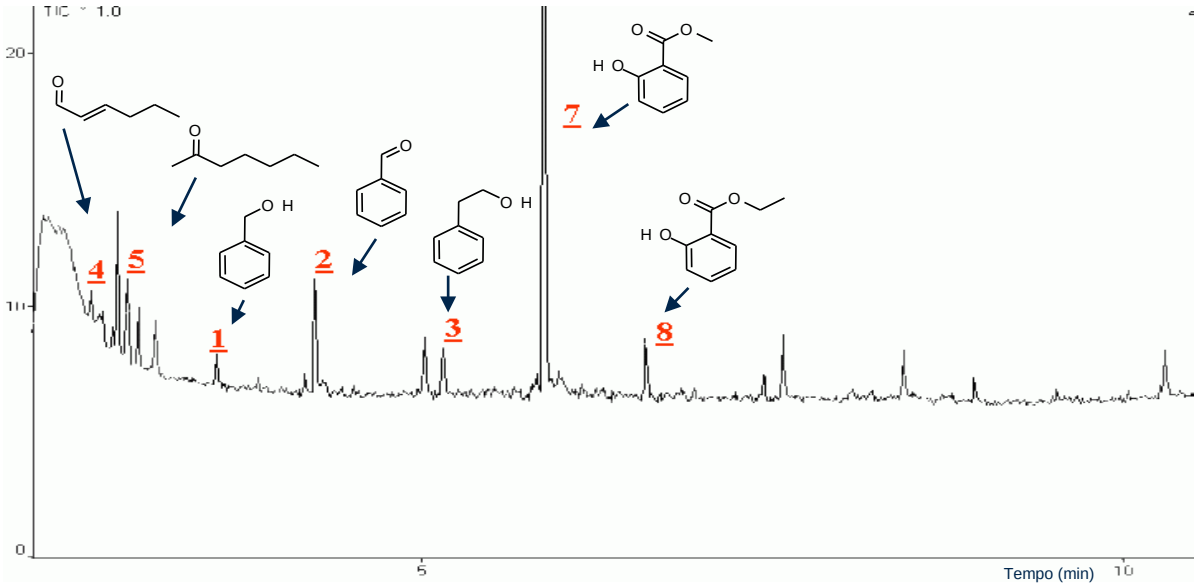
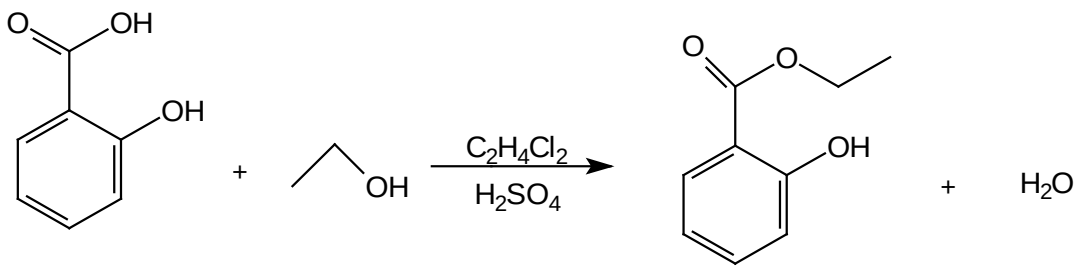


Figura 16: Cromatograma obtido com os voláteis do café conillon.

4.2 - Síntese das substâncias identificadas

A síntese do salicilato de etila ocorreu por meio de uma esterificação do ácido salicílico com o álcool etílico. A reação foi catalisada pelo ácido sulfúrico concentrado em presença de 1,2-dicloroetano e esta descrita abaixo (Reação 1).



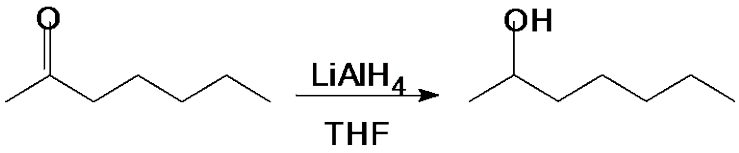
Reação 1: Obtenção do salicilato de etila.

O procedimento utilizado nesta síntese está descrito abaixo.

- <u>Síntese do salicilato de etila:</u>
  - Em um balão de 100 mL, adicionaram-se 15 mL de etanol, 37 mL de 1,2-dicloroetano, 17 g de ácido salicílico e 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. Colocou-se um bastão magnético e, sob agitação, aqueceu-se a mistura em refluxo por 8 horas.
  - A mistura do balão foi então transferida para um funil de decantação e a fase orgânica foi separada.
  - A fase orgânica foi lavada com água, depois com uma solução de bicarbonato de sódio 10% e novamente com água. Foi usado posteriormente, sulfato de sódio anidro para secar a solução.
  - A seguir, a solução foi filtrada e transferida para um balão de 150 mL, onde o 1,2-dicloroetano foi destilado.
  - O resíduo foi transferido para um balão de 50 mL sendo novamente destilado com a utilização de um condensador a ar.

Após o término da reação, foi necessário retirar o excesso de água com o sulfato de magnésio anidro. O solvente remanescente foi removido pela utilização do evaporador rotativo. Obteve-se nesta síntese o rendimento de 78%, após purificação.

A preparação do acetato de 2-heptila aconteceu em duas etapas. Primeiro, realizou-se a redução da 2-heptanona a 2-heptanol utilizando-se o $LiAlH_4$ como agente redutor, como descrito na reação 2.



Reação 2: Obtenção do 2-heptanol.

Os procedimentos utilizados nesta etapa podem ser verificados em seguida.

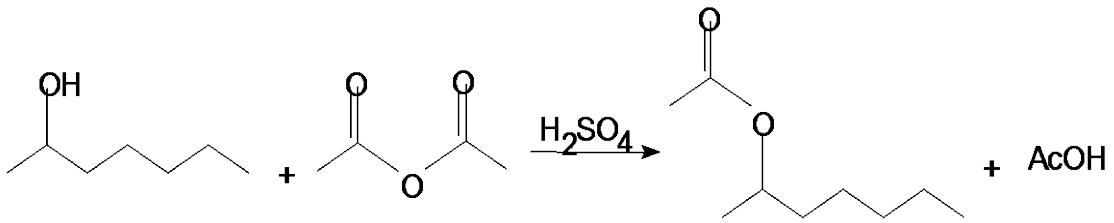
- <u>Síntese do 2-heptanol:</u>
  - Em um balão de 100 mL, sob atmosfera inerte, contendo 620 mg de hidreto de lítio e alumínio em 30 mL de THF (tetrahidrofurano) anidro, adicionou-se uma solução de 7,3 mL de 2-heptanona com 7 mL de THF sob agitação.
  - O refluxo foi mantido por 3 horas. A reação demonstrou-se bastante exotérmica. Após este período a reação foi resfriada a temperatura ambiente e, em seguida, foi adicionada água lentamente.
  - Resfriou-se a solução até que o gás H_2 não evoluísse mais e, ao final, adicionou-se uma solução aquosa de H_2SO_4 10% até que o precipitado de hidróxido de alumínio dissolvesse. Nesta etapa verificou-se um pH igual a 3.
  - A mistura do balão foi então transferida para um funil de decantação e as fases foram separadas. A fase aquosa foi saturada com NaCl e extraída com éter.

Nesta reação, o produto obtido não foi o desejado e foi possível notar que junto ao 2-heptanol havia a presença de uma quantidade significativa de impurezas. Diante desta situação, foi necessário realizar alguns procedimentos extras como segue descrito.

- O produto obtido foi colocado, novamente, em refluxo com 780 mg de hidreto de lítio e alumínio em 30 mL de THF de um dia para outro.

- Após a retirada do refluxo e a reação chegar a temperatura ambiente, foi adicionado a mistura reacional uma solução aquosa de NaOH 15% lentamente e sob agitação constante até a formação do precipitado.
- Posteriormente, a solução foi decantada e transferida para uma ampola de separação, onde foi lavada com uma solução de cloreto de amônio saturada e com água, respectivamente. Em seguida, a mistura reacional foi seca com sulfato de sódio anidro e levada ao evaporador rotativo.

Na segunda etapa, realizou-se a acilação do 2-heptanol com anidrido acético, como pode ser observado na reação 3.



Reação 3: Obtenção do acetato de 2-heptila.

O procedimento segue descrito abaixo.

- <u>Síntese do acetato de 2-heptila:</u>

  - Em um balão de 100 mL, colocaram-se 9,90 mL de 2-heptanol, 17 mL de anidrido acético, 2 mL de ácido sulfúrico concentrado e alguns fragmentos de porcelana porosa. Adaptou-se condensador para refluxo e aqueceu-se, até a ebulição, por 2 horas.
  - Verteu-se a mistura sobre 70 mL de água, contidos em funil de separação.

- Separou-se a camada aquosa e lavou-se o éster com cerca de 20 mL de água, com 6 mL de solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio e com 10 mL de água.

- Secou-se o éster com cloreto de cálcio anidro, filtrou a solução para um balão de 50 mL e, por fim, realizou-se a destilação e purificação.

Obteve-se nesta síntese um rendimento de 54%, após purificação. Tanto o salicilato de etila quanto o acetato de 2-heptila foram caracterizados por EM, IV, RMN- ^{13}C e ^{1}H.

4.3 - Ensaios biológicos

Estudos anteriores (Mora, 1991 e Mathieu, 1998) constataram atratividade nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 2,0% para as soluções das substâncias já conhecidas. Deste modo, realizaram-se os ensaios biológicos de atratividade utilizando-se as concentrações supracitadas.

Dentre todas as sustâncias encontradas, a que gerou maior atratividade foi o benzaldeído, que registrou um aumento de 30% na atratividade. As concentrações de benzaldeído utilizadas foram: 0,5%; 1,0% e 2,0%. As variações das concentrações não demonstraram diferenças significativas nas atratividades. Testaram-se também as substâncias (4), (5) e (7) (Figura 6 na página 21) em diferentes concentrações.

Todas as respostas, demonstradas na Tabela 1, evidenciaram um aumento da atratividade. As respostas olfativas da broca foram evidenciadas pela mudança de comportamento do inseto ao interceptar o fluxo de odor.

Tabela 1: Respostas olfativas do *Hypothenemus hampei* a voláteis extraídos do grão de café.

Substâncias	% de resposta positiva
A. Metanol + etanol (3:1) controle	49,50
B. 2-hexenal (2%)	80,95
C. 2-hexenal (1%)	82,00
D. 2-hexenal (0,5 %)	80,00
E. Salicilato de metila (1%)	67,5
F. 2-heptanona (1%)	76,9
G. 2-heptanona (0,5%)	77,5

Os testes realizados demonstraram uma resposta mais acentuada para a atratividade do 2-hexenal (2%, 1% e 0,5%) e 2-heptanona (1% e 0,5%). Os resultados desses testes, de uma maneira geral, podem ser melhor observados no gráfico que segue.

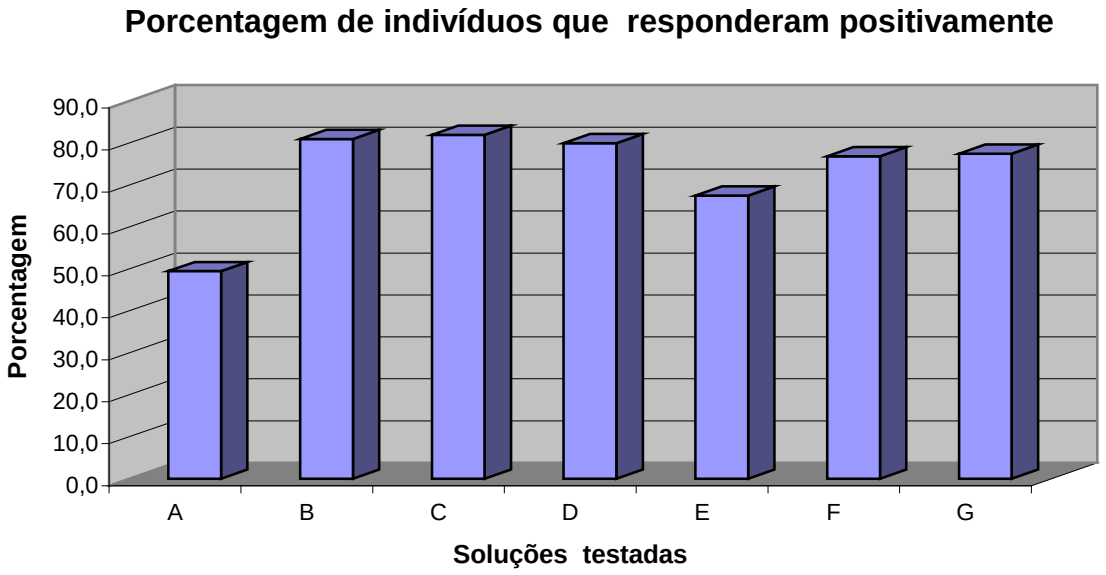


Gráfico 1: Resposta positiva da broca aos estímulos olfativos

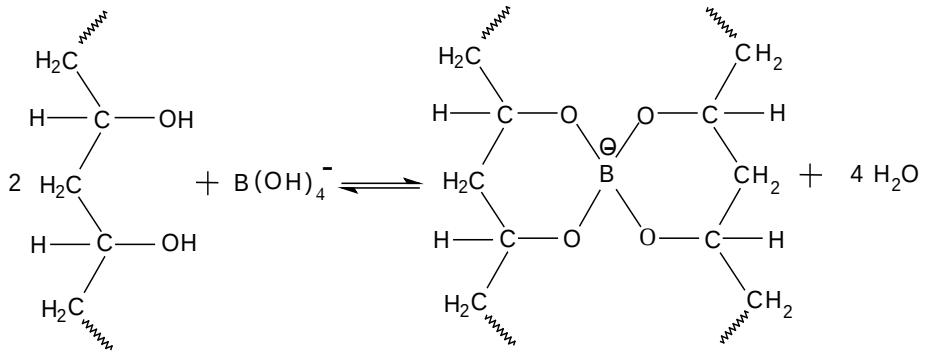
4.4 - Estudo de matrizes para liberação dos voláteis

A matriz estudada nesta parte do trabalho, segundo estudos anteriores (Mora, 1991), deveria conter uma taxa de liberação dos álcoois (Metanol/Etanol – 3:1) estável e definida em 60 $mg.dia^{-1}$.

A primeira dificuldade a ser enfrentada neste estudo foi a de fixar uma perda de voláteis em um valor constante. Uma outra dificuldade foi a de se obter uma matriz que dificultasse a liberação destes álcoois, até mesmo por esta ser uma taxa de liberação muito baixa.

Nesta perspectiva, a elaboração de um gel de PVA e bórax demonstrou favorecer esta intenção, pois a formação desta matriz ocorre pelas ligações cruzadas

que são geradas pelo contato de duas cadeias de PVA com os íons $B(OH)_4^-$ (Reação 4).



Reação 4: Íon tetraborato formando ligações cruzadas entre duas cadeias de PVA (Szafren *et al.*, 1992).

Neste estudo testamos experimentalmente a estabilidade, a taxa de deformação e a taxa de liberação dos álcoois no gel (ou matriz) composto por álcool polivinílico (PVA) e bórax (tetraborato de sódio).

A estabilidade e a taxa de deformação foram verificadas de maneira qualitativa. Verificou-se a estabilidade do gel observando seu aspecto físico e a durabilidade do mesmo. Já a taxa de deformação da matriz foi medida pelo tempo em que o gel, em uma forma esférica, demorou a assumir o formato do recipiente em que aconteceu a análise.

A taxa de liberação dos álcoois foi determinada em conjunto com a perda de massa, sendo esta observada em diferentes concentrações. Entretanto, como esta perda inclui todos os voláteis presentes no gel, foi necessário distinguir a perda de água e a perda dos álcoois. Partindo das respectivas proporções em volume de cada análise, considerou-se a densidade aproximadamente igual a 1 $g.cm^{-3}$ para os solventes.

Nesta etapa do trabalho foram realizados três ensaios da matriz composta pela solução aquosa de PVA e solução alcoólica (Metanol/Etanol – 3:1) de bórax. Utilizou-se a solução de PVA em seu limite de solubilidade (6%). Variou-se a concentração da solução de bórax por ser este o agente reticulante. Durante todos os ensaios manteve-se constante a temperatura, cerca de 25°C, e a umidade com a presença de ar condicionado.

No primeiro ensaio, foi preparado o gel com a solução aquosa de PVA e solução alcoólica de bórax, sendo ambas a 6%. A análise foi realizada num recipiente cuja área foi de 12,57 cm^2 e usando-se amostras com as proporções apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Proporções em volume das amostras do 1°, 2° e 3° ensaios.

Gel	Proporção das soluções (PVA/Bórax)	Proporção dos voláteis (H_2O/metanol/etanol)
1	10 : 3	10 : 2,25 : 0,75
2	10 : 5	10 : 3,75 : 1,25
3	10 : 7	10 : 5,25 : 1,75

A taxa de deformação verificada para a amostra 1 foi cerca de 1 hora e 20 minutos. No caso das amostras 2 e 3 não se obteve estabilidade em sua forma física. Conseqüentemente, não foi possível realizar o teste de deformação, pois estes não conseguiram assumir um formato esférico. Já para a amostra 1 obteve-se estabilidade em sua forma física por 3 dias.

Mediante os resultados obtidos na estabilidade e taxa de deformação para este ensaio, foi observado a taxa de liberação dos álcoois na amostra 1. A perda dos álcoois foi obtida considerando-se as proporções em volume de cada amostra.

Tomando como exemplo o Gel 1 do primeiro ensaio, mediu-se a perda de massa na 1ª hora de análise como 210 mg. Dividindo este valor por 13 (volume total) e assumindo a densidade 1 $g.cm^{-3}$ para os solventes, como já mencionado, obtém-se um valor de 16,15 mg. Portanto, como neste gel existia uma proporção de álcool de 3:10 (3 em 10), confirmou-se uma perda de 48,45 mg para os álcoois nesta primeira hora de análise. Normalizando esta liberação de álcoois, em termos da área do recipiente em que ocorreu a análise, é possível constatar uma perda de 3,85 $mg.cm^{-2}.h^{-1}$. Este mesmo raciocínio foi seguido para achar a quantidade de perda de álcoois nas outras horas de análise e em todas as outras amostras.

Os resultados obtidos para perda de massa e, conseqüentemente, a perda dos álcoois pode ser verificada na Tabela 3.

Tabela 3: Perda de massas e dos álcoois do 1° ensaio

Verificando-se os resultados obtidos através desta análise foi possível constatar uma perda de massa pouco constante ao longo da medição.

TEMPO (h)	GEL 1	
	Perda de Massa (mg)	Perda dos Álcoois ($mg.cm^{-2}$)
1	210	3,85
2	140	2,57
3	300	5,51
4	220	4,04
5	140	2,57
6	160	2,94
7	180	3,30
8	170	3,12

O segundo ensaio foi realizado com solução aquosa de PVA 6% e solução alcoólica de bórax 5%. Todas as amostras foram analisadas com um recipiente contendo uma área de 11,98 cm^2 e foram preparadas nas mesmas proporções do primeiro ensaio (Tabela 2).

As análises realizadas com estas amostras determinaram uma melhor estabilidade somente com o gel 1. Verificou-se a estabilidade da forma física para esta amostra em cerca de 4 dias. Além disso, a medida da taxa de deformação observada para a amostra 1 foi de aproximadamente 1 hora.

Mediante a melhor estabilidade da amostra 1, foi analisado a taxa de liberação dos álcoois através da perda de massa somente nesta amostra.

A partir da perda de massa medida, calculou-se a perda de álcoois no 2º. ensaio seguindo o mesmo raciocínio descrito no ensaio anterior. Os dados obtidos para a perda de massa e de álcoois podem ser observados no Tabela 4.

Tabela 4: Perda de massas e dos álcoois do 2° ensaio.

TEMPO	GEL 1

(h)	Perda de massa (mg)	Perda dos Álcoois ($mg.cm^{-2}$)
1	310	5,97
2	190	3,66
3	160	3,08
4	160	3,08
5	170	3,27
6	140	2,70
7	140	2,70
8	150	2,89

Observando os resultados é possível verificar certa estabilização na perda de massa entre três e quatro horas, porém esta perda não se manteve constante após este período.

Por fim, no terceiro ensaio realizado, utilizou-se uma matriz composta por PVA 6% e de bórax 4,5%. A análise foi realizada num recipiente cuja área foi de 9,07 cm^2 para todas as proporções.

Realizou-se a comparação da estabilidade, taxa de deformação e perda de massa em três amostras com proporções de PVA / bórax iguais às mostradas na Tabela 2.

O gel preparado a partir das soluções de PVA 6% e bórax 4,5% demonstrou estabilidade em sua forma física por 4 dias em todas as amostras. A taxa de deformação para as três proporções neste ensaio foi estimada aproximadamente em 45 minutos para cada amostra em questão.

Os resultados para a perda de massa verificada e a perda dos álcoois podem ser observados resumidamente na Tabela 5.

Tabela 5: Perda de massas e dos álcoois do 3° ensaio.

TEMPO (h)	GEL 1		GEL 2		GEL 3	
	Perda de Massa (mg)	Perda dos Álcoois ($mg.cm^{-2}$)	Perda de Massa (mg)	Perda dos Álcoois ($mg.cm^{-2}$)	Perda de Massa (mg)	Perda dos Álcoois ($mg.cm^{-2}$)
1	230	5,85	270	9,92	310	14,07

2	150	3,82	160	5,88	190	8,62
3	160	4,07	180	6,61	190	8,62
4	120	3,05	140	5,14	150	6,81
5	120	3,05	140	5,14	180	8,77
6	120	3,05	140	5,14	170	7,77
7	110	2,80	130	4,78	160	7,26
8	120	3,05	140	5,14	170	7,72

Os dados obtidos podem ser melhor comparados ao analisar o Gráfico 2 que segue.

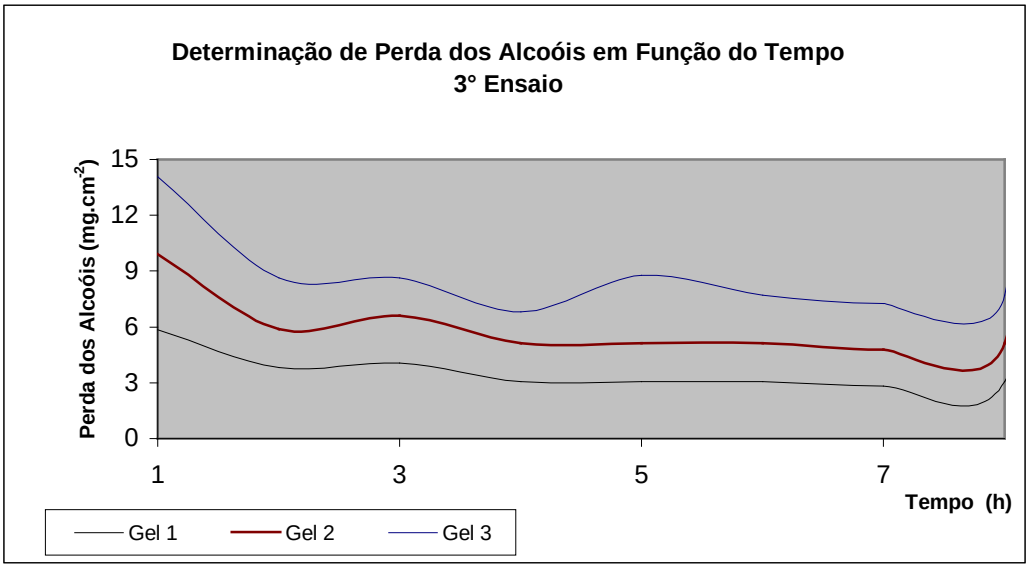


Gráfico 2: Matrizes formadas por PVA 6% / Bórax 4,5%.

Através da análise deste gráfico é possível verificar que, após 4 h de preparação, houve certa constância na perda dos álcoois. Entretanto, o melhor resultado obtido foi para o Gel 1, sendo a taxa de perda de álcoois em torno de 3,05 $mg.cm^{-2}.h^{-1}$.

Ao confrontarmos os resultados de todos os géis nas proporções 10:3, nos três ensaios realizados, obtivemos as variações para a perda de álcoois observadas no gráfico a seguir (Gráfico 3).

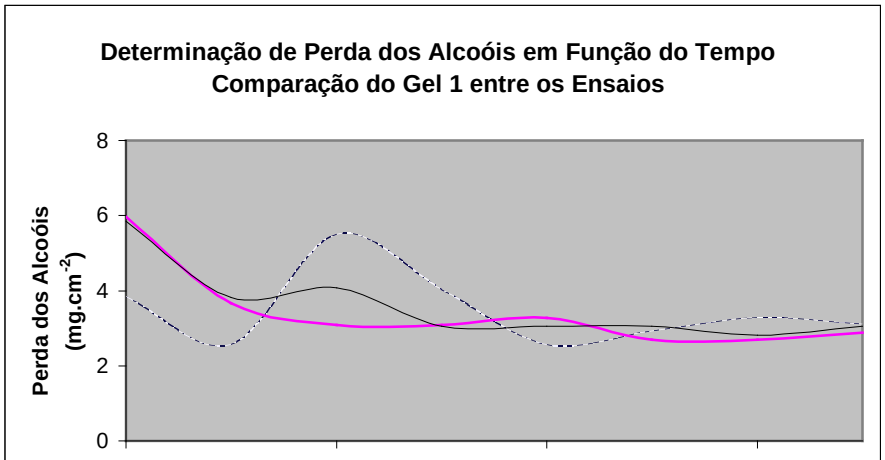


Gráfico 3: Comparação em relação ao Gel 1 dos três ensaios.

Analisando estes resultados, percebe-se que a variação de perda de álcoois no segundo e terceiro ensaios é bem próxima. No caso, foi verificado certa estabilidade no 2° Ensaio em uma taxa de 3,08 $mg.cm^{-2}.h^{-1}$ enquanto que para o 3° Ensaio constatou-se uma taxa mais constante em 3,05 $mg.cm^{-2}.h^{-1}$.

Considerando este fato, nota-se que as melhores propriedades mecânicas e taxas de liberação dos voláteis mais homogêneas devem ser obtidas em um gel que possua um grau de reticulação adequado entre diferentes cadeias.

Aparentemente uma maior proporção de agente reticulante (bórax) em relação ao polímero (PVA) leva a um grande grau de reticulação entre poucas cadeias.

Já uma concentração um pouco menor do agente reticulante em relação ao polímero leva a um grau de reticulação um pouco menor, entretanto atingindo um número maior de cadeias dos polímeros levando a géis mais rígidos. Portanto, a diferença no grau de reticulação proporciona diferentes taxas de liberações dos voláteis, como pode ser notado no Gráfico 3.

Considerando como melhor resultado o gel 1 do 3° ensaio, é necessário fazer uma analogia em termos da taxa de liberação de álcoois almejada. Inicialmente a taxa de perda dos álcoois no Gel 1 seria em torno de 73,2 $mg.cm^{-2}$ ao dia (3,05 $mg.cm^{-2}.h^{-1}$**.** $24h.dia^{-1}$). O resultado alcançado foi 22% maior que a taxa desejada, que segundo Mora é de 60 $mg.dia^{-1}$.

Esta etapa do trabalho está longe do seu objetivo final, visto que, fazer com que uma matriz possua uma taxa de liberação de voláteis constante mediante situações diversas, como as condições climáticas, é uma das maiores dificuldades deste estudo.

5. CONCLUSÕES

Os dados obtidos até o momento demonstraram a existência da interação cairomonal entre o café robusta (*Coffea canephora*) e a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*). Neste trabalho confirmamos que uma das fontes de emissão dos voláteis responsáveis pela atratividade é a cereja do café.

Foram detectadas pela primeira vez no fruto do café quatro substâncias voláteis que anteriormente não foram descritas, sendo elas: o álcool benzílico, o benzaldeído, o 2-feniletanol e o 2-hexenal. Inclusive, uma destas substâncias, o benzaldeído, demonstrou uma atratividade maior em relação a todas as substâncias caracterizadas neste trabalho. Também houve marcada resposta às substâncias 2-hexenal (2,0; 1,0 e 0,5%) e 2-heptanona (1,0 e 0,5%).

Mediante o complexo mecanismo de interação cairomonal existente entre a planta e a praga, é necessária uma maior elucidação do mesmo para que possa ser estabelecida uma melhor compreensão desta relação.

Como a concentração e a taxa de liberação dos semioquímicos empregados na matriz influenciam a atratividade da praga, há uma enorme dificuldade em estabelecer estes fatores, principalmente quando os relacionam com os aspectos ambientais, como temperatura e umidade.

Os indícios encontrados no estudo das matrizes retratam um melhor desempenho no gel constituído de PVA 6% e de bórax 4,5%, no qual foi verificada uma boa estabilidade na sua forma física por quatro dias. Verifica-se também que a liberação dos álcoois poderá ser controlada de acordo com a área do recipiente que será colocado a matriz e o grau de reticulação do gel.

O trabalho realizado até o momento representa apenas um começo de uma longa jornada onde será possível compreender esta relação complexa entre o *Hypothenemus hampei* e o *Coffea canephora*.

6. BIBLIOGRAFIA

- BARRERA, J. F. BAKER, P. S.; SCHWARZ, A. e VALENZUELA, J. E.; "Introducción de dos Especies de Parasitoides Africanos a Mexico para el Control de la Broca del Café, Hypothenemus Hampei (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae)"; Folia Entomologica Mexicana, v.79. p. 245, 1990.

- BATISTA, M.; Tese de Mestrado; "Efeitos de diferentes índices de infestação pela broca-do-café Hypothenemus hampei (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae) no peso e na classificação do café pelo tipo e pela bebida". Escola Superior de Agricultura de Lavras, 1986. 67p.. Lavras, Minas Gerais.

- BENASSI, V. L. R. M. & CARVALHO, C. H. S. de. "Preferência de ataque a frutos de Coffea arábica e C. canephora pela broca-do-café, Hypothenemus hampei (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae)". Revista de Agricultura, v.69 (1). p.103-111, 1989.

- BRUN, L. O.; MARCILLAUD, C.; GAUDICHON, V. e SUCKLING, D. M.; "Cross Resistance between Insecticides in Coffee Berry Borer, Hypothenemus Hampei (Coleoptera, Scolytidae) from New-Caledonia"; Bulletin of Entomological Research, v.84. n.2. p. 175, 1994.

- BRUN, L. O.; MARCILLAUD, C,; GAUDICHON, V. e SUCKLING, D. M.; "Endossulfan Resistance in Hypothenemus Hampei (Coleoptera, Scolytidae) in New-Caledonia"; Journal of Economic Entomology, v.82. n.5. p. 1310, 1989.

- BRUN, L. O.; MARCILLAUD, C,; GAUDICHON, V. e SUCKLING, D. M.; "Monitoring of Endossulfan and Lindane Resistance in the Coffee Berry Borer Hypothenemus Hampei (Coleoptera, Scolytidae) in New-Caledonia"; Bulletin of Entomological Research, v.80. n.2. p. 129, 1990.

- CAMARGO, R., TELLES JR. , A. Q.; "O Café no Brasil", Vol I. Rio de Janeiro: Guarany, 1953.

- CHALFOUN, S. M.; SOUZA, J. C. e CARVALHO, V. D. de. "Relação entre a incidência da broca, Hypothenemus hampei (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae) e microorganismos em grãos de café". In: Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 11, Londrina, p.149-150. 1984. Anais

- GUTIERREZMARTINEZ, A. e ONDARZA, R. N.; "Kairomone Effect of Extracts from Coffea canephora over Hypothenemus hampei (Coleoptera: Scolytidae)"; Environmental Entomology, v.25. n.1. p.96,

1996.

- HELMIG, D. e GREENBERG, J. P.; "Automated in situ Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Analysis of ppt Level Volatile Organic Trace Gases Using Multistage Solid-Adsorbent Trapping"; J. Chromatograph Am, v.677.p. 123, 1994.

- http://www.conab.gov.br.html, acessado em 12/04/05

- http:://www.pr.gov.br/iapar/café/m&prodcons.html, acessado em 20/03/05.

- KOK, G. L.; CISPER, M. E. e HEMBERGER, P. H.; "Air Analysis Using Tenax Collection Jet-Separator Enrichment and Ion Trap Mass Spectrometric Analysis"; J. Am. Soc. Mass Spectrom., v.6. p. 1172, 1996.

- MATHIEU, F.; MALOSSE, C., CAIN, A. H. e FREROT, B.; "Comparative Headspace Analysis of Fresh Red Coffee Berries from Different Cultivated Varieties of Coffee Trees"; J. High Resol. Chromatogr., V.19, n.5 .p. 298, 1996.

- MATHIEU, F.; MALOSSE, C.; FRÉROT, B. "Identification of the components released by fresch coffee berries at different stages of ripeness". Journal Agric. Food Chem., v. 46, n. 3. p. 1106-1110,1998.

- MORA, J. R. M.; Tese de Mestrado, "Resposta da Broca do Café, Hypothenemus hampei, a Estímulos Visuais e Semioquímicos", Universidade Federal de Viçosa, 1991.

- MUNOZ, R.; "Life-Cycle and Parthenogenesis of the Coffee Berry Borer, Hypothenemus Hampei (Ferr)", Turrialba,v.39, n.3. p. 415, 1989.

- SOARES, B. G., SOUZA, N. A. e PIRES, D. X.. "Química Orgânica. Teoria e técnicas de preparação, purificação e identificação de compostos orgânicos". Rio de janeiro, Guanabara, 1988.

- SOUZA, J. C. de e REIS, P. R. "Broca-do-café - Histórico, Reconhecimento, Biologia, Prejuízos, Monitoramento e Controle". EPAMIG, Belo Horizonte, 1993. Boletim Técnico 40. 31 p.

- SOUZA, J. C. de; REIS, P. R. "Efeito da broca-do-café Hypothenemus hampei (Coleoptera: Scolytidae) na produção e qualidade do grão de café". In: Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 9, Campos do Jordão, São Paulo, 1980. Resumos. Rio de Janeiro, IBC, 1980. p.281-283.

- SZAFREN, Z.; PIKE, R. M.; FOSTER, J. C.; "Microscale Genaral Chemistry: With Selected Macroscale Experiments". Ed. John Wiley & Sons, p.259-263, 1992.