

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Idade de fêmeas colonizadoras de *Hypothenemus hampei* (Ferrari)  
e sua resposta aos voláteis de flores de café, *Coffea arabica* L.**

**Weliton Dias da Silva**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor  
em Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba  
2014**

**Weliton Dias da Silva  
Engenheiro Agrônomo**

**Idade de fêmeas colonizadoras de *Hypothenemus hampei* (Ferrari) e sua  
resposta aos voláteis de flores de café, *Coffea arabica* L.**

Orientador:  
Prof. Dr. **JOSÉ MAURÍCIO SIMÕES BENTO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor  
em Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba  
2014**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Silva, Weliton Dias da

Idade de fêmeas colonizadoras de *Hypothenemus hampei* (Ferrari) e sua resposta aos voláteis de flores de café, *Coffea arabica* L. / Weliton Dias da Silva. - - Piracicaba, 2014.

52 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Broca-do-café 2. Scolytinae 3. Bioecologia 4. Ecologia Química 5. Semioquímicos  
I. Título

CDD 633.73  
S586i

**"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte -O autor"**

## DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus pais, irmãos e à minha namorada Emiliana.



## AGRADECIMENTOS

A Deus pela força, saúde e coragem;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Doutorado no Brasil;

A CAPES e à Fundação Lemann pela bolsa de Doutorado Sanduíche no Exterior-Proc. nº: BEX 7234/12-0;

Ao INCT Semioquímicos na Agricultura;

Ao Prof. Dr. José Maurício Simões Bento por ser meu orientador no Doutorado;

Ao Dr. Lawrence M. Hanks pela supervisão e apoio durante o Doutorado Sanduíche nos EUA;

Ao Marcio Arruda, Steve Clough, Gabriel e Nilce pela grande ajuda dada durante a minha estadia nos EUA;

Aos meus colegas do Laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos: Aline Kamiya, Arodí Prado, Camila Costa e Mateus Tonelli pela ajuda nos experimentos de Doutorado;

Agradeço especialmente à Emiliana Romagnoli pela ajuda, paciência e incentivo durante a realização do meu Doutorado.



## SUMÁRIO

RESUMO .....	9
ABSTRACT .....	11
1 INTRODUÇÃO .....	13
2 DESENVOLVIMENTO.....	15
2.1 Revisão bibliográfica .....	15
2.1.1 Importância de <i>H. hampei</i> para a cafeicultura .....	15
2.1.2 Abandono do fruto nativo por fêmeas de <i>H. hampei</i> .....	18
2.1.3 Aspectos do comportamento reprodutivo de <i>H. hampei</i> .....	19
2.1.4 Ecologia química de <i>H. hampei</i> .....	20
2.1.5 Florescimento, polinização e voláteis de flores de café, <i>C. arabica</i> .....	22
2.2 Material e métodos.....	23
2.2.1 Determinação da idade de fêmeas colonizadoras de <i>H. hampei</i> .....	23
2.2.2 Resposta de fêmeas colonizadoras de <i>H. hampei</i> aos voláteis de flores de café, <i>C. arabica</i> .....	26
2.2.3 Análise estatística.....	31
2.3 Resultados.....	32
2.3.1 Determinação da idade de fêmeas colonizadoras de <i>H. hampei</i> .....	32
2.3.2 Resposta de fêmeas colonizadoras de <i>H. hampei</i> aos voláteis de flores de café, <i>C. arabica</i> .....	33
2.4 Discussão .....	39
2.4.1 Determinação da idade de fêmeas colonizadoras de <i>H. hampei</i> .....	39
2.4.2 Resposta de fêmeas colonizadoras de <i>H. hampei</i> aos voláteis de flores de café, <i>C. arabica</i> .....	41
3 CONCLUSÕES .....	45
REFERÊNCIAS .....	47



## RESUMO

### **Idade de fêmeas colonizadoras de *Hypothenemus hampei* (Ferrari) e sua resposta aos voláteis de flores de café, *Coffea arabica* L.**

A idade das fêmeas colonizadoras de *Hypothenemus hampei* (Ferrari) durante o abandono do hospedeiro, assim como sua resposta aos voláteis de flores de café, *Coffea arabica* L. var. Tupi, foram investigadas neste trabalho. Um dispositivo experimental que simulasse as condições de dentro do fruto de café e permitisse a observação da saída dos insetos foi utilizado para a determinação da idade das fêmeas colonizadoras. Em média, os besouros apresentaram 15 dias de idade no momento em que abandonaram o dispositivo experimental. Nesta idade as fêmeas estavam acasaladas, possuíam o tegumento totalmente melanizado, foram capazes de voar e produzir ovos viáveis. Os voláteis de flores de café, foram coletados por aeração, analisados por GC-EAD e GC-MS, e testados em bioensaios olfatométricos. As fêmeas colonizadoras de *H. hampei* foram atraídas pelos voláteis de flores de café. Dos 50 compostos encontrados nos extratos naturais, sete foram eletrofisiologicamente ativos aos insetos. Destes sete, somente metil salicilato, neral e geranial puderam ser identificados, e a mistura de seus padrões sintéticos foi a mais atrativa nos bioensaios olfatométricos. Tomados juntos, estes resultados trazem novas informações sobre a bioecologia e ecologia química da broca-do-café, as quais poderão ser usadas futuramente em pesquisas de base e naquelas focadas no desenvolvimento de novas estratégias de manejo para *H. hampei* em cafezais.

Palavras-chave: Broca-do-café; Scolytinae; Bioecologia; Ecologia Química; Semioquímicos



## ABSTRACT

### **Age of colonizing *Hypothenemus hampei* (Ferrari) females and their response to volatiles of coffee, *Coffea arabica* L., flowers**

The age of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) females during the host abandonment, as well as their response to coffee flower volatiles were determined under laboratory conditions. An experimental device that simulated the conditions inside a coffee berry, and that allowed the observation of the insects coming out was used to determine the age of colonizing females. On average, the beetles were 15 d-old at the moment they abandoned the experimental device. In this age, the females were mated, had a fully melanized tegument, were able to fly and to produce viable eggs. The volatiles of coffee, *Coffea arabica* L. var. Tupi, flowers were collected by aeration, analyzed in GC-EAD and GC-MS, and tested in olfactometer bioassays. The colonizing *H. hampei* females were attracted by the coffee flower volatiles. Of 50 compounds found in the natural extracts, seven were electrophysiologically active to the insects. Of these seven, only methyl salicylate, neral and geraniol could be identified, and the blend with their synthetic standards was the most attractive in the olfactometer bioassays. Taken together, these results bring new information on the bioecology and chemical ecology of the coffee berry borer, which may be used in the future by basic researches or by those focused on the development of new strategies for the management of *H. hampei* in coffee farms.

Keywords: Coffee berry borer; Scolytinae; Bioecology; Chemical Ecology; Semiochemicals



## 1 INTRODUÇÃO

A broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), é a principal praga da cafeicultura no mundo, causando prejuízos que ultrapassam meio bilhão de dólares ao ano e afetando milhões de famílias cafeicultoras (INFANTE; PÉREZ; VEGA, 2012, JARAMILLO et al., 2013).

Após a cópula, as fêmeas de *H. hampei* frequentemente abandonam o fruto de café no qual se desenvolveram para colonizarem outros frutos no campo. Por esta razão, tais fêmeas são chamadas de 'fêmeas colonizadoras' (MATHIEU; BRUN; FRÉROT, 1997, MATHIEU et al., 2001). Estímulos ambientais como temperatura, umidade relativa do ar (BAKER et al., 1992) e luminosidade (MATHIEU; BRUN; FRÉROT, 1997), além das condições da musculatura alar do inseto (LÓPEZ-GUILLÉN et al., 2011) exercem grande influência sobre o processo de saída da broca-do-café de seu hospedeiro nativo.

Informações sobre a idade de fêmeas colonizadoras de *H. hampei* tem sido obtidas por alguns autores baseadas somente em observações indiretas do comportamento destes insetos (GIORDANENGO, 1992, MATHIEU et al., 2001) e, por isso, permanencem conjecturais. Este parâmetro biológico pode ser muito importante no planejamento de experimentos com *H. hampei*, uma vez que determinado estado fisiológico do inseto é expresso somente a partir ou até uma idade específica e, portanto, pode determinar a resposta dos indivíduos aos tratamentos.

Na natureza, o modo como as fêmeas colonizadoras de *H. hampei* encontram seu hospedeiro ainda permanece pouco conhecido. Giordanengo, Brun e Frérot (1993) demonstraram que voláteis produzidos pelos frutos de café exercem papel importante neste processo. Contudo, embora alguns compostos eletrofisiologicamente ativos nos frutos já tenham sido identificados (MENDESIL et al., 2009, JARAMILLO et al., 2013, ROBLERO; MALO, 2013), os resultados são ainda conflitantes, existindo lacunas sobre informações da ecologia química de *H. hampei* que precisam ser preenchidas, principalmente no que se diz respeito a possibilidade desta espécie utilizar fontes adicionais de semioquímicos durante a procura do hospedeiro. Neste sentido, a busca por novos semioquímicos a partir de outras fontes que sejam atrativos a broca-do-café para serem utilizados em

armadilhas no campo para monitoramento e captura desta praga se torna extremamente importante, tanto sob o ponto de vista econômico como o ambiental.

Uma dessas fontes inexploradas é a flor do cafeeiro, cujos voláteis poderiam exercer influência na localização dos frutos de café por *H. hampei*. Esta possibilidade não é remota, uma vez que as primeiras chuvas durante a entressafra do café desencadeiam tanto o florescimento do cafeeiro (DAMATTA et al., 2007) como a revoada da broca-do-café no campo (MATHIEU; BRUN; FRÉROT, 1997).

Neste contexto, pode ser inferido que os voláteis das flores de café poderiam ser utilizados por fêmeas colonizadoras de *H. hampei* para a localização de cafeeiros a longas distâncias com potencial de produzirem frutos para alimentação e colonização. Isto se torna muito crítico se for considerado o fato que em condições de subosque – local em que o cafeeiro é encontrado em sua região de origem na África (UKERS, 1922) – as fêmeas da broca-do-café teriam que distinguir os voláteis de seu hospedeiro em meio a complexidade de sinais químicos emitidos por diversas espécies de plantas, visando reduzir a exposição aos inimigos naturais e as adversidades climáticas.

Pelo exposto, neste trabalho objetivou-se a determinação da idade de fêmeas colonizadoras de *H. hampei* e sua resposta aos voláteis de flores de café, *C. arabica*.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 Revisão bibliográfica

#### 2.1.1 Importância de *H. hampei* para a cafeicultura

O café é considerado o produto com maior demanda do mundo depois do petróleo, com um mercado de 70 bilhões de dólares anuais (VEGA, 2008). Estima-se que mais de 20 milhões de famílias produtoras dependam desta cultura no mundo (VEGA; ROSENQUIST; COLLINS, 2003, VEGA et al., 2009, INFANTE; PÉREZ; VEGA, 2012).

O Brasil é reconhecido como o maior produtor e exportador de café verde do mundo (Figura 1) (INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION, 2014). Em 2013 a cafeicultura brasileira gerou divisas que ultrapassaram a casa dos 6 bilhões de dólares (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2014).

Dentre os problemas fitossanitários da cafeicultura, a broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), é o mais importante (VEGA et al., 2009, JARAMILLO et al., 2013). Endêmica da África, esta espécie foi descrita pela primeira vez em amostras de café vindas de Uganda, de onde possivelmente se espalhou para outras regiões do mundo (BERGAMIN, 1943). Contudo, ainda existem controvérsias quanto à região de origem exata de *H. hampei* (LE PELLEY, 1968, BENAVIDES et al., 2005). Atualmente, a broca-do-café se encontra em 66 países produtores de café (CABI, 2014) (Figura 2); causando perdas quantitativas e qualitativas na produção que ultrapassam a casa dos 500 milhões de dólares anuais (INFANTE; PÉREZ; VEGA, 2012, JARAMILLO et al., 2013).

Na América do Sul, o primeiro registro da presença de *H. hampei* foi feito em 1913 em Campinas, SP, Brasil (BERTHET, 1913). Entretanto, o registro oficial da praga no país foi somente documentado em 1924 (CORBETT, 1933, BERGAMIN, 1943). Desde então, *H. hampei* foi se espalhando e hoje está presente em todas as regiões cafeeiras do Brasil (BENASSI, 2007).

*Hypothenemus hampei* ataca o café nos vários estágios de maturação do fruto, consumindo todos os tecidos da semente. Com isso, ocorrem perdas de peso e qualidade dos grãos que depreciam o valor comercial do produto (DAMON et al., 2000). A qualidade da bebida também é prejudicada, uma vez que os danos ocasionados nos frutos servem de entrada para microorganismos que causam o apodrecimento e queda prematura dos frutos (SPONAGEL, 1994). Além disso,

muitos destes microorganismos têm associação direta com a broca-do-café e são responsáveis pela produção de toxinas nos grãos que são nocivas à saúde humana (PÉREZ; INFANTE; VEGA, 2007).

O hábito críptico e ciclo multivoltino da broca-do-café faz com que o seu controle seja dificultado (VEGA et al., 2009). Além disso, existem poucas opções de controle que sejam efetivas pra esta praga. Isto se tornou mais crítico no Brasil com a proibição do uso de endosulfan na agricultura (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2014), pois era um inseticida amplamente usado pelos agricultores no controle de *H. hampei* (DAMON et al., 2000). Por esta razão, a busca por novas estratégias de controle da broca-do-café que não sejam nocivas ao meio ambiente, tais como semioquímicos atraentes e/ou repelentes e microorganismos entomopatogênicos, tem sido estimuladas nos últimos anos (VEGA et al., 2009, INFANTE; PÉREZ; VEGA, 2012).

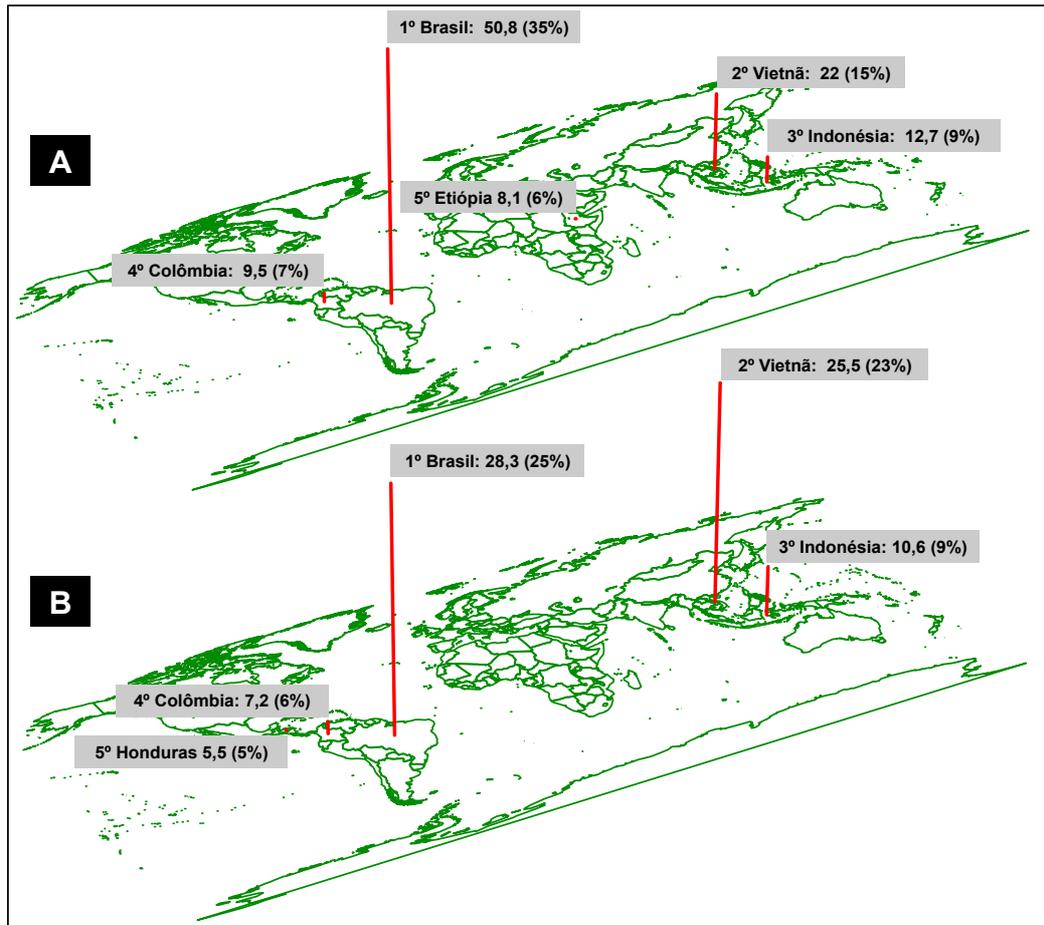


Figura 1 – Mapa mundi da produção e exportação de café. A: Cinco maiores produtores de café na safra 2012/2013; B: Cinco maiores exportadores de café em 2012. Números dentro dos parênteses representam o percentual em relação ao total mundial. Arte gráfica: Weliton D. Silva

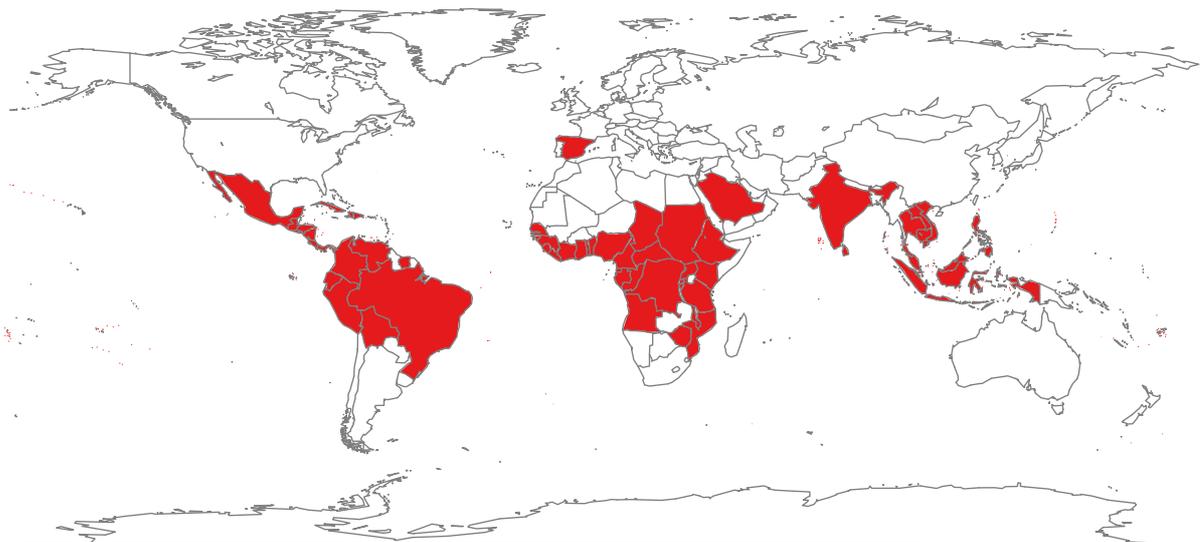


Figura 2 - Mapa da distribuição de *Hypothenemus hampei* no mundo. Os locais em vermelho indicam a presença da praga (CABI, 2014). Arte gráfica: Weliton D. Silva

### 2.1.2 Abandono do fruto nativo por fêmeas de *H. hampei*

Na broca-do-café, as fêmeas adultas que abandonam o fruto nativo na fase de dispersão são chamadas de 'fêmeas colonizadoras' (MATHIEU; BRUN; FRÉROT, 1997, MATHIEU et al., 2001). Estas fêmeas abandonam o hospedeiro estimuladas por fatores climáticos do ambiente, como intensidade luminosa (MATHIEU; BRUN; FRÉROT, 1997), umidade relativa do ar e temperatura (BAKER et al., 1992). Mathieu, Brun e Frérot (1997) demonstraram que as fêmeas colonizadoras da broca-do-café são capazes de distinguir diferenças na intensidade de luz, preferindo neste caso os períodos de maior luminosidade do dia, normalmente o período da tarde, para saírem dos frutos. Estes autores verificaram ainda que estes insetos são indiferentes as variações da pressão atmosférica do ar para abandonar o hospedeiro. Os machos, por outro lado, não abandonam o fruto nativo, pois possuem asas atrofiadas e são, portanto, incapazes de voar (MATHIEU; BRUN; FRÉROT, 1997).

Além das condições climáticas do ambiente, o abandono do fruto nativo de café depende do estado fisiológico da fêmea de *H. hampei*. Mathieu, Brun e Frérot (1997), e Mathieu et al. (2001) verificaram que somente as fêmeas acasaladas que não ovipositaram abandonam o hospedeiro, as quais são também responsivas aos voláteis dos frutos de café. Uma das explicações para isto é que em *H. hampei* ocorre a inversão do fototropismo do inseto após a cópula, onde fêmeas virgens fototrópicas negativas tornam-se fototrópicas positivas (GIORDANENGO, 1992). Outro ponto importante é que o estado da musculatura alar das fêmeas da broca-do-café se degenera após o início da oviposição (TICHELER, 1961; LÓPEZ-GUILLÉN et al., 2011), impedindo, desta forma, que o inseto colonize mais do que um fruto por vez. A degeneração da musculatura alar após a oviposição tem sido observada em outras espécies de escolitíneos, tais como *Trypodendron lineatum* (Oliv.) (CHAPMAN, 1956) e *Ips confusus* (LeConte) (BHAKTHAN; BORDEN; NAIR, 1970). Em relação a questão de possíveis alterações fisiológicas nos insetos que já ovipositaram, que os tornam não responsivos aos voláteis de café, nenhum estudo foi feito a este respeito com *H. hampei* ou com outro escolitíneo.

A revoada dos insetos durante a entressafra do café é estimulada pelas primeiras chuvas, sendo este particularmente um período crítico para fêmeas colonizadoras de *H. hampei*, pois as chances dos insetos encontrarem frutos de café

em condições ideais para serem colonizados são muito limitadas. Nesta situação é hipotetizado que os insetos, uma vez não encontrando um novo hospedeiro, acabam entrando em um fruto remanescente da safra anterior, normalmente seco, que possivelmente já está colonizado por outras populações de *H. hampei* (MATHIEU; BRUN; FRÉROT, 1997). Com isso, as chances de haver o cruzamento entre a fêmea colonizadora recém chegada e um macho residente no fruto são grandes, o que implicaria na troca gênica entre diferentes populações da espécie (MATHIEU; BRUN; FRÉROT, 1997). Por outro lado, frutos verdes de café provenientes das primeiras floradas podem ser usados como importantes fontes de alimento pelas fêmeas colonizadoras, mesmo porque elas não vivem mais do que 11 dias sob condição de estivação (MATHIEU; BRUN; FRÉROT, 1997).

### **2.1.3 Aspectos do comportamento reprodutivo de *H. hampei***

Após encontrar o novo hospedeiro, a fêmea colonizadora de *H. hampei* abre um orifício na região da coroa do fruto a partir da qual começa a construir uma galeria até atingir uma das sementes. Dentro da semente, o inseto alarga a galeria em aspecto piriforme, formando uma câmara para a colocação de seus ovos (BERGAMIN, 1943). Uma fêmea pode colocar perto de 300 ovos ao longo de sua vida (JARAMILLO et al., 2009).

Dentro de um fruto de café infestado podem ser encontrados diferentes estágios de desenvolvimento do inseto (ovo, larva, pré-pupa, pupa e adultos) (BERGAMIN, 1943). Larvas e adultos são os responsáveis pelas perdas de peso e qualidade dos grãos de café, ao consumirem todos os tecidos da semente e abrirem entrada para microrganismos decompositores do fruto (SPONAGEL, 1994, DAMON, 2002).

O ciclo de vida de *H. hampei* (ovo a adulto) é de, aproximadamente, 27,5 dias a 24,5 °C (BERGAMIN, 1943). Os machos adultos podem viver por até 103 dias, e as fêmeas por 157 dias (BERGAMIN, 1943). Além disso, a proporção fêmea:macho em *H. hampei* é de 10:1 (BERGAMIN, 1943, BAKER; BARRERA; RIVAS, 1992), sendo as fêmeas (1,7 mm de comprimento) maiores do que os machos (1,2 mm).

A broca-do-café exhibe as características de espécies que se reproduzem sob competição local por cópula (do inglês 'Local Mate Competition – LMC'). De acordo com Borsa; Kjellberg (1996a), neste sistema os machos são menores no tamanho e

no número de indivíduos e apresentam asas atrofiadas, sendo obrigados a acasalar com as suas irmãs. Em espécies que ocorrem acasalamentos entre irmãos, a haplodiploidia é tida como o modo de determinação sexual, mas no caso da broca-do-café, a pseudoarrenotoquia é a mais aceita (BORSA; KJELLBERG, 1996b). Nesse caso, machos e fêmeas se desenvolvem a partir de ovos fertilizados, sendo que os ovos não fertilizados são inviáveis (BERGAMIN, 1943, GIORDANENGO, 1992). Estudos cariológicos demonstraram que *H. hampei* é diplodiplóide (BERGAMIN; KERR, 1951), embora os filhos não expressem e nem transmitam para a F2 os genes que eles herdaram dos pais (BRUN; BORSA; GAUDICHON, 1995). Isso ocorre porque um conjunto de cromossomos, aparentemente o paternal, fica heterocromatizado e presumivelmente é eliminado após a meiose I (BRUN; BORSA; GAUDICHON, 1995, BORSA; KJELLBERG, 1996b). Estudos desse âmbito se intensificaram a partir da constatação de altos níveis de resistência a endosulfan (BRUN et al., 1989) e de resistência cruzada a outros ciclodienos (BRUN; MARCILLAUD; GAUDICHON, 1994) em populações da broca-do-café na Nova Caledônia.

Por outro lado, Vega et al. (2002) sugerem a ação da proto- $\alpha$ -bactéria *Wolbachia* na determinação sexual de *H. hampei* por meio da incompatibilidade citoplasmática. Segundo estes autores, esta bactéria agiria sobre os cromossomos, removendo seletivamente ou modificando proteínas hospedeiras envolvidas na condensação e descondensação cromossomal antes e depois da formação do zigoto.

Mais recentemente, foi demonstrado que fêmeas da broca-do-café são capazes de realizar múltiplas cópulas, exibindo um comportamento de acasalamento semelhante ao de outros escolitíneos (SILVA et al., 2012).

#### **2.1.4 Ecologia química de *H. hampei***

No campo, as fêmeas colonizadoras de *H. hampei* utilizam os voláteis dos frutos de café para localizar um novo hospedeiro (GIORDANENGO; BRUN; FRÉROT, 1993). Neste caso, a intensidade da resposta olfativa do inseto varia com o estágio de amadurecimento do fruto, sendo preferidos os frutos maduros ao invés dos verdes ou secos (GIORDANENGO; BRUN; FRÉROT, 1993).

Vários trabalhos foram feitos para identificação dos voláteis dos frutos de café, com vista no seu emprego para o manejo de *H. hampei* no campo (MATHIEU et al., 1996, MATHIEU; MALOSSE; FRÉROT, 1998; ORTIZ et al., 2004, MENDESIL et al., 2009; JARAMILLO et al., 2013; ROBLERO; MALO, 2013). A presença de álcoois em tais voláteis tem sido considerada uma das explicações pelas quais armadilhas iscadas com etanol e metanol são efetivas na captura da broca-de-café (ORTIZ et al., 2004). Atualmente, a mistura de etanol e metanol na proporção de 1:1 é amplamente usada em armadilhas para monitoramento e captura de *H. hampei* (DUFOR; FRÉROT, 2008). Contudo, apesar dessas capturas serem relativamente altas, elas ainda representam uma pequena fração da população de *H. hampei*, sendo por isso tais armadilhas consideradas inefetivas na redução populacional da praga, por meio da coleta massal de indivíduos (JARAMILLO et al., 2013).

Recentemente, Mendesil et al. (2009), Jaramillo et al. (2013) e Roblero e Malo (2013) determinaram os compostos dos voláteis de frutos de café que são eletrofisiologicamente ativos a fêmeas colonizadoras de *H. hampei*. Entretanto, os resultados encontrados nestes três trabalhos são conflitantes. Mendesil et al. (2009) verificaram que metilciclohexano, etilbenzeno, nonano, 3-etil-4-metilpentanol, 1-octano-3-ol e (R)-limoneno são eletrofisiologicamente ativos a fêmeas de *H. hampei*, mas que somente os quatro primeiros compostos mencionados são atrativos aos insetos. Em contraste, Jaramillo et al. (2013) determinaram que (5S,7S)-conofitorin e 1,6-dioxaspiro[4,5]-decano, frontalin e  $\alpha$ -pineno são os voláteis eletrofisiologicamente ativos dos frutos de café, sendo que apenas os dois primeiros são atrativos aos insetos. Além disso, neste último trabalho foram testados em GC-EAD os mesmos compostos encontrados por Mendesil et al. (2009), mas os resultados não se corroboraram. Roblero e Malo (2013) determinaram somente a resposta a eletroantegráfica dos voláteis de frutos de café e verificaram que 2-heptanona, 2-heptanol, 3-etil-4-metilpentanol, fenil-etil-álcool, metil salicilato e  $\alpha$ -copaeno elicitaram resposta antenal em fêmeas de *H. hampei*.

Tomados juntos, estes resultados permitem afirmar que ainda existem lacunas acerca da ecologia química da broca-do-café, principalmente no que se refere a busca por novos compostos para serem empregados no manejo integrado desta praga em cafezais.

### 2.1.5 Florescimento, polinização e voláteis de flores de café, *C. arabica*

As flores de café, *Coffea arabica*, são pequenas, brancas e com fragância de jasmim (Figura 3) (UKERS, 1922). Cada flor é arranjada em uma única peça, formando um tubo no qual ovário, corola, estilo-estigma e filete sustentam as anteras (UKERS, 1922). As flores se originam nas axilas das folhas formando glomérulos nos internódios dos ramos do cafeeiro (UKERS, 1922).

Para que ocorra o florescimento, inicialmente o cafeeiro necessita de um período de estresse por seca seguido de chuvas para que haja a quebra da dormência dos botões florais (ALVIM, 1960).

O café que é cultivado em regiões subtropicais e tropicais é caracterizado pela assincronia do desenvolvimento floral, o que acaba prolongando o período de colheita (CRISOSTO; GRANTZ; MEINZER, 1992). Na região centro sul do Brasil, por exemplo, ocorrem de duas a quatro floradas no período de agosto a novembro, onde se observa o amadurecimento desigual dos frutos (DAMATTA et al., 2007). Portanto, em regiões não equatoriais do planeta, frutos maduros, frutos verdes, flores e brotos em diferentes estágios de desenvolvimento podem ser encontrados na mesma planta de café (URKES, 1992, CRISOSTO; GRANTZ; MEINZER, 1992, DAMATTA et al., 2007). Uma das causas disso é a ocorrência de chuvas esporádicas de baixa intensidade em fases tardias do desenvolvimento do botão floral do cafeeiro (DAMATTA et al., 2007). Na maioria das espécies de café o intervalo entre o florescimento e o amadurecimento completo dos frutos varia de oito a 12 meses.

O florescimento de *C. arabica* ocorre nas primeiras horas da manhã e a polinização ocorre deste período até o início da tarde (DAMATTA et al., 2007). As flores de café que se abrem em dias secos de sol originam mais frutos do que àquelas que se abrem em dias chuvosos, pois no primeiro caso as chances de polinização por insetos e pelo vento são maiores (UKERS, 1922).

Devido *C. arabica* ser uma planta autógama tem-se imaginado que a espécie não pudesse receber quaisquer ganhos de insetos polinizadores sobre a produção (FREE, 1993). Contudo, trabalhos realizados na última década têm demonstrado que a quantidade e peso de frutos do cafeeiro é consideravelmente aumentada com a polização cruzada realizada por abelhas (KLEIN; DEWENTER; TSCHARNTKE, 2003; ROUBIK, 2002). Além disso, foi observado que cafezais localizados próximos de matas, que são abrigos desses agentes polinizadores, tiveram incrementos

significativos sobre a produção (VERGARA; BADANO, 2009).

Em relação aos voláteis de flores de café, *C. arabica*, uma pesquisa feita no Japão examinou em detalhes a composição química de óleos extraídos destas estruturas por destilação e solventes (EMURA et al., 1997). Neste trabalho os compostos aromáticos e nitrogenados foram os predominantes nos voláteis das flores. Os monoterpenos, em menor quantidade, eram representados principalmente por linalol, nerol e geraniol, mirceno, limoneno, ocimeno, terpinoleno e óxido linalol.



Figura 3 - Flores de café, *Coffea arabica*, abertas em um ramo de cafeeiro. Foto: Weliton D. Silva

## 2.2 Material e métodos

### 2.2.1 Determinação da idade de fêmeas colonizadoras de *H. hampei*

Os insetos utilizados nos experimentos de determinação da idade de fêmeas colonizadoras de *H. hampei* foram obtidos na criação de manutenção do Laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos, da ESALQ/USP, Piracicaba, SP, Brasil. Neste laboratório os insetos foram criados sobre grãos de café 'pergaminho' (*Coffea arabica* L. var. Catuaí Vermelho).

Devido ao fato das fêmeas adultas da broca-do-café poderem viver mais de 150 dias (BERGAMIN, 1943), neste experimento foram utilizados somente adultos recém-emergidos sob diferentes condições de acasalamento e ou melanização do tegumento, imaginando um cenário que poderia ser encontrado dentro do fruto nativo de café antes da fase de abandono do mesmo.

Foram utilizadas fêmeas virgens melanizadas (FVM), fêmeas acasaladas melanizadas (FAM), fêmeas virgens não melanizadas (FVNM) e fêmeas acasaladas não melanizadas (FANM). Os insetos foram obtidos no estágio de pupa dentro de grãos de café pergaminho. Os grãos foram abertos com o auxílio de um bisturi sob um microscópio estereoscópico binocular e as pupas foram separadas por sexo seguindo a descrição morfológica feita por Bergamin (1943). As pupas foram individualizadas em tubos de vidro (7,5 cm de altura × 1 cm de Ø) esterelizados e selados com filme plástico de PVC. Os tubos foram mantidos em uma sala climatizada a  $23 \pm 2$  °C;  $70 \pm 10\%$  de UR e 24 h de escotofase até a emergência dos adultos.

As fêmeas melanizadas foram obtidas 7,5 dias após a emergência dos adultos, ou seja, quando os insetos adquiriram o tegumento totalmente preto (Figura 4). Para o acasalamento, ambas as fêmeas melanizadas e não melanizadas com 3 dias de idade (Figura 4) foram expostas por 12 h a um macho da mesma idade dentro de poços de uma placa de microtitulação de 96 poços. Com três dias de idade, 100% das fêmeas da broca-do-café estavam sexualmente maduras (SILVA et al., 2012). Os casais foram filmados com uma câmera digital (SONY HDR-SR12, Japan) em laboratório nas mesmas condições de ambiente citadas anteriormente. Os vídeos foram transferidos para um computador e analisados para a confirmação das cópulas utilizando um 'software' SONY para a edição dos vídeos (SILVA et al., 2012).

Um dispositivo experimental foi utilizado para simular as condições dentro de um fruto de café (Figura 5A). Duas placas de petri (1,5 cm de altura × 6 cm de Ø) foram coladas pelas laterais com cola quente e um orifício de 2 mm de diâmetro foi feito para permitir o trânsito dos insetos entre as duas partes do dispositivo. Uma das placas foi coberta com papel alumínio para evitar a passagem de luz, sendo esta parte chamada de 'parte escura do dispositivo'. A placa transparente foi denominada de 'parte clara do dispositivo'.

Dez insetos do mesmo tratamento foram colocados juntos dentro da parte escura do dispositivo, que continha pedaços de endosperma de café como fonte de alimento (Figura 5B). O experimento foi conduzido em uma sala climatizada mantida a  $23 \pm 2$  °C,  $70 \pm 10\%$  de UR e 12 h de fotofase. Foram utilizados quatro dispositivos experimentais por tratamento ( $N = 40$  fêmeas/tratamento). O número de insetos que passaram para a parte clara do dispositivo foi verificado uma vez por hora durante o

período diurno (06h:00min – 18h:00min, horário local) por 20 dias. Após este período nenhum inseto mais foi observado saindo da parte escura do dispositivo.

Para confirmar se os insetos encontrados na parte clara do dispositivo eram potencialmente fêmeas colonizadoras, eles foram inicialmente colocados sobre uma placa de petri aberta dentro de uma gaiola de acrílico (500 × 500 × 500 cm) para observar alguma atividade de vôo. Os insetos que voaram foram individualizados em copos de acrílico (3,5 cm de altura × 2,0 cm de Ø) com um grão de café pergaminho. Os grãos foram abertos após 10 dias da infestação e os ovos foram contabilizados e colocados em poços de uma placa de microtitulação de 96 poços. Os ovos foram incubados durante 10 dias nas mesmas condições climáticas descritas para as pupas, período no qual a eclosão das larvas foi verificada diariamente.

A idade das fêmeas colonizadoras de *H. hampei* foi calculada somando-se os dias gastos pelos besouros para saírem da parte escura para a parte clara do dispositivo com a idade em que as fêmeas foram colocadas na parte escura do dispositivo, ou seja, 3,5 dias (FNMA e FNMV) e 8 dias (FMA e FNMV).



Figura 4 - Fêmeas da broca-do-café, *Hypothenemus hampei*, em diferentes estágios de melanização do tegumento. A: Adulto recém-emergido (< 24 h); B: Adulto com 3 d de idade; C: Adulto com 7,5 d de idade. Foto: Weliton D. Silva

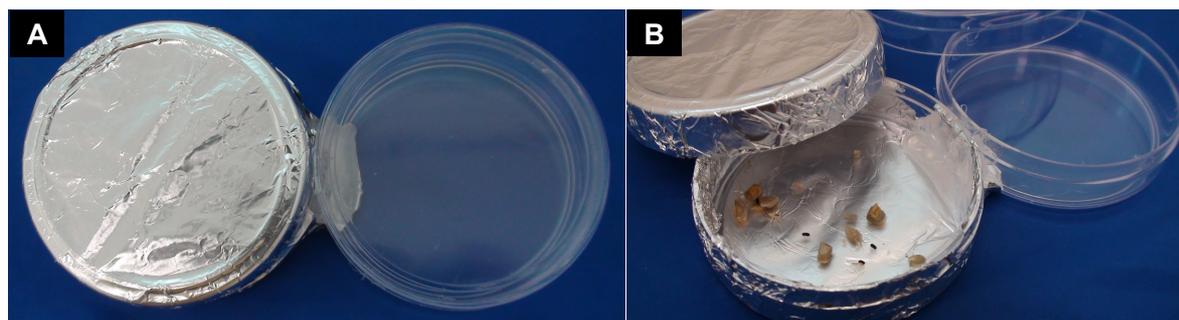


Figura 5 – Dispositivo experimental utilizado para determinar a idade de fêmeas colonizadoras de *Hypothenemus hampei*. A: Dispositivo montado; B: Dispositivo aberto, mostrando os insetos e pedaços de endosperma de café dentro da parte escura do dispositivo. Foto: Weliton D. Silva

### 2.2.2 Resposta de fêmeas colonizadoras de *H. hampei* aos voláteis de flores de café, *C. arabica*

#### Insetos

Fêmeas colonizadoras da broca-do-café entre 15 e 20 dias de idade foram utilizadas nos experimentos. A saída dos insetos de dentro dos grãos de café pergaminho foi estimulada colocando-se os potes de criação sob a luz indireta do sol passando por uma janela no período de maior luminosidade do dia (12h:00min às 16h:00min, horário local). Conforme as fêmeas colonizadoras foram saindo dos grãos e se acumulando sob a tampa dos potes de criação, os recipientes iam sendo abertos dentro de gaiolas de acrílico para a coleta dos insetos em tubos de vidro (7,5 cm de altura × 1 cm de Ø), os quais foram depois selados com filme plástico de PVC.

Os insetos foram mantidos sem alimento durante 24 h antes de serem utilizados nos bioensaios olfatométricos e testes no GC-EAD.

#### Flores de café

Flores recém abertas de café, *Coffea arabica* L. var. Tupi, foram coletadas em cafeeiros de dois anos de idade cultivados em uma casa de vegetação, do Laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos, da ESALQ/USP (Figura 6). Os cafeeiros foram plantados em vasos plásticos de 18 L preenchidos com substrato vegetal Basaplant® a base de casca de pinus, fibra de coco, turfa fibrosa, vermiculita, NPK e micronutrientes.

As flores foram cuidadosamente destacadas dos ramos com auxílio de uma pinça e um bisturi, deixando-se o pedúnculo e cálice preso a flor.



Figura 6 – Cafeeiro, *Coffea arabica*, de dois anos de idade florido cultivado em vaso sob casa de vegetação. Foto: Weliton D. Silva

### Coleta dos voláteis

Os voláteis foram coletados de flores de café em potes de vidro (Ball®; Alltrista Consumer Products Co.) de 267 mL, cujas tampas foram modificadas para acomodar tubos de entrada e saída de ar, conforme Ray et al. (2011). As tampas dos potes possuíam dois orifícios nos quais foram fixados tubos de aço inoxidável de 4 mm de diâmetro interno. As conexões foram feitas com porcas e arruelas de mesmo material e as vedações com anéis de Teflon®. No tubo que marcou a entrada de ar no pote foi acoplado um filtro de carvão ativado, que consistiu de um tubo de vidro (12 cm de comprimento × 10,2 mm de Ø interno) conectado nas extremidades com pedaços de mangueiras de Teflon® de 3 cm de comprimento. Este tubo de vidro e um dos pedaços da mangueira de Teflon® foram preenchidos com carvão ativado com grânulos de 2 mm (14 cm de altura de carvão) presos pelas extremidades da coluna com lã de vidro. O coletor de voláteis consistiu de uma coluna de vidro (7,5 cm de comprimento × 3 mm de Ø interno) contendo 50 mg de polímero adsorvente HayeSep® (80/100 mesh; Supelco, Bellefonte, PA, USA). Uma das extremidades do coletor foi acoplada na saída do sistema e a outra extremidade foi acoplada por conexões de Teflon® a um fluxômetro. O ar purificado passando pelos filtros de

carvão foi puxado do interior do pote através dos coletores por uma bomba de vácuo Millipore® (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) a 300 mL/min. A umidade dentro de cada pote foi mantida com roletes de algodão embebido com água destilada dentro de um frasco de vidro de 5 mL.

As aerações sempre iniciaram menos de 30 min após a coleta das flores, sendo conduzidas por 8 h (09h:00min as 17h:00min) em uma sala climatizada mantida a  $25 \pm 2$  °C,  $70 \pm 10\%$  de UR e 12 h de escotofase. As aerações foram feitas em 20 dias diferentes, com quatro repetições por dia (50 flores/repetição), em agosto e setembro de 2012 e 2013. Em testes preliminares foi verificado que 8 h de aeração foi o tempo mais adequado para as coletas sem haver problemas com 'break through' ou subestimação do número de compostos coletados.

Os voláteis foram eluídos das colunas com 250 µL de diclorometano (SupraSolv®, Merck KGaA; Largo, FL, USA) em insertes de vidro cônicos dentro de 'vials' de 2 mL. Outros 250 µL de diclorometano foram adicionados no 'vial', fora do inserte, para prevenir a evaporação do extrato do inserte. Os extratos dos 'vials' foram armazenados em freezer a -30 °C até a utilização para os experimentos e análises.

### **Análise dos extratos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS)**

Um microlitro dos extratos contendo os voláteis de flores de café foi injetado em modo 'splitless' em um cromatógrafo a gás (Varian 3800) acoplado a um espectrômetro de massas (Varian 4000 Ion Trap) (Agilent Technologies). O cromatógrafo era equipado com uma coluna HP-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm). O hélio foi usado como gás de arraste a um fluxo constante de 1 mL/min. A temperatura do injetor e da linha transferidora foi de 250 °C, e as do 'ion trap' e 'manifold' foram, respectivamente, de 170 °C e 50 °C. A temperatura inicial da coluna do GC foi mantida a 40 °C por 2 min, depois ela foi aumentada para 200 °C a 8 °C/min, permanecendo nesta temperatura por 2 min e, por fim, aumentada para 250 °C a 10 °C/min, permanecendo nesta temperatura por 2 min. A amplitude de massa foi de 30 a 400 m/z e a corrente elétrica no filamento foi de 10 miliampéres.

Os compostos foram tentativamente identificados pela comparação de seus espectros de massas com aqueles computadorizados na biblioteca 'NIST 98' do

'software' do equipamento e/ou pela co-injeção de padrões sintéticos (20 ng/ $\mu$ L). Além disso, foram determinados o índice de Kovats (IK) de cada composto, assim como a quantidade de cada um na amostra comparando-se a área do pico de interesse com a área do pico de um padrão externo, heptadecano (20 ng/ $\mu$ L).

### **Determinação dos compostos eletrofisiologicamente ativos por GC-EAD**

Um microlitro de extrato dos voláteis das flores de café foi injetado em modo 'splitless' em um cromatógrafo a gás (Shimadzu 2010) equipado com o mesmo tipo de coluna do GC-MS. O efluente da coluna foi repartido a uma proporção de 1:3 (v/v), onde uma parte foi direcionada para o detector por ionização de chamas (FID) e, simultaneamente, três partes foram direcionadas para a antena do inseto conectada ao detector eletroantegráfico (EAG) (IDAC-2; Syntech EAG system; Syntech, Hilversum, the Netherlands). O hélio foi utilizado como gás de arraste a um fluxo de 1 mL/min, sendo que as temperaturas do injetor e detector foram mantidas, respectivamente, a 250 °C e 300 °C. A programação de temperatura do forno do GC foi a mesma utilizada nas análises no GC-MS.

A saída para o EAD foi mantida sob um fluxo constante e uniforme de ar purificado e umidificado a 400 mL/min, indo diretamente sobre uma antena preparada de fêmea colonizadora de *H. hampei*.

A preparação da antena foi feita seguindo a metodologia descrita por Zhang, Schlyter e Birgersson (2000). Um eletrodo indiferente de capilar de vidro preenchido com solução salina de Ringer e aterrado com um fio de ouro foi inserido na base da cabeça decaptada de uma fêmea colonizadora de *H. hampei*, da qual uma das antenas foi esticada. Um eletrodo similar de gravação, conectado a um amplificador DC de alta impedância, foi colocado em contato com a porção final da clava da antena esticada. O sinal foi armazenado e analisado em um 'desktop' equipado com o programa EAD versão 2.3 (Synthech, Hilversum, The Netherlands).

A resposta das antenas de *H. hampei* aos compostos sintéticos também foi analisada. Para cada extrato natural ou mistura sintética foram testadas 10 antenas de insetos diferentes. Os compostos que apresentaram um pico no EAD correspondente a um pico no FID, em quatro ou mais corridas, foram considerados eletrofisiologicamente ativos.

## Bioensaios olfatométricos

Nestes bioensaios foi testada a atratividade de flores de café, extrato natural dos voláteis de flores de café, e dos compostos eletrofisiologicamente ativos sintéticos (individualmente ou em mistura) a fêmeas colonizadoras de *H. hampei*. Para isto foi utilizado um olfatômetro de vidro do tipo 'Y' (0,5 cm de Ø interno para cada parte do "Y"; 40° entre os braços; 5 cm de comprimento do tubo principal; 4 cm de comprimento de cada braço). Cada material testado foi colocado em uma câmara de vidro horizontal (20 cm de comprimento × 6 cm de Ø interno). A extremidade de entrada de ar da câmara foi conectada com mangueiras de Teflon<sup>®</sup> a um sistema de coleta de voláteis (Analytical Research Systems-ARS, Gainesville, Florida, EUA) que produziu o fluxo de ar purificado e umidificado regulado por fluxômetros a 120 mL/min no interior da câmara. A outra extremidade da câmara, que marcou a saída de ar do sistema, foi conectada a um dos braços do olfatômetro. Cada braço foi conectado a uma câmara diferente.

Os bioensaios foram realizados das 13h:00min as 16h:00min (horário local) em uma sala climatizada ( $25 \pm 1$  °C e  $70 \pm 10\%$  de UR), onde foi mantida acima do olfatômetro uma iluminação difusa e uniforme de  $23 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ . Uma fêmea colonizadora de *H. hampei* foi introduzida na base do tubo principal do olfatômetro, onde comportamento do inseto foi observado por 5 min. Após este tempo, foi anotado o braço optado pelo inseto. Para isto, uma linha foi tracejada em cada braço do olfatômetro a 3 cm da bifurcação, devendo o inseto tê-la atravessado para que o braço fosse considerado o escolhido. As fêmeas que não optaram por nenhuma das fontes de odor dentro do tempo estipulado foram consideradas inativas. Então, um novo inseto foi utilizado para a repetição. Após cada repetição, a posição dos braços do olfatômetro foi alternada para evitar alguma tendência de lado, sendo que o olfatômetro foi substituído por outro a cada dez repetições. Foram realizadas de 40 a 60 repetições/tratamento.

Após cada bioensaio, todas as vidrarias (olfatômetros e câmaras) foram lavadas seguindo este protocolo: 1 × detergente neutro (Extran<sup>®</sup>); 1 × água destilada; 1 × álcool etílico; 1 × acetona; 7 × água destilada; secagem em estufa (160 °C/3 h).

Nos bioensaios olfatométricos foi testada a resposta das fêmeas colonizadoras de *H. hampei* aos seguintes contrastes:

- a) Flores de café vs branco (ar puro);
- b) Extrato de flores de café vs branco (papel filtro + diclorometano);
- c) Compostos sintéticos (individual ou mistura) eletrofisiologicamente ativos vs branco (papel de filtro + diclorometano);
- d) Contraste entre compostos sintéticos (mistura vs individual);
- e) Compostos sintéticos em mistura vs extrato natural.

Nos contrastes foram utilizadas 10 flores de café para cada bioensaio. No caso dos extratos naturais foram utilizados 20  $\mu\text{L}$  colocados sobre um pedaço de papel de filtro de 9  $\text{cm}^2$ . No caso dos compostos sintéticos foram utilizados 20  $\mu\text{L}$  de solução contendo 50 ng de composto por  $\mu\text{L}$  de diclorometano. O mesmo volume de solvente foi utilizado sobre o papel de filtro nos 'brancos'.

### 2.2.3 Análise estatística

A normalidade dos dados do experimento sobre a idade de fêmeas colonizadoras de *H. hampei* foi avaliada utilizando o teste de Shapiro Wilk (SHAPIRO; WILK, 1968), e a homogeneidade das variâncias foi verificada com o teste de Bartlett (BARTLETT, 1937). Os testes indicaram distribuição normal e homogeneidade das variâncias dos dados ( $P < 0,05$ ). As diferenças estatísticas quanto as idades entre os tratamentos foram verificadas com o teste 't' de Student ( $P < 0,05$ ).

Os dados sobre a escolha dos insetos em cada tratamento nos bioensaios com olfatômetro foram submetidos ao Teste Binomial, considerando a hipótese nula ( $H_0$ ) de que a proporção de escolhas para cada braço do olfatômetro, ao nível de 5% de probabilidade, não foi significativamente diferente da esperada de 1:1; e hipótese alternativa ( $H_1$ ) de que esta proporção foi significativamente diferente.

Todas as análises e testes foram realizados no 'software' R versão 2.15 (THE R FOUNDATION FOR STATISTICAL COMPUTING, 2012).

## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Determinação da idade de fêmeas colonizadoras de *H. hampei*

Somente as fêmeas que estavam acasaladas e melanizadas saíram da parte escura do dispositivo, incluindo FNMA que realizaram esta atividade após a melanização total do tegumento. Neste caso, FMA e FNMA tinham a idade de 14,5 dias e 16 dias, respectivamente (teste 't' de Student:  $t = 1,1078$ ,  $df = 6$ ,  $P = 0,3104$ ) (Tabela 2). Contudo, após o acasalamento, FNMA levaram mais tempo para abandonar a parte escura do dispositivo do que FMA (Tabela 2).

O pico de atividade dos insetos saindo da parte escura do dispositivo ocorreu durante o período de maior luminosidade, ou seja, das 12h:00min às 16h:00min (horário local) (Figura 7).

Tabela 2 - Tempo (dias, média  $\pm$  erro padrão) gasto por fêmeas de *Hypothenemus hampei* para sair da parte escura do dispositivo experimental após a emergência do adulto e após o acasalamento; e número de ovos (média  $\pm$  EP) produzidos por fêmea. FNMA = fêmeas não melanizadas acasaladas; FMA = fêmeas melanizadas acasaladas

Tratamento	Tempo (dias) após a emergência do adulto até o abandono <sup>a</sup>	Tempo (dias) após o acasalamento até o abandono	nº ovos/fêmea
FNMA	14,5 $\pm$ 8,9	11,5 $\pm$ 7,0	5,0 $\pm$ 0,7
FMA	16,0 $\pm$ 5,3	8,0 $\pm$ 2,8	4,8 $\pm$ 0,8
Resultado do teste 't' de Student (coluna)	$t=1,1078$ ; $gl=6$ ; $p=0,3104$	$t=-2,4520$ ; $gl=6$ ; $p=0,0485$ (*)	$t=0,2255$ ; $gl=6$ ; $p=0,8291$

<sup>a</sup> = Idade das fêmeas colonizadoras de *Hypothenemus hampei* ao abandonar o hospedeiro

(\*) = Significativo estatisticamente (teste 't' de Student,  $P < 0,05$ )

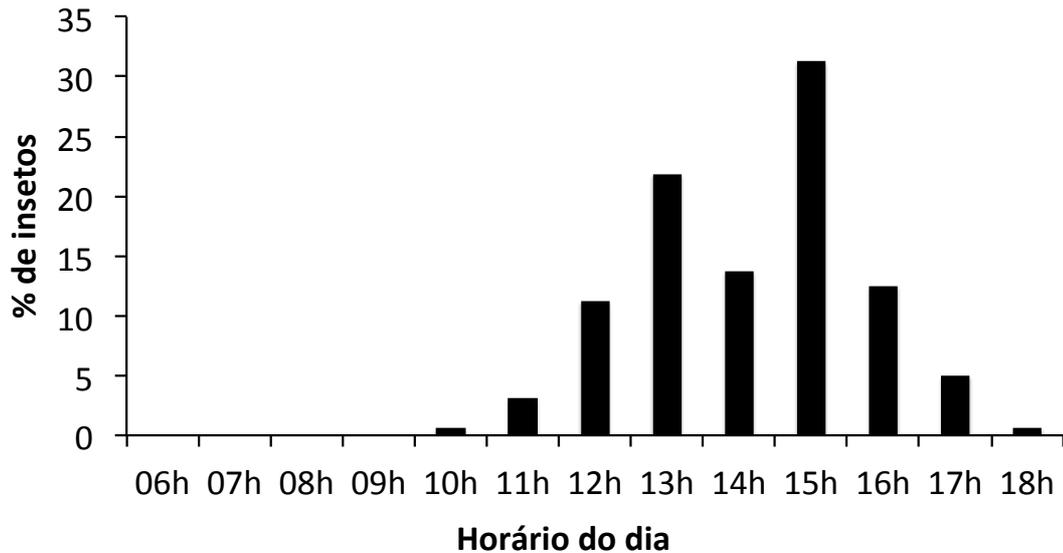


Figura 7 – Porcentagem de saída de fêmeas colonizadora de *Hypothenemus hampei* de dentro da parte escura do dispositivo

### 2.3.2 Resposta de fêmeas colonizadoras de *H. hampei* aos voláteis de flores de café, *C. arabica*

Fêmeas colonizadoras de *H. hampei* foram atraídas pelos voláteis de flores de café, *C. arabica* (Figura 12). A mesma resposta foi observada quando foi utilizado o extrato natural contendo os voláteis das flores (Figura 12).

Nos extratos das flores de café foram encontrados 50 compostos voláteis (Figura 8), sendo que 17 deles tiveram a identidade confirmada pela co-injeção com padrões sintéticos (Tabela 3). Considerando-se que para neral e geranial não existem isômeros puros comerciais, citral (mistura 1:1 de neral e geranial, Sigma-Aldrich) foi utilizado para as identificações e testes. Os voláteis de flores de café consistiram principalmente de monoterpenos, os quais representaram 42% dos compostos encontrados no extrato natural (Figura 9). Além disso, os monoterpenos apresentaram maior área (48%) em relação a soma das áreas de todos os compostos do extrato natural, seguidos pelos sesquiterpenos (19%) e compostos aromáticos (15%) (Figura 9).

Sete compostos do extrato natural de voláteis de flores de café elicitaram resposta eletroantegráfica em fêmeas colonizadoras de *H. hampei* (Figura 10). Entretanto, alguns compostos eletrofisiologicamente ativos, ou seja, os compostos monoterpênicos 31 e 34, assim como os sesquiterpênicos 40 e 41 não puderam ser identificados devido as quantidades insuficientes para análise em GC-MS, ou devido

a co-eluição com outros compostos. Portanto, os compostos que não puderam ser identificados foram referidos pelos números constantes na Tabela 3. As maiores respostas antenais de *H. hampei* foram observadas para os compostos 31, 34 e 41; e as menores respostas para os compostos metil salicilato, neral, geranial e composto 40 (Figura 10).

Dos 14 compostos sintéticos comerciais (benzaldeído, mirceno, felandreno, terpineno, R-limoneneo, S-limoneno, linalol, ocimeno, metil benzoato, metil salicilato, Z-citral, E-citral, indola e farneseno) que foram testados em GC-EAD, dois elicitarão resposta eletroantegráfica em fêmeas colonizadoras da broca-do-café (Figura 11). Os compostos metil salicilato e geranial elicitarão resposta antenal tanto na forma de extrato natural quanto na forma sintética. O composto neral não elicitoi nenhuma resposta antenal detectável na forma sintética, mas elicitoi resposta na forma de extrato natural.

Nos bioensaios olfatométricos envolvendo as formas sintéticas dos compostos eletrofisiologicamente ativos identificados, foi observado que as fêmeas colonizadoras de *H. hampei* foram atraídas pelo metil salicilato e pela mistura citral + metil salicilato (50 ng/μL) quando contrastados pelo branco (papel de filtro + diclorometano) (Figura 12). Além disso, os insetos foram significativamente atraídos pelo metil salicilato quando contrastado com citral, e pela mistura metil salicilato + citral em contraste com metil salicilato (Figura 12). Por outro lado, o extrato natural de flores foi mais atrativo aos insetos em contraste a mistura metil salicilato + citral sintéticos (Figura 12).

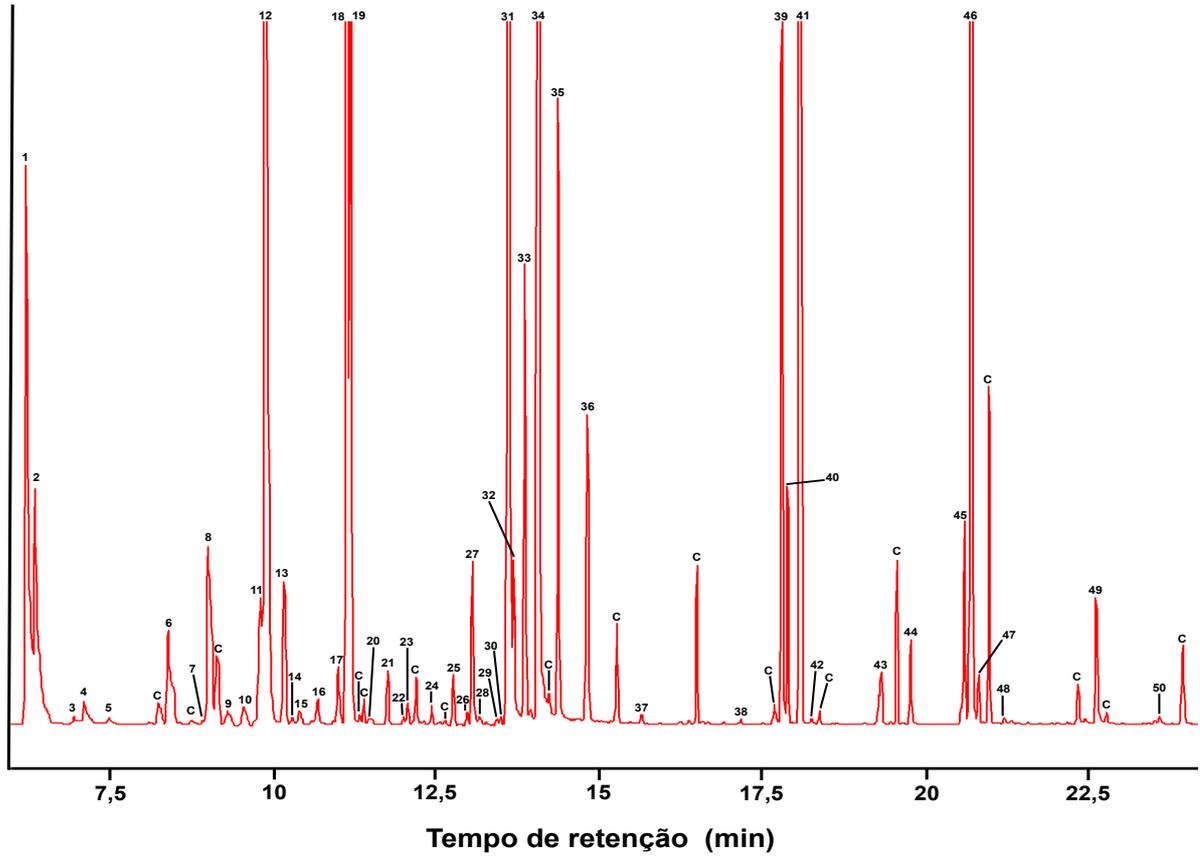


Figura 8 - Cromatograma dos compostos encontrados nos extratos de voláteis de flores de café, *Coffea arabica*. Os números em cada pico são os mesmo encontrados na Tabela 3. C= contaminante

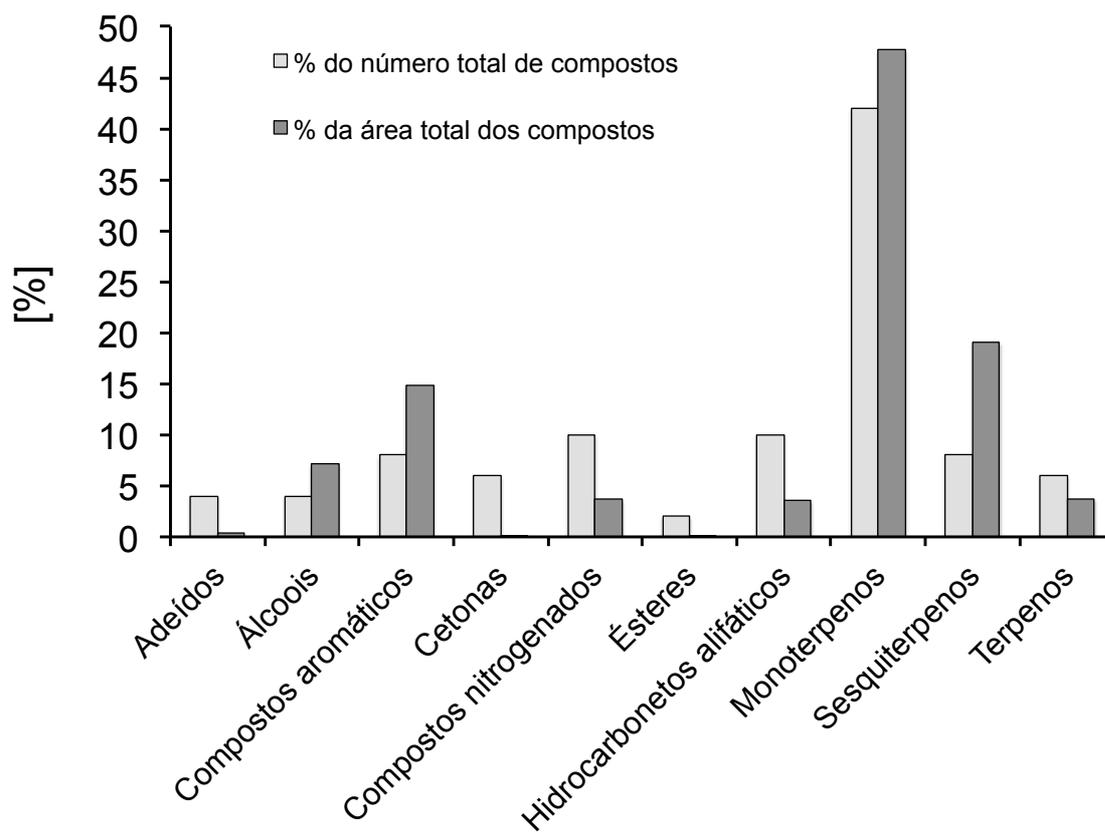


Figura 9 – Principais grupos químicos encontrados nos extratos naturais de voláteis de flores de café, *Coffea arabica*

Tabela 3 – Lista dos compostos encontrados nos extratos de voláteis de flores de café, *Coffea arabica*

nº	nome	TR (min)	IK	[%] <sup>b</sup>	ng/200 mg de flor
1	2-Metilbutil aldoxima, syn	6,23	861	1,34	104,09
2	2-Metilbutil aldoxima, anti	6,34	866	1,01	78,22
3	2-Heptanona	6,96	895	0,02	1,79
4	Metoxifenil aldoxima	7,12	901	0,12	9,15
5	1-(1-Etil-2,3-dimetil-ciclopenta-2-enil)-etanona	7,50	922	0,02	1,23
6	Benzaldeído <sup>a; *</sup>	8,41	967	0,41	31,84
7	Sulcatona <sup>a</sup>	8,95	991	0,01	0,71
8	Mirceno <sup>a; *</sup>	9,02	994	0,45	35,23
9	$\alpha$ -Felandreno <sup>*</sup>	9,31	1008	0,06	4,32
10	$\alpha$ -Terpineno <sup>*</sup>	9,57	1022	0,07	5,06
11	Limoneno <sup>a; *</sup>	9,82	1035	0,38	29,51
12	Álcool benzil <sup>a</sup>	9,89	1038	11,30	878,51
13	trans-beta-Ocimeno <sup>*</sup>	10,18	1053	0,35	26,99
14	Bergamal	10,30	1059	0,02	1,31
15	Y-Terpineno <sup>*</sup>	10,42	1064	0,03	2,24
16	Óxido-linalol	10,70	1078	0,10	7,83
17	Terpinoleno <sup>a</sup>	11,01	1092	0,16	12,16
18	Metil benzoato <sup>a; *</sup>	11,14	1098	2,71	210,88
19	Linalol <sup>a; *</sup>	11,20	1101	3,64	282,65
20	2,4-Tujadieno	11,49	1118	0,02	1,66
21	Alloocimeno <sup>*</sup>	11,78	1133	0,13	9,74
22	neo-Alloocimeno <sup>*</sup>	12,02	1146	0,02	1,23
23	exo-Isocitral	12,08	1150	0,04	3,46
24	trans-Óxido limoneno	12,44	1169	0,04	2,74
25	Isocitral	12,78	1186	0,10	7,40
26	$\alpha$ -Terpineol <sup>a; *</sup>	12,98	1196	0,03	2,21
27	Metil salicilato <sup>a; *, †</sup>	13,07	1200	0,38	29,31
28	trans-Carveol	13,17	1206	0,01	1,10
29	7-Metil-3-metileno-6-octan-1-ol	13,45	1222	0,01	0,95
30	cis-Carveol	13,51	1226	0,02	1,21
31	Monoterpeno não identificado <sup>†</sup>	13,63	1233	20,45	1589,98
32	Isogeraniol	13,70	1237	0,17	13,46
33	Neral (Z-Citral) <sup>*, †</sup>	13,88	1247	0,88	68,41
34	Monoterpeno não identificado <sup>†</sup>	14,08	1258	23,20	1803,72
35	Geraniol (E-Citral) <sup>a; *, †</sup>	14,38	1275	1,10	85,83
36	1H-Indola <sup>a; *</sup>	14,83	1299	1,16	90,33
37	Metil antranilato <sup>a</sup>	15,66	1350	0,02	1,68
38	Ácido silícico, dietil bis (trimetilsilil) ester	17,19	1444	0,01	0,62
39	Hidrocarboneto não identificado <sup>†</sup>	17,81	1483	2,01	156,60
40	Sesquiterpeno não identificado	17,90	1488	0,42	32,71
41	Sesquiterpeno não identificado <sup>†</sup>	18,09	1500	18,20	1414,96
42	$\alpha$ -Farneseno <sup>*</sup>	18,25	1511	0,02	1,66
43	Sesquiterpeno não identificado	19,31	1582	0,38	29,84
44	E-2-Tetradeceno-1-ol	19,79	1615	0,36	28,03
45	Tetradecino	20,60	1673	0,66	51,16
46	9-Heptadecanol	20,72	1681	6,80	528,45
47	Heptadeceno	20,82	1688	0,14	10,59
48	Hexadecino	21,22	1717	0,05	4,19
49	Pentadecanal	22,62	1817	0,32	24,50
50	Octadeceno	23,60	1878	0,68	53,16

<sup>a</sup> Previamente identificado em Emura et al. (1997)

<sup>b</sup> % em relação a área total dos compostos do extrato

\* Identificado pela co-injeção de padrão sintético

<sup>†</sup> Eletrofisiologicamente ativo a fêmeas colonizadoras de *Hypothenemus hampei*

TR = Tempo de retenção

IK = Índice de Kovats

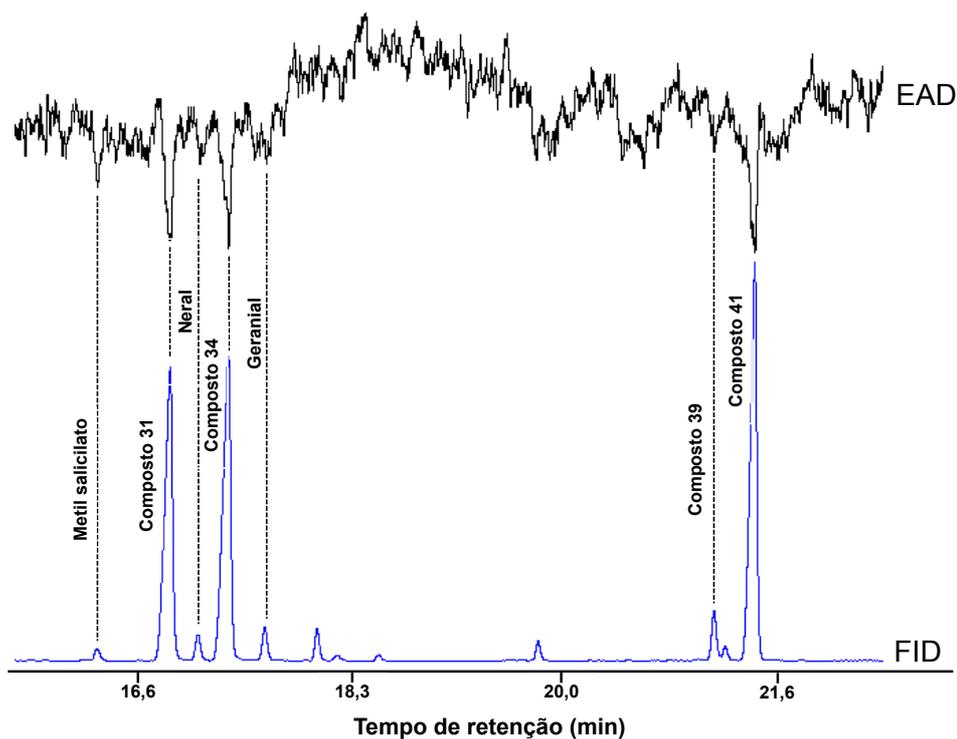


Figura 10 - Resposta eletroantenográfica de fêmeas colonizadoras de *Hypothenemus hampei* aos extrato natural de voláteis de flores de café, *Coffea arabica*. Os números dos compostos são os mesmos constantes na Figura 7 e Tabela 3. Linhas pontilhadas indicam correspondência entre a resposta da antena (EAD) e do composto (FID)

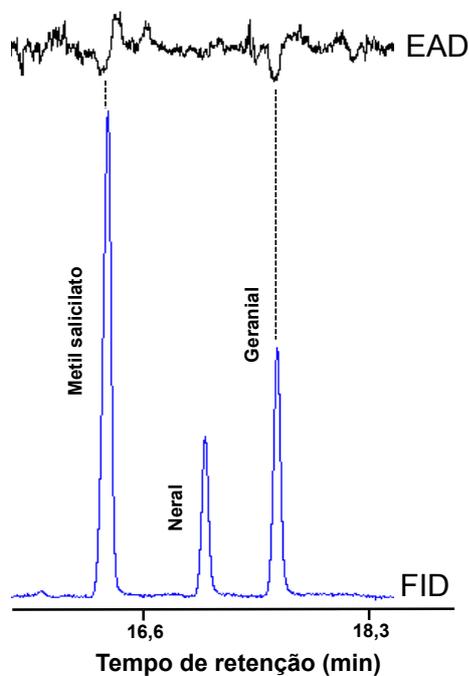


Figura 11 - Resposta eletroantenográfica de fêmeas colonizadoras de *Hypothenemus hampei* a padrões sintéticos de alguns compostos identificados nos extratos naturais de voláteis de flores de café, *Coffea arabica*. Linhas pontilhadas indicam correspondência entre a resposta da antena (EAD) e do composto (FID)

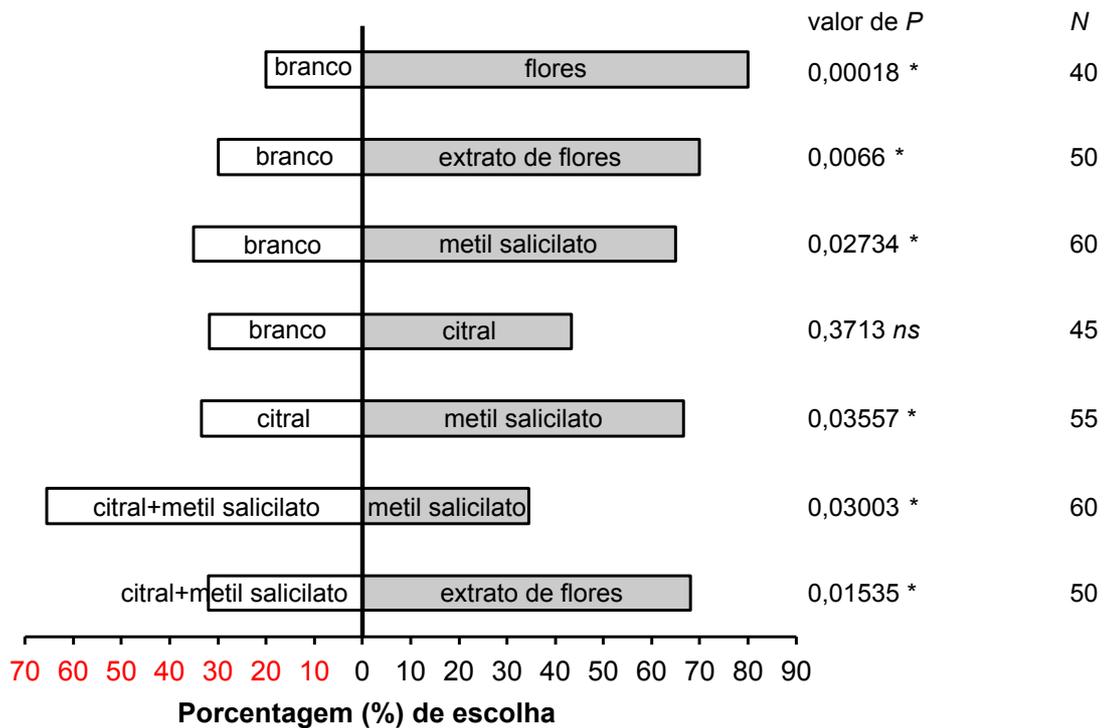


Figura 12 – Resposta olfativa de fêmeas colonizadoras de *Hypothenemus hampei* a diferentes fontes de odor em teste com olfatosmetro do tipo 'Y'. N= 40-60 repetições por contraste

## 2.4 Discussão

### 2.4.1 Determinação da idade de fêmeas colonizadoras de *H. hampei*

Neste trabalho foram obtidos resultados conclusivos mostrando que fêmeas da broca-do-café tornam-se colonizadoras 15 dias após a emergência do adulto. Esta observação é suportada por Giordanengo (1992) e Mathieu et al. (2001), que estimaram a idade de 12 dias e 16 dias, respectivamente, para que fêmeas de *H. hampei* abandonem o fruto nativo de café.

Adicionalmente ao fato de que fêmeas colonizadoras da broca-do-café serem acasaladas, fototrópicas positivas e terem a cutícula totalmente escurecida, foi também demonstrado experimentalmente que 100% destas fêmeas produzem ovos viáveis, o que está de acordo com as observações de Giordanengo (1992) e Mathieu, Brun e Frérot (1997). Isto é muito crítico na natureza, uma vez que em *H. hampei* somente as fêmeas abandonam o hospedeiro nativo para a colonização de um novo fruto de café no campo. Os machos, em menor número, não fazem isto, pois são incapazes de voar devido as suas asas serem atrofiadas (MATHIEU;

BRUN; FRÉROT, 1997). Além disso, os ovos não fertilizados não geram progênie na espécie (BERGAMIN, 1943). Por isso, as fêmeas da broca-do-café devem ser copuladas por seus irmãos para abandonarem o hospedeiro e garantir o sucesso na colonização de um novo fruto de café.

Por outro lado, as fêmeas acasaladas de *H. hampei* não abandonam o fruto nativo até adquirirem uma cutícula totalmente escurecida. De fato, foi observado no presente trabalho um intervalo de oito dias (FMA) a 11,5 dias (FNMA) entre o acasalamento e a fase de abandono para que os insetos saíssem da parte escura do dispositivo (Tabela 2). As fêmeas da broca-do-café podem usar este período para completar a melanização do tegumento, assim como para o desenvolvimento dos músculos alares e dos oócitos, sendo este período conhecido em outros escolitíneos como 'fase de pré-abandono' (MCNEE et al., 2000). López-Guillén et al. (2011) concluíram que fêmeas de *H. hampei* com três a cinco dias não possuem os músculos alares desenvolvidos e por isso são incapazes de saírem do fruto nativo de café.

Com base nos resultados obtidos aqui pode-se inferir que a alimentação das fêmeas sobre o endosperma de café pode ser um fator crítico para o abandono do hospedeiro. Devido ao fato de *H. hampei* ser uma espécie sinovigênica (GIORDANENGO, 1992) as fêmeas precisam se alimentar das reservas da semente de café para sustentar a produção de ovos. Além disso, a exemplo de outros escolitíneos (MCNEE et al., 2000), a alimentação sobre o tecido vegetal pode ser necessária para a esclerotização e desenvolvimento dos músculos alares na broca-do-café. De fato, as fêmeas de todos os tratamentos se alimentaram dos pedaços de endosperma de café colocados na parte escura do dispositivo. Entretanto, os insetos não consumiram todo o alimento e por isso foi eliminada a possibilidade de que o comportamento de abandono em FMA e FNMA tenha sido desencadeado pelo exaurimento da fonte de alimento. A este respeito, Mathieu; Brun; Frérot (1997) observaram que fêmeas adultas da broca-do-café podem viver por até 11 dias sem alimento, mas o esgotamento das reservas da semente de café pode estimular o abandono do hospedeiro pelos insetos, especialmente durante a entressafra de café. No entanto, os efeitos da condição alimentar de fêmeas de *H. hampei* sobre o abandono do hospedeiro ainda precisa ser estudada no futuro.

O presente trabalho traz a primeira determinação experimental da idade de fêmeas colonizadoras de *H. hampei*. Os resultados obtidos aqui poderão ajudar no planejamento de experimentos com estes insetos, especialmente naqueles onde o estado fisiológico do inseto (virgem ou acasalado, melanizado ou não melanizado), que é expresso a partir e ou até uma idade específica, pode determinar a resposta dos indivíduos aos tratamentos.

#### **2.4.2 Resposta de fêmeas colonizadoras de *H. hampei* aos voláteis de flores de café, *C. arabica***

O presente trabalho demonstra a primeira evidencia experimental de que fêmeas colonizadoras de *H. hampei* respondem aos voláteis de flores de café, *C. arabica*. Embora alguns trabalhos (MENDESIL et al., 2009; JARAMILLO et al., 2013; ROBLERO; MALO, 2013) já tenham demonstrado a atratividade de fêmeas colonizadoras de *H. hampei* aos voláteis de frutos de café, a habilidade destes insetos para detectar e responder aos voláteis de flores nunca foram referidos na literatura. As respostas antenais da broca-do-café a estes voláteis destaca a diversidade de compostos produzidos pelo cafeeiro e a interação complexa de sinais olfativos utilizados por fêmeas colonizadoras de *H. hampei* para localizar seu hospedeiro na natureza.

Além disso, o presente trabalho é o primeiro a abordar a análise química dos voláteis de flores de café, *C. arabica*, coletados por aeração. Uma pesquisa prévia feita no Japão examinou em detalhes a composição química dos voláteis de flores de *C. arabica* a partir de óleos extraídos destas estruturas com solventes e destilação (EMURA et al., 1997). No referido trabalho foram identificados 47 compostos, dos quais 13 foram também identificados no presente estudo (Tabela 3). Todavia, as diferenças quantitativas e qualitativas dos resultados entre os dois trabalhos possivelmente é devida as diferenças metodológicas e variedades de café utilizadas.

Fêmeas colonizadoras de *H. hampei* responderam consistentemente a sete compostos presentes nos extratos de voláteis de flores de café. Dos compostos eletrofisiologicamente ativos identificados, metil salicilato e geranial foram os únicos que elicitaram resposta antenal tanto na forma de extrato natural como na forma

sintética. Interessantemente, neral, apesar de ser eletrofisiologicamente ativo no extrato natural de flores, não elicitou resposta eletroantegráfica nos insetos na forma sintética (Figura 11), possivelmente devido a algum efeito de dose. Metil salicilato, neral, geranial e o composto 40 elicitaram respostas antenais menores do que as dos compostos 31, 34 e 41 no extrato natural de flores (Figura 10). Infelizmente, os compostos expressos por números no presente trabalho não puderam ser identificados até a presente data, devido a limitações das análises em GC-MS e a indisponibilidade de padrões sintéticos comerciais. Contudo, são de extrema importância a determinação deles e a realização de testes em GC-EAD e olfatômetro com os padrões sintéticos em trabalhos futuros.

Dos compostos eletrofisiologicamente ativos mencionados acima, somente metil salicilato foi identificado por outros trabalhos em voláteis de frutos verdes de café (MATHIEU; MALOSSE; FRÉROT, 1998; JARAMILLO et al., 2013), frutos secos de café (ROBLERO; MALO, 2013) e grãos verdes de café (SPADONE; TAKEOKA; LIARDON, 1990). Entretanto, somente Roblero; Malo (2013) referiram metil salicilato como sendo eletrofisiologicamente ativo a *H. hampei*, o que corrobora com o presente trabalho. Este composto também é conhecido como um dos voláteis da planta de chá, *Camellia sinensis* L., que é atrativo ao escolitíneo *Xyleborus fornicatus* Eichh. (KARUNARATNE et al., 2008). Em contraste, alguns estudos têm demonstrado que metil salicilato é um dos compostos que alguns besouros da casca (Scolytinae) utilizam para identificar plantas não hospedeiras e assim evitá-las (HUBER et al., 2000; BYERS; ZHANG; BIRGERSSON, 2004; SHEPHERD et al., 2008; SHEPHERD; SULLIVAN, 2013). Em relação a neral e geranial, estes compostos não foram identificados anteriormente em frutos de café. Somente geranial foi encontrado em flores de café por Emura et al. (1997). Além disso, neral e geranial não foram relacionados a qualquer atividade eletroantegráfica ou de atração em outros escolitíneos. Por outro lado, estes compostos são comprovadamente atrativos a algumas espécies de Cerambycidae, como *Megacyllene caryae* (Gahan) (LACEY et al., 2008).

Em relação aos frutos de café, *C. arabica*, Mendesil et al. (2009) verificaram nos voláteis destas estruturas que metilciclohexano, etilbenzeno, nonano, 3-etil-4-metilpentanol, 1-octano-3-ol e (R)-limoneno são eletrofisiologicamente ativos a fêmeas de *H. hampei*, mas que somente os quatro primeiros compostos mencionados são atrativos aos insetos. Em contraste, Jaramillo et al. (2013)

determinaram que (5S,7S)-conofitorin e 1,6-dioxaspiro[4,5]-decano, frontalin e  $\alpha$ -pineno são os voláteis eletrofisiologicamente ativos dos frutos de café, sendo que apenas os dois primeiros são atrativos aos insetos. Por fim, Roblero; Malo (2013) verificaram nos voláteis destas estruturas que 2-heptanona, 2-heptanol, 3-etil-4-metilpentanol, fenil-etil-álcool, metil salicilato e  $\alpha$ -copaeno são eletrofisiologicamente ativos a fêmeas de *H. hampei*.

Sob o ponto de vista ecológico, qual seria a vantagem para fêmeas de *H. hampei* serem atraídas por voláteis de flores de café, uma vez que somente os frutos são considerados seus hospedeiros?

Considerando que as primeiras chuvas na entressafra do café estimulam a florada em *C. arabica* (DAMATTA et al., 2007), assim como a revoada das primeiras fêmeas colonizadoras de *H. hampei* no campo (MATHIEU; BRUN; FRÉROT, 1997), pode-se inferir que evolutivamente a broca-do-café estabeleceu uma relação estrita com o seu hospedeiro utilizando os voláteis de flores de café para a localização de uma planta com potencial de produzir frutos que serão utilizados para alimentação e reprodução visando garantir, assim, a perpetuação da espécie.

Além disso deve-se considerar o fato de que *C. arabica* é uma espécie de subosque em sua região de origem (UKERS, 1922) e neste cenário *H. hampei* teria que utilizar estratégias para localizar seu hospedeiro em meio a complexidade de sinais químicos emitidos por diversas espécies de plantas. Isto se torna mais crítico se for considerado o fato de que a exposição das fêmeas colonizadoras de *H. hampei* a inimigos naturais e adversidades climáticas é prejudicial com o aumento do tempo gasto para localizar uma planta hospedeira.

*C. arabica* é uma espécie que pode exibir de duas a quatro floradas, que perduram por vários meses (DAMATTA et al., 2007). Imaginando um cenário em que as floradas são mais concentradas, uma fêmea colonizadora de *H. hampei* chegando num cafeeiro florido poderia encontrar frutos secos remanescentes da safra anterior (MATHIEU; BRUN; FRÉROT, 1997), até o aparecimento dos primeiros frutos verdes. Por outro lado, considerando um cenário em que exista assincronia no florescimento, com presença de flores e frutos em diferentes estágios de desenvolvimento na mesma planta (Figura 12), a broca-do-café poderia usufruir de frutos verdes, provenientes das primeiras floradas, para a sua alimentação, além dos frutos secos remanescentes. Embora frutos verdes sejam inadequados para a oviposição, eles são uma importante fonte de alimento aos insetos durante a

entressafra, mesmo porque as fêmeas de *H. hampei* não vivem mais do que 11 dias sob estivação (MATHIEU, BRUN; FRÉROT, 1997).

Por fim, deve se considerar a possibilidade destes besouros utilizarem o pólen das flores do cafeeiro como fonte provisória de alimento até a ocorrência de frutos adequados para serem colonizados. Em *Anthonomus grandis* (Boheman) (Curculionidae), por exemplo, sabe-se que o pólen de diversas espécies de plantas malváceas são uma importante fonte alimento para os adultos durante a entressafra do algodão (RIBEIRO et al., 2010). Contudo, para *H. hampei* novas pesquisas ainda precisam ser conduzidas para confirmar esta hipótese.

Do ponto de vista de manejo da broca-da-café, os compostos voláteis presentes nas flores do cafeeiro, identificados neste trabalho, poderão ser testados na forma sintética, em combinação ou não com voláteis de frutos de café, em armadilhas para o monitoramento e coleta massal desta praga no campo.



Figura 12 – Ramo de cafeeiro, *Coffea arabica*, contendo botões florais, flores e frutos verdes. Foto: Weliton D. Silva

### 3 CONCLUSÕES

- Fêmeas colonizadoras da broca-do-café, *H. hampei*, abandonam seu hospedeiro nativo com 15 dias de idade;

- Com 15 dias de idade, fêmeas colonizadoras de *H. hampei* possuem o tegumento totalmente melanizado, estão acasaladas, são capazes de voar e de produzir ovos viáveis;

- Fêmeas colonizadoras de *H. hampei* são atraídas por voláteis de flores de café, *C. arabica*;

- Metil salicilato, neral e geranial presentes nos voláteis de flores de *C. arabica* são eletrofisiologicamente ativos e atrativos para fêmeas colonizadoras de *H. hampei*.



## REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home> >. Acesso em: 05 jan. 2014.
- ALVIM, P.T. Moisture stress as a requirement for flowering of coffee. **Science**, Washington, v. 132, p. 354, 1960.
- BAKER, P.S.; LEY, C.; BALBUENA, R.; BARRERA, J.F. Factors affecting the emergence of *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) from coffee berries. **Bulletin of Entomological Research**, Cambridge, v. 82, p. 145-150, 1992.
- BARTLETT, M.S. Properties of sufficiency and statistical tests. **Proceedings of the Royal Society A-Mathematical Physical and Engineering Sciences**, London, v. 160, p. 268-282, 1937.
- BENASSI, V.L.R.M. Parasitóides da broca-do-café no Brasil: histórico e perspectivas. In: WORKSHOP INTERNACIONAL SOBRE MANEJO DA BROCA-DO-CAFÉ, 2007, Londrina. **Proceedings...** Londrina: IAPAR, 2007. p. 11-36.
- BENAVIDES, P.; VEGA, F.E.; ROMERO-SEVERSON, J.; BUSTILLO, A.E.; STUART, J.J. Biodiversity and biogeography of an important inbred pest of coffee, the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari). **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 98, p. 359-366, 2005.
- BERGAMIN, J. Contribuição para o conhecimento da biologia da broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Ipidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 14, p. 31-72, 1943.
- BERGAMIN J.; KERR W.E. Determinação do sexo e citologia da broca do café. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 3, p. 117-121, 1951.
- BERTHET, J.A. Caruncho do café. **Boletim de Agricultura**, São Paulo, v. 14, n. 5, p. 312-313, 1913.
- BHAKTHAN, N.M.G.H.; BORDEN, J.; NAIR, K.K. Fine structure of degenerating and regenerating flight muscles in a bark beetle, *Ips confusus*. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 6, p. 807-819, 1970.
- BORSA, P.; KJELLBERG, F. Experimental evidence for pseudo-arrhenotoky in *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). **Heredity**, London, v. 76, n. 2, p. 130-135, 1996a.
- \_\_\_\_\_. Secondary sex ratio adjustment in a pseudo-arrhenotokous insect, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris, Sciences de la Vie/Life Sciences**, Paris, v. 319, p. 1159-1166, 1996b.

BRUN, L.O.; BORSA, P.; GAUDICHON, V. 'Functional haplodiploidy'. **Nature**, London, v. 374, n. 6522, p. 506-506, 1995.

BRUN, L.O.; MARCILLAUD, C.; GAUDICHON, V. Cross resistance between insecticides in coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) from New Caledonia. **Bulletin of Entomological Research**, Cambridge, v. 84, n. 2, p. 175-178, 1994.

BRUN, L.O.; MARCILLAUD, C.; GAUDICHON, V.; SUCKLING, D.M. Endosulfan resistance in *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) in New Caledonia. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 82, n. 5, p. 1311-1316, 1989.

BYERS, J.A.; ZHANG, Q.H.; BIRGERSSON, G. Avoidance of nonhost plants by a bark beetle, *Pityogenes bidentatus*, in a forest of odors. **Naturwissenschaften**, New York, v. 91, p. 215-219, 2004.

CABI. **Invasive species compendium**. Disponível em: <<http://www.cabi.org/isc/?compid=5&dsid=51521&loadmodule=datasheet&page=481&site=144>>. Acesso em: 05 jan. 2014.

CHAPMAN, J.A. Flight muscle changes during adult life in a scolytid beetle. **Nature**, London, v. 177, p. 1183, 1956.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Conjuntura semanal**. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13\\_03\\_18\\_08\\_35\\_02\\_cafe04a08032013.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_03_18_08_35_02_cafe04a08032013.pdf)>. Acesso em: 05 jan. 2014.

CORBETT, G.H. Some preliminary observations on the coffee berry beetle borer *Stephanoderes (Cryphalus) hampei* Ferrari. **Malayan Agricultural Journal**, Kuala Lumpur, v. 21, p. 8-22, 1933.

CRISOSTO, C.H.; GRANTZ, D.A.; MEINZER, E.C. Effects of water deficit on flower opening in coffee (*Coffea arabica* L.). **Tree Physiology**, Oxford, v. 10, p. 127-139, 1992.

DAMATTA, F.M.; RONCHI, C.P.; MAESTRI, M.; BARROS, R.S. Ecophysiology of coffee growth and production. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campos dos Goytacazes, v. 19, n. 4, p. 485-510, 2007.

DAMON, A. A review of the biology and control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). **Bulletin of Entomological Research**; Farnham Royal, v. 90, n. 6, p. 453-465, 2000.

DUFOUR, B.P.; FRÉROT, B. Optimization of coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* Ferrari (Col., Scolytidae), mass trapping with an attractant mixture. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 132, n. 7, p. 591-600, 2008.

EMURA, M.; NOHARA, I.; TOYODA, T.; KANISAWA, T. The volatile constituents of the coffee flower (*Coffea arabica* L.). **Flavour and Fragrance Journal**, Hoboken, v. 12, n. 1, p. 9-14, 1997.

GIORDANENGO, P. **Biologie, éco-éthologie et dynamique des populations du scolyte des grains de café, *Hypothenemus hampei* Ferr. (Coleoptera; Scolytidae), en Nouvelle-Calédonie**. 1992. 110 p. These (Docteur dans Sciences Biologiques) - L'Université de Rennes I, Paris, 1992.

GIORDANENGO, P.; BRUN, L.O.; FRÉROT, B. Evidence for allelochemical attraction of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, by coffee berries. **Journal of Chemical Ecology**, Dordrecht, v. 19, n. 4, p. 763-769, 1993.

HUBER, D.P.W.; GRIES, R.; BORDEN, J.H.; PIERCE, H.D. A survey of antennal responses by five species of coniferophagous bark beetles (Coleoptera: Scolytidae) to bark volatiles of six species of angiosperm trees. **Chemoecology**, Basel, v. 10, p. 103-113, 2000.

INFANTE, F.; PÉREZ, J.; VEGA, F.E. Redirect research to control coffee pest. **Nature**, London, v. 489, p. 502, 2012.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. **Statistics**. Disponível em: <[http://www.ico.org/new\\_historical.asp?section=Statistics](http://www.ico.org/new_historical.asp?section=Statistics)>. Acesso em: 05 jan. 2014.

JARAMILLO, J.; CHABI-OLAYE, A.; KAMONJO, C.; JARAMILLO, A.; VEGA, F.E.; POEHLING, H.M.; BORGEMEISTER, C. Thermal tolerance of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*: predictions of climate change impact on a tropical insect pest. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 4, n. 8, p. e6487, 2009.

JARAMILLO, J.; TORTO, B.; MWENDA, D.; TROEGER, A.; BORGEMEISTER, C.; POEHLING, H.M.; FRANCKE, W. Coffee berry borer joins bark beetles in coffee klatch. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 9, p. e74277, 2013.

KARUNARATNE, W.S.; KUMAR, V.; PETTERSSON, J.; KUMAR, N.S. Response of the shot-hole borer of tea, *Xyleborus fornicatus* (Coleoptera: Scolytidae) to conspecifics and plant semiochemicals. **Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science**, Oslo, v. 58, p. 345-351, 2008.

KLEIN, A.M.; DEWENTER, I.S.; TSCHARNTKE, T. Fruit set of highland coffee increases with the diversity of pollinating bees. **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences**, London, v. 270, p. 955-961, 2003.

LACEY, E.S.; MOREIRA, J.A.; MILLAR, J.G.; HANKS, L.M. A male-produced aggregation pheromone blend consisting of alkanediols, terpenoids, and an aromatic alcohol from the cerambycid beetle *Megacyllene caryae*. **Journal of Chemical Ecology**, Dordrecht, v. 34, p. 408-417, 2008.

LE PELLEY, R.H. **Pests of coffee**. London: Longmans, Green and Co., 1968 590 p.

LÓPEZ-GUILLÉN, G.; CARRASCO, J.V.; CRUZ-LÓPEZ, L.; BARRERA, J.F.; MALO, E.A.; ROJAS, J.C. Morphology and structural changes in flight muscles of *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) females. **Environmental Entomology**, Lanham, v. 40, p. 441-448, 2011.

MATHIEU, F.; BRUN, L.O.; FRÉROT, B. Factors related to native host abandonment by the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Ferr.) (Col., Scolytidae). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 121, n. 3, p. 175-180, 1997.

MATHIEU, F.; MALOSSE, C.; FRÉROT, B. Identification of the volatile components released by fresh coffee berries at different stages of ripeness. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 3, p. 1106-1110, 1998.

MATHIEU, F.; GAUDICHON, V.; BRUN, L.O.; FRÉROT, B. Effect of physiological status on olfactory and visual responses of female *Hypothenemus hampei* during host plant colonization. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 26, n. 3, p. 189-193, 2001.

MATHIEU, F.; MALOSSE, C.; CAIN, A.H.; FRÉROT, B. Comparative headspace analysis of fresh red coffee berries from different cultivated varieties of coffee trees. **Journal of High Resolution Chromatography**, New York, v. 19, p. 298-300, 1996.

MCNEE, W. R.; WOOD, D.L.; STORER, A.J. Pre-emergence feeding in bark beetles (Coleoptera: Scolytidae). **Environmental Entomology**, Lanham, v. 29, p. 495-501, 2000.

MENDESIL, E.; BRUCE, T. J.A.; WOODCOCK, C.M.; CAULFIELD, J.C.; SEYOUM, E.; PICKETT, J.A. Semiochemicals used in host location by the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. **Journal of Chemical Ecology**, Dordrecht, v. 35, n. 8, p. 944-950, 2009.

ORTIZ, A.; ORTIZ, A.; VEGA, F.E.; POSADA, F. Volatile composition of coffee berries at different stages of ripeness and their possible attraction to the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 19, p. 5914-5918, 2004.

PÉREZ, J.; INFANTE, F.; VEGA, F.E. Microorganismos asociados a la broca del café. ¿Existe realmente um mutualismo? In: WORKSHOP INTERNACIONAL SOBRE MANEJO DA BROCA-DO-CAFÉ, 2007, Londrina **Proceedings...** Londrina: IAPAR, 2007. p. 65-76.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R 2.15**. Vienna, 2012. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

RAY, A.M.; ŽUNIČ, A.; ALTEN, R.L.; MCELFFRESH, J.S.; HANKS, L.M.; MILLAR, J.G. cis-Vaccenyl acetate, a sex attractant pheromone of *Ortholeptura valida*, a longhorned beetle in the subfamily Lepturinae. **Journal of Chemical Ecology**, Dordrecht, v. 37, p. 172-178, 2011.

RIBEIRO, P.A.; SUJII, E.R.; DINIZ, I.R.; MEDEIROS, M.A.; SALGADO-LABOURIAU, M.L.; BRANCO, M.C.; PIRES, C.S.S; FONTES, E.M.G. Alternative food sources and overwintering feeding behavior of the boll weevil, *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) under the tropical conditions of central Brazil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 39, n. 1, p. 28-34, 2010.

ROBLERO, E.N.C.; MALO, .A. Chemical analysis of coffee berry volatiles that elicit an antennal response from the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*. **Journal of the Mexican Chemical Society**, Mexico D.F., v. 57, n. 4, p. 321-327, 2013.

ROUBIK, D.W. The value of bees to the coffee harvest. **Nature**, London, v. 417, p. 708, 2002.

SHAPIRO, S.S.; WILK, M.B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, Oxford, v. 52, p. 591-611, 1965.

SHEPHERD, W.P.; SULLIVAN, B.T. Southern pine beetle, *Dendroctonus frontalis*, antennal and behavioral responses to nonhost leaf and bark volatiles. **Journal of Chemical Ecology**, Dordrecht, v. 39, n. 4, p. 481-93, 2013.

SHEPHERD, W.P.; HUBER, D.P.W.; SEYBOLD, S.J.; FETTIG, C.J. Antennal responses of the western pine beetle, *Dendroctonus brevicomis* (Coleoptera: Curculionidae), to stem volatiles of its primary host, *Pinus ponderosa*, and nine sympatric nonhost angiosperms and conifers. **Chemoecology**, Basel, v. 17, p. 209-221, 2008.

SILVA, W.D.; MASCARIN, G.M.; ROMAGNOLI, E.M.; BENTO, J.M.S. Mating behavior of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). **Journal of insect behavior**, New York, v. 25, p. 408–417, 2012.

SPADONE, J.C.; TAKEOKA, G.; LIARDON, R. Analytical investigation of rio off-flavor in green coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 38, p. 226-233, 1990.

SPONAGEL, K.W. **La broca del café *Hypothenemus hampei* en plantaciones de café robusta en la Amazonía Ecuatoriana**. Giessen: Agrarwissenschaften, Wissenschaftlicher Fachverlag, 1994. 185 p.

TICHELER, J. Etude analytique de l'épidémiologie du scolyte des graines de café *Stephanoderis hampei* Ferr. en Cote d'Ivoire. **Mededelingen Landbouwhogeschool**, Wageningen, v. 61, p. 1-49, 1961.

UKERS, W.H. The botany of the coffee plant. In: \_\_\_\_\_. **All about coffee**. New York: The Tea and Coffee Trade Journal Company, 1922. chap. 15, p. 132-149.

VEGA, F.E. The rise of coffee. **American Scientist**, Research Triangle Park, v. 96, p. 138-145, 2008.

VEGA, F.E.; ROSENQUIST, E.; COLLINS, W. Global project needed to tackle coffee crisis. **Nature**, London, v. 435, p. 371-380, 2003.

VEGA, F.E.; BENAVIDES, P.; STUART, J.A.; O'NEILL, S.L. *Wolbachia* infection in the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae). **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 95, n. 3, p. 374-378, 2002.

VEGA, F.E.; INFANTE, F.; CASTILLO, A.; JARAMILLO, J. The coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae): a short review, with recent findings and future research directions. **Terrestrial Arthropod Reviews**, Washington, v. 2, p. 129-147, 2009.

VERGARA; C.H.; BADANO, E.I. Pollinator diversity increases fruit production in Mexican coffee plantations: the importance of rustic management systems. **Agriculture Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 129, p. 117-123, 2009.

ZHANG, Q.H.; SCHLYTER, F.; BIRGERSSON, G. Bark volatiles from nonhost angiosperm trees of spruce bark beetle, *Ips typographus* (L.) (Coleoptera: Scolytidae): chemical and electrophysiological analysis. **Chemoecology**, Basel, v. 10, p. 69-80, 2000.