



**CENTRO UNIVERSITÁRIO VILA VELHA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS**

**CESAR ABEL KROHLING**

**Efeito de inseticidas nos aspectos enzimáticos e fisiológicos em plantas  
de café Conilon (*Coffea canephora*) e na microbiota do solo**

VILA VELHA

2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

CESAR ABEL KROHLING

**Efeito de inseticidas nos aspectos enzimáticos e fisiológicos em plantas de café Conilon (*Coffea canephora*) e na microbiota do solo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ecossistemas do Centro Universitário Vila Velha, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ecologia de Ecossistemas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Zilma Maria  
Almeida Cruz

Co- orientador: Prof. Dr. Alessandro  
Coutinho Ramos

VILA VELHA

2010

**Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES**

K93e            Krohling, Cesar Abel

Efeito de inseticidas nos aspectos enzimáticos e fisiológicos em plantas de café Conilon (*Coffea canephora*) e na microbiota do solo / Cesar Abel Krohling. – 2010.

xxi, 124 f.: il

Orientador: Prof. Dra. Zilma Maria Almeida Cruz

Dissertação (mestrado em Ecologia de Ecossistemas) – Centro Universitário Vila Velha, 2010.

Inclui bibliografias.

1. Café – doenças e pragas. 2. Café - inseticidas. 3. Café - cultivo. 4. Fotossíntese. I. Zilma Maria Almeida Cruz. II. Centro Universitário Vila Velha. III. Título.

CDD 633.73

CESAR ABEL KROHLING

**Efeito de inseticidas nos aspectos enzimáticos e fisiológicos em plantas de café Conilon (*Coffea canephora*) e na microbiota do solo**

COMISSÃO EXAMINADORA

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Zilma Maria Almeida Cruz  
Centro Universitário Vila Velha –UVV

---

Prof. Dr. Eliemar Campostrini (Dr. Produção Vegetal)  
UENF – Campos dos Goytacazes – RJ

---

Prof. Dr. Daniel Basílio Zandonadi (Dr. Produção Vegetal)  
Centro Universitário Vila Velha –UVV

Vila Velha, 24 de março de 2010

Dedico este trabalho aos meus queridos pais,  
Sebastião Krohling Segundo e Tereza V. Luduvico  
Krohling e aos amados filhos Caio Cesar K. Krohling  
e Camila K. Krohling

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela proteção do dia-a-dia.

Ao Centro Universitário Vila Velha – UVV, pela possibilidade de realização do Mestrado e dos trabalhos.

Aos meus familiares pelo apoio e incentivo desta jornada, em especial aos meus dois queridos filhos, Caio e Camila pela compreensão, apoio e ajuda.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Zilma Maria Almeida Cruz, pela orientação, dedicação, apoio, incentivo e confiança.

Ao meu co-orientador Dr. Alessandro Coutinho Ramos pela orientação, ajuda, incentivo, dedicação, compreensão.

Aos professores do Mestrado em Ecologia de Ecossistemas pelo aprendizado e dedicação.

Ao Prof. Dr. Eliemar Campostrini da Uenf, pelo suporte, ajuda e disponibilidade dos aparelhos para a execução dos parâmetros fisiológicos.

Aos alunos de Doutorado em Fisiologia Vegetal da Uenf, Anderson Lopes Peçanha e Thiago Massi Ferraz pela ajuda direta na execução dos trabalhos de campo.

Ao colega de Mestrado Frederico Jacob Eutrópio pelo incentivo e ajuda durante o curso de Mestrado.

Ao professor de Inglês Anderson Fragoso pelo incentivo, dedicação e confiança.

Ao Dr. Hélcio Costa – Fitopatologista do INCAPER Centro Serrano pela identificação dos fungos do solo.

Aos alunos de Ciências Biológicas Antônio, Edgar, Lázaro, pela ajuda nos trabalhos de campo e no Laboratório de Biomarcadores de contaminação e genotoxicidade.

Ao Professor João e ao Técnico Paulo e aos alunos Carol, Naninha, Wagner, pela ajuda no Laboratório de Microbiologia.

Aos colegas do Mestrado, Adriana, Ederaldo, Roberta, Rodrigo, Celina, Frederico, Daniela pela convivência e amizade.

A Empresa Syngenta Proteção de Cultivos Ltda pela doação da mistura dos inseticidas Chlorantraniliprole + Thiamethoxan.

Aos proprietários rurais Dr. Paulo Sérgio Pícoli (Anchieta) e Sr. Altamir Quintino (Alfredo Chaves), por ceder as áreas para estudo.

Aos proprietários do Viveiro de Mudas Ipiranga, Linhares, ES.

Ao amigo Carminatti pela ajuda na disponibilização da área de estudo em Anchieta.



“A natureza nunca nos engana; somos sempre nós que nos enganamos”

Jean-Jacques Rousseau

## RESUMO

A cultura do café tem grande importância econômica e social para o Estado do Espírito Santo. Anualmente, se produz mais de 10 milhões de sacas sendo que, aproximadamente 70% são da variedade Conilon (*Coffea canephora*). Vários fatores interferem na produção e na qualidade dos grãos, com destaque para as pragas. O objetivo do estudo foi avaliar, em café Conilon, a eficiência de uma nova mistura de inseticidas, Chlorantraniliprole e Thiamethoxan (Chlo + Thia) no controle da Broca-do-café, e comparar os resultados com aqueles obtidos com Endosulfan. Da mesma forma, comparar os resultados dessa mistura com o Imidacloprid no controle do Bicho-mineiro, além de verificar a interferência das substâncias na microbiota do solo, nos processos bioquímicos e fisiológicos da planta. A área de estudo para controle do Bicho-mineiro foi uma lavoura adulta de café Conilon localizada no Município de Anchieta, ES, onde a mistura dos inseticidas e Imidacloprid foi aplicada no solo via *drench*, para avaliar o ataque da praga e a interferência na microbiota do solo. O ensaio para avaliar o controle da Broca-do-café, foi desenvolvido em lavoura de doze anos de idade no Município de Alfredo Chaves, ES. A mistura Chlo + Thia e o Endosulfan foram aplicados via foliar e a avaliação realizada nos frutos, após 15 e 30 dias da segunda aplicação, e dos grãos após a colheita. O estudo das características fisiológicas e enzimáticas foi realizado em Marechal Floriano, ES, com mudas de café Conilon da variedade Vitória, Clone 02, transplantadas em vasos de 5,0 L e conduzidas em estufa em condições adequadas de umidade e nutrição. Após 196 dias, foram aplicados inseticidas Chlo + Thia e Endosulfan nas folhas e Chlo + Thia e Imidacloprid no solo. A taxa fotossintética líquida ( $A$ ), condutância estomática ( $gs$ ), transpiração ( $E$ ), rendimento quântico do PSII ( $F_v/F_m$ ) e a concentração de centros de reação ativos ( $RC/CS_0$ ), foram avaliados durante o período experimental. As atividades das enzimas Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Fosfatase ácida (ACP) foram determinadas 96 horas após aplicação dos inseticidas na folha e, 18 dias após aplicação no solo. Os resultados demonstraram que a aplicação dos inseticidas via *drench* não apresentaram diferenças na infestação do Bicho-mineiro em relação ao controle, além da não-interferência na microbiota do solo. Em relação à Broca-do-café, a nova mistura (Chlo + Thia) apresentou

eficiência semelhante ao Endosulfan (padrão), nas concentrações mais elevadas de 0,75 e 1,0 L/ha, o que sugere sua utilização na prática para o controle da praga. Quanto aos parâmetros fisiológicos, os valores de  $A$ ,  $g_s$ ,  $F_v/F_m$  e  $RC/CS_0$  foram reduzidos ao contrário de  $E$ , que sofreu elevação após 48 horas, quando expostas às maiores concentrações dos inseticidas. O Imidacloprid, por sua vez, após 18 dias da aplicação reduziu  $A$  e  $E$ , enquanto que a mistura exerceu efeito inibitório somente em  $E$ . Em relação às enzimas, a SOD apresentou inibição significativa quando expostas às concentrações elevadas dos inseticidas, aplicados tanto na folha como no solo. Doses reduzidas dos inseticidas, aplicados na folha (0,25 L/ha de Chlo + Thia) e no solo (0,75 L/ha de Chlo + Thia e 1,0 kg/ha de Imidacloprid), elevaram a atividade da CAT, ao contrário das concentrações mais elevadas, o que resultou na redução de sua ação protetora nas plantas. A resposta da ACP foi a redução da atividade enzimática na presença dos inseticidas em todas as concentrações, aplicados tanto na folha como no solo. Estes resultados permitem concluir que a nova mistura de inseticidas Chlo + Thia, apresentou menor toxicidade em relação ao Endosulfan quando comparado às atividades enzimáticas. O perfil fisiológico das plantas mostrou alterações negativas na eficiência fotoquímica e na ação estomática, quando expostas às elevadas concentrações dos inseticidas. A análise na microbiota do solo, por sua vez, demonstrou que os fungos foram menos sensíveis do que as bactérias.

**Palavras-chave:** Café Conilon, Chlorantraniliprole, Broca-do-café, Fotossíntese, Enzimas, Microbiota

## ABSTRACT

The growing of coffee has a great deal of social and economic importance to the state of Espírito Santo. Over 10 million sacks of coffee are produced annually, with 70% of that number being of the Conilon (*Coffea canephora*) variety. Several factors interfere in the production and the quality of the grains, one of those being the plagues. This study aims to analyze, in Conilon coffee, the efficiency of a new mix of insecticides, Chlorantraniliprole e Thiamethoxam (Chlo + Thia) in the control of coffee berry borer (*Hypotenemus hampei*) and to compare the results to those obtained with Endossulfan. Altogether, it's sought to compare the results of this mix with the Imidacloprid in the control of coffee leaf-miner (*Leucoptera coffeella*), besides verifying the interference of substances in the soil's microbiot as well as in the biochemical and physiological processes of the plant. The area chosen to study the control of coffee leaf-miner was a grown Conilon coffee culture situated at Anchieta, ES, where the mix of insecticides and Imidacloprid was applied on the soil via drench, to evaluate the plague's attack and the interference of the microbiot on the same soil. The rehearsal to observe the control of coffee berry borer the was developed in a twelve-year-old coffee culture in Alfredo Chaves, ES. The blend of Chlo + Thia and the Endosulfan were applied on the plant's leaf and the evaluation had on the fruits, after 15 and 30 days since the second exposure, and the grains after the reaping. The study of the physiological and enzymatic characteristics was drawn at Marechal Floriano, ES, with the Vitória variety of Conilon coffee seedlings, Clone 02, transplanted in 5,0 L recipients and conduced in greenhouses with proper humidity and nutrition. After 196 days, Chlo + Thia and Endosulfan insecticides were applied on the leafs and Chlo + Thia and Imidacloprid on the soil. The net CO<sub>2</sub> assimilation rate ( $A$ ), stomatal conductance ( $g_s$ ), transpiration ( $E$ ), maximum quantum efficiency of the photosystem II ( $F_v/F_m$ ) and concentration of active reaction center ( $RC/CS_0$ ), were evaluated during the experimental period. The activity of the enzymes Superoxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) and acid Fosfatase (ACP) were determined 96 hours since the insecticide's exposure on the leafs and, 18 days after the soil exposure. The results proved that the exposure of the insecticides

via drench didn't show any differences towards the coffee leaf-miner infestation when it comes to control, besides the non-interference of the microbiot on the soil. Regarding the coffee berry borer, the new mix (Chlo + Thia) had similar positive effect to the Endosulfan (standard) at higher concentrations of 0,75 and 1,0 L/ha, which corroborates the practical usage of the mix in plague control. As for the physiological parameters, the  $A$ ,  $g_s$ ,  $F_v/F_m$  e  $RC/CS_0$  values were reduced as opposed to the  $E$  value, which suffered elevation after 48 hours, when exposed to higher concentrations of the insecticides. The Imidacloprid, after 18 days of exposure, reduced  $A$  and  $E$ , at the time that the mix had inhibitory effect on  $E$ , specifically. Concerning the enzymes, SOD shown significant inhibition when exposed to higher concentrations of the insecticides, applied on the leafs, as well as the soil. Reduced dosage of the insecticides, applied in the leaf (0,25 L/ha of Chlo + Thia) and soil (0,75 L/ha of Chlo + Thia and 1,0 kg/ha of Imidacloprid), elevated the CAT activity, as opposed to higher concentrations, which resulted in the reduction of its protective role in plants. The ACP response was the reduction of the enzymatic activity in the presence of insecticides in all concentrations, applied in the leafs and soil. These results make possible to conclude that the new mix of insecticides Chlo + Thia shown less toxicity than Endossulfan when compared to enzymatic activities. The physiological profile of the plants demonstrated negative alterations on the photochemical efficiency and stomatal action when exposed to higher concentrations of the insecticed. At last, the analysis microbiot of the soil shown that the fungi were less sensible than the bacterias.

**Key-words:** Conilon Coffe, Chlorantraniliprole, coffee berry borer, Photosynthesis, Enzymes, Microbiot

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Área de estudo do Bicho-mineiro.....	44
Figura 2. Aplicação dos inseticidas no solo via <i>drench</i> (A) e determinação do índice pluviométrico (B) em lavoura de café Conilon no controle do Bicho-mineiro em Anchieta, ES.....	45
Figura 3. Área de estudo da Broca-do-café.....	49
Figura 4. Aplicação dos inseticidas via foliar (A) com pulverizador costal motorizado e amostragem dos frutos (B) para determinação do índice de infestação da Broca-do-café em lavoura adulta de café Conilon, Alfredo Chaves, ES.....	49
Figura 5. Aplicação dos inseticidas na Folha (A) com pulverizador manual de jardim e no solo via <i>drench</i> (B), em plantas de café Conilon, variedade Vitória, clone 02, em estufa, Marechal Floriano, ES.....	52
Figura 6. Valores da Umidade Relativa (UR) em percentagem (%), da Temperatura (T) em (°C) e do Déficit de Pressão de Vapor (DPV) em (kPa) durante os 4 dias de avaliação do experimento. Os dados da UR e T foram obtidos em intervalos de 5 minutos, e o DPV no momento das medições das trocas gasosas.....	56
Figura 7. Medição das Trocas Gasosas (A), com o Sistema Portátil Modelo LI-6200 e Fluorescência da clorofila <i>a</i> (B), com um Fluorímetro não-modulado PEA, em plantas de café Conilon variedade Vitória, Clone 02, no interior da estufa, em Marechal Floriano, ES.....	57
Figura 8. Coleta do segundo par de folhas (A) após 96 horas da aplicação dos inseticidas via foliar e 19 dias via <i>drench</i> , em plantas de café Conilon para as determinações enzimáticas. Maceração das folhas (B), para obtenção dos extratos enzimáticos.....	58

Figura 9. Amostragem do solo (A) para avaliação da população de fungos e bactérias e isolamento destes fungos (B), em lavoura de café Conilon após a aplicação de inseticidas no solo via <i>drench</i> , em Anchieta, ES.....	62
Figura 10. Regressão polinomial entre a % de frutos brocados 15 DAP (A) e 30 DAP (B) e as doses da mistura dos inseticidas Chlo + Thia, aplicados via foliar para o controle da broca-do-café, em café Conilon, Alfredo Chaves, ES.....	65
Figura 11. Correlação polinomial entre a % de grãos brocados e as doses dos inseticidas Chlo + Thia, aplicados via foliar para o controle da broca-do-café, em café Conilon, Alfredo Chaves, ES.....	66
Figura 12. Efeito dos inseticidas aplicados na Folha (F) e no Solo (S), na Taxa Fotossíntese Líquida de CO <sub>2</sub> (A) em $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , nos dezenove dias de avaliação do experimento. O Dia 1 foi antes da aplicação dos inseticidas, o Dia 2 foi 1 DAP, o Dia 3 foi 2 DAP e o Dia 19 foi 18 DAP. Letras diferentes nas barras indicam diferença estatística significativa pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ). As médias foram comparadas pela ANOVA e $n=5$ .....	68
Figura 13. Correlação polinomial entre a Taxa Fotossíntese Líquida de CO <sub>2</sub> (A) em $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e as doses dos inseticidas Chlo + Thia, 1 DAP via foliar em plantas de café Conilon na estufa, Marechal Floriano, ES.....	69
Figura 14. Efeito dos inseticidas aplicados na Folha (F) e no Solo (S), na Condutância Estomática ( $g_s$ ) em $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , nos dezenove dias de avaliação do experimento. O Dia 1 foi antes da aplicação dos inseticidas, o Dia 2 foi 1 DAP, o Dia 3 foi 2 DAP e o Dia 19 foi 18 DAP. Letras diferentes nas barras indicam diferença estatística significativa pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ). As médias foram comparadas pela ANOVA e $n=5$ .....	71

Figura 15. Efeito dos inseticidas aplicados na Folha (F) e no Solo (S), na Transpiração ( $E$ ) em  $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , nos dezenove dias de avaliação do experimento. O Dia 1 foi antes da aplicação dos inseticidas, o Dia 2 foi 1 DAP, o Dia 3 foi 2 DAP e o Dia 19 foi 18 DAP. Letras diferentes nas barras indicam diferença estatística significativa pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ). As médias foram comparadas pela ANOVA e  $n=5$ ..... 72

Figura 16. Regressão polinomial entre o Rendimento Quântico Máximo do PSII ( $F_v/F_m$ ) e as doses dos inseticidas Chlo + Thia, 1 DAP, via foliar em plantas de café Conilon na estufa, Marechal Floriano, ES..... 73

Figura 17. Efeito dos inseticidas aplicados na Folha (F) e no Solo (S), no Rendimento Quântico Máximo do Fotossistema II ( $F_v/F_m$ ), nos dezenove dias de avaliação do experimento. O Dia 1 foi antes da aplicação dos inseticidas, o Dia 2 foi 1 DAP, o Dia 3 foi 2 DAP e o Dia 19 foi 18 DAP. Letras diferentes nas barras indicam diferença estatística significativa pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ). As médias foram comparadas pela ANOVA e  $n=5$ ..... 74

Figura 18. Efeito dos inseticidas aplicados na Folha (F) e no Solo (S), na Concentração de Centros de Reação Ativos ( $RC/CS_o$ ), nos dezenove dias de avaliação do experimento. O Dia 1 foi antes da aplicação dos inseticidas, o Dia 2 foi 1 DAP, o Dia 3 foi 2 DAP e o Dia 19 foi 18 DAP. Letras diferentes nas barras indicam diferença estatística significativa pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ). As médias foram comparadas pela ANOVA e  $n=5$ ..... 76

Figura 19. Modelo 'pipeline' de membrana (Figura 19-A) e da área da seção transversal das plantas Controle do Dia 3 – Manhã (Figura 19-B), do fluxo de energia em folhas de café Conilon, variedade Vitória, clone 02. Os círculos fechados (coloração preta) correspondem aos centros de reação inativos, e os abertos aos centros de reação ativos. A largura das setas indica a energia absorvida pelo sistema antena do PSII por centro de reação ( $ABS/RC$ ), energia usada para reduzir  $Q_A$  por centro de reação ( $TR_o/RC$ ), dissipação efetiva dos centros de reação ativos ( $DI_o/RC$ ),



número total de fótons absorvidos por seção transversal da amostra ( $ABS/CS_0$ ), máxima taxa de captura de fótons por seção transversal da amostra ( $TR_0/CS_0$ ) e dissipação efetiva por seção transversal ( $DI_0/CS_0$ ) indicam a intensidade do fluxo de energia..... 77

Figura 20. Modelo 'pipeline' de membrana (Figura 20-A) e da área da seção transversal das plantas do tratamento com o inseticida foliar (Chlo + Thia) na concentração de 2,0 L/ha, do Dia 3 – Manhã (Figura 20-B), do fluxo de energia em folhas de café Conilon, variedade Vitória, clone 02. Os círculos fechados (coloração preta) correspondem aos centros de reação inativos e os abertos, aos centros de reação ativos. A largura das setas energia absorvida pelo sistema antena do PSII por centro de reação ( $ABS/RC$ ), energia usada para reduzir  $Q_A$  por centro de reação ( $TR_0/RC$ ), dissipação efetiva dos centros de reação ativos ( $DI_0/RC$ ), número total de fótons absorvidos por seção transversal da amostra ( $ABS/CS_0$ ), máxima taxa de captura de fótons por seção transversal da amostra ( $TR_0/CS_0$ ) e dissipação efetiva por seção transversal ( $DI_0/CS_0$ ) indicam a intensidade do fluxo de energia..... 78

Figura 21. Modelo 'pipeline' de membrana (Figura 21-A) e da área da seção transversal das plantas do tratamento com o inseticida foliar (Endosulfan) na concentração de 4,0 L/ha, do Dia 3 – Manhã (Figura 21-B), do fluxo de energia em folhas de café Conilon, variedade Vitória, clone 02. Os círculos fechados (coloração preta) correspondem aos centros de reação inativos e os abertos, aos centros de reação ativos. A largura das setas energia absorvida pelo sistema antena do PSII por centro de reação ( $ABS/RC$ ), energia usada para reduzir  $Q_A$  por centro de reação ( $TR_0/RC$ ), dissipação efetiva dos centros de reação ativos ( $DI_0/RC$ ), número total de fótons absorvidos por seção transversal da amostra ( $ABS/CS_0$ ), máxima taxa de captura de fótons por seção transversal da amostra ( $TR_0/CS_0$ ) e dissipação efetiva por seção transversal ( $DI_0/CS_0$ ) indicam a intensidade do fluxo de energia..... 79

<p>Figura 22. Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) em folhas de café Conilon, 96 horas após aplicação de inseticidas na Folha (F) e 18 DAP no Solo (S). A atividade enzimática foi expressa em U/mg de proteína. Os valores das médias foram comparados pela ANOVA, com cinco plantas (n=5), com 03 determinações enzimáticas por planta. Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa pelo teste de Duncan (<math>p \leq 0,05</math>).....</p>	81
<p>Figura 23. Atividade da enzima Catalase (CAT) em folhas de café Conilon, 96 horas após aplicação de inseticidas na Folha (F) e 18 DAP no Solo (S). A atividade enzimática foi expressa em U/mg de proteína. Os valores das médias foram comparados pela ANOVA, com cinco plantas (n=5), com 03 determinações enzimáticas por planta. Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa pelo teste de Duncan (<math>p \leq 0,05</math>).....</p>	83
<p>Figura 24. Atividade da enzima Fosfatase Ácida (ACP) em folhas de café Conilon, 96 horas após aplicação de inseticidas na Folha (F) e 18 DAP no Solo (S). A atividade enzimática foi expressa em U/mg de proteína. Os valores das médias foram comparados pela ANOVA, com cinco plantas (n=5), com 03 determinações enzimáticas por planta. Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa pelo teste de Duncan (<math>p \leq 0,05</math>).....</p>	84
<p>Figura 25. Unidades Formadoras de Colônias (UFC) para Fungos (A) e Bactérias (B) nos tratamentos sem aplicação (Controle) e com aplicação de inseticidas (Chorantraniliprole + Thiamethoxan ou imidacloprid) no solo via <i>drench</i>, no controle de Bicho-mineiro a 0 (antes da aplicação) e 3, 6, 9, 12, 24, 60 e 120 DAP, em função da Precipitação (mm), em Anchieta, ES.....</p>	86

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Identificação dos tratamentos, princípios ativos e doses utilizadas no controle do Bicho-mineiro em café Conilon, Anchieta, ES.....	44
Tabela 2- Análise granulométrica do solo na área de estudo do Bicho-mineiro em Anchieta, ES.....	46
Tabela 3- Características químicas do solo na área de estudo do Bicho-mineiro em Anchieta, ES.....	46
Tabela 4- Identificação dos tratamentos, princípios ativos e doses utilizadas no controle da broca-do-café em café Conilon, Alfredo Chaves, ES.....	47
Tabela 5 – Identificação dos tratamentos, parâmetros observados (fases da broca) e o total de frutos broqueados para cada fase e por repetição pela abertura dos frutos broqueados em laboratório, sob microscópio estereoscópico.....	50
Tabela 6- Identificação dos tratamentos, princípios ativos e doses utilizadas via foliar em plantas de café Conilon, variedade Vitória, Clone 2, em estufa no estudo das Trocas Gasosas, Eficiência Fotoquímica e da Atividade Enzimática, em Marechal Floriano, ES.....	53
Tabela 7- Identificação dos tratamentos, princípios ativos e doses utilizadas via <i>drench</i> em plantas de café Conilon, variedade Vitória, Clone 2, em estufa, no estudo das Trocas Gasosas, Eficiência Fotoquímica e da Atividade Enzimática, Marechal Floriano, ES.....	53
Tabela 8- Características químicas do substrato utilizado no plantio das mudas de café Conilon, Clone 02, Marechal Floriano, ES.....	54
Tabela 9- Análise foliar de macro e micronutrientes das plantas de café Conilon, clone 02, Marechal Floriano, ES.....	54

Tabela 10 - Percentual de ataque do bicho-mineiro através de minas vivas nas folhas, durante oito meses após aplicação dos inseticidas no solo via <i>drench</i> , em Anchieta, ES.....	63
Tabela 11 – Percentagem da mortalidade da broca na entrada da galeria dos frutos broqueados e porcentagem de eficiência dos inseticidas aplicados nas folhas em duas avaliações realizadas aos 15 e 30 DAP da segunda pulverização. Anchieta, ES.....	64
Tabela 12 - Percentagem de grãos brocados após aplicação foliar dos inseticidas Chlo + Thia e Endosulfan e suas respectivas doses, em café Conilon, Alfredo Chaves, ES.....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

*A* - Taxa Fotossintética Líquida Instantânea

*ABS/RC* - Energia absorvida pelo sistema antena do PSII por centro de reação

*ABS/CS<sub>0</sub>* - Número total de fótons absorvidos por seção transversal da amostra

APHA - American Paint Horse Association

ANDEF – Associação Nacional de Defesa Vegetal

ANOVA – Análise de Variância

ATP - Adenosina Trifosfato

ACP - Fosfatase ácida

CAT- Catalase

Chlo + Thia - Chlorantraniliprole + Thiamethoxan

Conab - Companhia Nacional de Abastecimento

CTC (t)- Capacidade de Troca Catiônica Efetiva

CTC (T)- Capacidade de Troca Catiônica a pH 7,0

DAP – Dia Após a segunda Aplicação

*DI<sub>0</sub>/CS<sub>0</sub>* - Dissipação efetiva por secção transversal

*DI<sub>0</sub>/RC* - Dissipação efetiva dos centros de reação ativos

DNA - Ácido desoxirribonucléico

DPV- Déficit de Pressão de Vapor

*E* - Transpiração

*F<sub>0</sub>* - Fluorescência inicial

*F<sub>v</sub>* - Fluorescência variável

*F<sub>m</sub>* - Fluorescência máxima

*F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>* - Rendimento Quântico Máximo do Fotossistema II

*F<sub>0</sub>/F<sub>m</sub>* - Relação entre Fluorescência inicial e Fluorescência máxima

FFF - Fluxo de Fótons Fotossintéticos

FUNDENOR – Fundação Norte Fluminense de Desenvolvimento Vegetal

$g_s$  - Condutância Estomática

GS - Glutathione

GSH - Glutathione reduzida

GST - Glutathione S-transferase

GSH-Px - Glutathione peroxidase

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de hidrogênio

INCAPER – Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão  
Rural

ISNa - Índice de Saturação de Sódio

kPa – Kilopascal

m - Índice de Saturação de Alumínio

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MIP - Manejo Integrado de Pragas

MO - Matéria Orgânica

NaCl - Cloreto de Sódio

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato desidrogenase

NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

nm- Nanômetro

NMP - Número mais Provável

<sup>1</sup>O<sub>2</sub> – Oxigênio Singleto

O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Superóxido

OH<sup>-</sup> - Radical hidroxila

Ø – Diâmetro do caule

°C – Temperatura

% - Percentagem

PEA - Plant Efficiency Analyser

PSI - Fotossistema I

PSII - Fotossistema II

$RC/CS_o$  - Concentração de centros de reação ativos

ROS - Espécies reativas de oxigênio

ROIs - Espécies Reativas de Oxigênio Intermediários

SB - Soma de Bases

SH - Sulfidril

SOD - Superóxido Dismutase

$Q_A$  – Quinona A

T – Temperatura

$TR_o/CS_o$  - Capacidade de Redução de  $Q_A$  por seção transversal da área  
Amostrada

$TR_o/RC$  - Energia usada para reduzir  $Q_A$  por centro de reação

Uenf – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

UR- Umidade Relativa

UFC - Unidades Formadoras de Colônias

V - Índice de Saturação de Bases

WG - Granulados Dispersíveis

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	VII
<b>ABSTRAC</b> .....	IX
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	XI
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	XVI
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS</b> .....	XVIII
<b>SUMÁRIO</b> .....	XXI
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	25
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	28
2.1 Bicho-mineiro – <i>Leucoptera coffeella</i> (Guérin-Mèneville, 1842).....	28
2.2 Broca-do-café - <i>Hypothenemus hampei</i> (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae).....	30
2.3 Os Agrotóxicos.....	32
2.4 Características Fisiológicas.....	35
2.5 Biomarcadores.....	38
2.6 População Microbiana nos Solos.....	41
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	42
3.1 Objetivo Geral.....	42
3.2 Objetivos Específicos.....	43
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	43
4.1 Área de estudo do Bicho-Mineiro.....	43
4.2 Área de estudo da Broca-do-Café.....	47



4.3 Estudo das Trocas Gasosas, Eficiência Fotoquímica e da Atividade Enzimática.....	51
4.3.1 Área e Condições de Cultivo.....	51
4.3.2 Análises Biométricas.....	51
4.3.3 Aplicação dos Inseticidas.....	52
4.3.4 Trocas Gasosas e Eficiência Fotoquímica.....	54
4.3.4.1 Trocas gasosas.....	55
4.3.4.2 Fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	56
4.3.5 Teor de Clorofila.....	58
4.4 Determinação das Enzimas.....	58
4.4.1 Superóxido Dismutase - SOD (E.C 1.15.1.1) .....	59
4.4.2 Catalase - CAT (E.C. 1.11.1.6) .....	59
4.4.3 Fosfatase ácida - ACP (E.C. 3.1.3.2) .....	60
4.5 Determinação da Massa Seca.....	60
4.6 Determinações Microbiológicas.....	61
4.7 Análise Estatística.....	62
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>63</b>
5.1 Eficiências dos Inseticidas no Controle do Bicho-mineiro.....	63
5.2 Eficiências dos Inseticidas no Controle da Broca-do-café.....	63
5.3 Características Fisiológicas.....	67
5.3.1 Taxa Fotossintética Líquida ( <i>A</i> ) – na Folha ( <i>F</i> ) .....	67
5.3.2 Taxa Fotossintética Líquida ( <i>A</i> ) – no Solo ( <i>S</i> ) .....	67
5.3.3 Condutância Estomática ( <i>g<sub>s</sub></i> ) – na Folha ( <i>F</i> ) .....	69

5.3.4 Condutância Estomática ( $g_s$ ) - no Solo (S) .....	70
5.3.5 Transpiração ( $E$ ) – na Folha (F) .....	70
5.3.6 Transpiração ( $E$ ) – no Solo (S) .....	72
5.3.7 Rendimento Quântico Máximo do PSII ( $F_v/F_m$ ) – na folha (F).....	73
5.3.8 Rendimento Quântico Máximo do PSII ( $F_v/F_m$ ) – no Solo (S).....	75
5.3.9 Concentração de Centros de Reação Ativos ( $RC/CS_o$ ) – na Folha (F) .....	75
5.3.10 Concentração de Centros de Reação Ativos ( $RC/CS_o$ ) – no Solo (S) .....	75
5.4 Atividade das Enzimas.....	80
5.4.1 Superóxido Dismutase (SOD) – na Folha (F) e no Solo (S).....	80
5.4.2 Catalase (CAT) - na Folha (F) e no Solo (S) .....	81
5.4.3 Fosfatase Ácida (ACP) - na Folha (F) e no Solo (S) .....	82
5.5 Microbiota do Solo.....	84
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>87</b>
6.1 Eficiências dos Inseticidas no Controle do Bicho-mineiro.....	87
6.2 Eficiências dos Inseticidas no Controle da Broca-do-café.....	88
6.3 Trocas Gasosas ( $A$ , $g_s$ e $E$ ) e Relações ( $F_v/F_m$ ) e ( $RC/CS_o$ ) – Folha e Solo.....	88
6.4 Atividade das Enzimas ACP, SOD e CAT na Folha (F) e no Solo (S)..	92
6.5 Microbiota do Solo.....	95
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>97</b>
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>98</b>
<b>ANEXO 1.....</b>	<b>120</b>

<b>ANEXO 2.....</b>	<b>121</b>
<b>ANEXO 3.....</b>	<b>122</b>
<b>ANEXO 4.....</b>	<b>123</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café, sendo essa commodity de extrema importância para o agronegócio brasileiro. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), a estimativa da safra brasileira em 2010, será de 46 a 49 milhões de sacas. O Estado do Espírito Santo ocupa o segundo lugar em produção e a variedade Conilon capixaba, responderá por 8,5 a 9,0 milhões de sacas (Conab, 2010).

Em toda a cadeia produtiva, a produção de café de forma sustentável é de suma importância, com adoção de boas práticas de manejo e com responsabilidade ambiental e social. Com essas ações é possível obter um café de qualidade e que forneça segurança alimentar aos consumidores, além de gerar emprego diretamente a mais de 400 mil pessoas em todo o processo produtivo no estado do Espírito Santo (DE MUNER et al., 2009).

A variedade Conilon, da espécie *Coffea canephora*, é a mais importante pelo volume de produção e valor industrial. Essa espécie é muito utilizada na indústria de cafés solúveis, por conter maior quantidade de sólidos solúveis e é usado na mistura com o café arábica para dar mais corpo e diminuir a acidez (FERRAO, 2004; BELING, 2005).

A produção do café é regulada por diversos fatores como o clima (temperatura, precipitação, umidade etc.), tratamentos culturais (calagem, adubação, controle de ervas daninhas, podas, etc.), variedades, tipos de solos, irrigação, controle de pragas e doenças, entre outros (MATIELLO et al., 2005).

Diversos fatores interferem na redução da produtividade das lavouras do cafeeiro e qualidade dos grãos. Nesse aspecto, as pragas têm relevância, destacando-se a Broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera:Scolytidae) e o Bicho-mineiro *Leucoptera coffeella* (Guérin-Ménéville, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae) (SOUZA & REIS, 1997; REIS & SOUZA, 1998; MATIELLO et al., 2005).

Para o controle dessas pragas, muitos são os produtos registrados. O princípio ativo mais utilizado e eficiente para o controle da broca-do-café e que também controla o bicho-mineiro é o Endosulfan, de uso proibido para determinadas certificadoras, sendo da classe toxicológica I, extremamente tóxico aos animais e ao ambiente (Compêndio dos Defensivos Agrícolas, 2005). A substituição deste princípio ativo por outros de igual ou maior eficiência e de baixa toxicidade, é fundamental para a cafeicultura nacional.

No controle químico dessas pragas, a aplicação de inseticidas, tanto via foliar como no solo, pode interferir na microbiota do solo, na atividade metabólica dos vegetais, na fotossíntese e na fisiologia da planta.

Nos solos, os microorganismos rizosféricos desempenham funções importantes nos ciclos biogeoquímicos dos nutrientes, na transformação da matéria orgânica, na influência do enraizamento, na produção de substâncias promotoras do crescimento, na absorção de nutrientes e na proteção do vegetal contra o estresse (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Nos últimos anos, estudos sobre ação de agrotóxicos na biota têm sido realizados (CHEN & EDWARDS, 2001), devido à necessidade de conhecer os efeitos nocivos dessas substâncias, com o objetivo de minimizar seus efeitos adversos sobre o homem e o ambiente (SCHROLL et al., 1992).

Por outro lado, a produtividade dos vegetais é influenciada pelas taxas fotossintéticas que prevalecem na dinâmica do ambiente. Sob o ponto de vista fisiológico, é preciso compreender como esta taxa responde diretamente aos fatores ambientais como luz, temperatura e concentrações de CO<sub>2</sub>, ou mesmo indiretamente a fatores como a umidade do ar e do solo, por meio dos efeitos do controle estomático (LARCHER, 2000; TAIZ & ZEIGER, 2009).

Outro aspecto importante a ser observado além das trocas gasosas no acompanhamento da resposta vegetal aos princípios ativos, é a relação entre as fluorescências variável e máxima ( $F_v/F_m$ ) que expressam a eficiência de energia de excitação nos centros de reação do Fotossistema II (PSII) (KAUSE

& WEIS, 1991). Segundo Haehne et al., (1982), essa relação pode representar a Eficiência Quântica do transporte de elétrons nesse fotossistema.

Muitas substâncias, como os agrotóxicos, induzem à produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) que, quando em concentração maior que a capacidade antioxidante do tecido, resulta no estresse oxidativo (SIES, 1991; MARTINEZ-CAYUELA, 1998; GIL-DEL VALLE et al., 1999). Organismos aeróbicos desenvolveram um conjunto de mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos, como forma de proteção contra seus efeitos nocivos dessas ROS (NIKI, 1987; WEFERS & SIES, 1988). O monitoramento do processo antioxidativo é importante para a compreensão da estratégia do vegetal na resposta ao estresse (BARREIROS & DAVID, 2006). Os organismos possuem enzimas antioxidantes responsáveis pela defesa orgânica, entre as quais estão a Superóxido Dismutase (SOD), a Catalase (CAT), além da Fosfatase Ácida (ACP), que estão submetidas às alterações cinéticas quando em presença de determinadas substâncias químicas (DUFF et al.; 1994; COLEMAN et al., 1997; TABALDI et al.; 2007).

A descoberta de novos agrotóxicos é de fundamental importância para que estes sejam comercialmente viáveis no controle de pragas, e assim possam ser usados em uma agricultura sustentável. Em muitos casos, a utilização combinada de produtos químicos e controle biológico pode fornecer uma melhor opção para o gerenciamento das populações de pragas, e minimizar a seleção para resistência (GENTZ et al., 2009; CASTLE et al., 2009).

A relevância do presente estudo consiste em conhecer a eficiência da nova classe de inseticida de menor toxicidade ao homem e ao ambiente no controle de pragas do cafeeiro e sua interferência no ambiente e em plantas de café Conilon, através da aplicação foliar ou diretamente no solo. Dessa maneira, é possível avaliar os impactos causados; ferramenta necessária para a tomada de decisão.

O presente trabalho tem como objetivo estudar a eficiência de uma nova mistura de inseticidas, Chlorantraniliprole + Thiamethoxam (Chlo + Thia), no

controle do Bicho-mineiro e compará-lo ao Imidacloprid; no controle da broca-do-café comparando com o Endosulfan, na variedade Conilon (*Coffea canephora*), além de verificar sua interferência em processos enzimáticos e fisiológicos da planta e na microbiota do solo.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Bicho-mineiro – *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville, 1842)

No Brasil, o bicho-mineiro é considerado a principal praga do cafeeiro, devido à ocorrência dessa praga ser generalizada nas lavouras, e pelos prejuízos causados, que podem ultrapassar a 70% da produção (REIS & SOUZA, 1996; SOUZA et al., 1998). Quando adulto, é uma mariposa de pequeno porte, que se apresenta na cor branco-prateada. As fêmeas põem seus ovos na face superior das folhas e apresentam corpo achatado, medindo 4-5 mm de comprimento e 0,75 mm de largura. As larvas penetram no limbo foliar e, ao se alimentarem deste tecido, promovem a formação de lesões ou manchas de cor marrom, conhecidas como “minas”, o que dá origem ao nome de bicho-mineiro, ou minador das folhas (REIS & SOUZA, 1996; MATIELLO et al., 2005).

Os prejuízos mais comuns dessa praga são a redução da área foliar, diminuição da capacidade fotossintética e a queda das folhas. O ataque sempre é maior no terço superior da planta, e em lavouras com espaçamentos mais largos. Dentre as condições favoráveis ao ataque estão a temperatura elevada, a baixa umidade relativa e períodos de estiagem, assim como as características da planta e/ou ao desequilíbrio nutricional (REIS & SOUZA, 1996; MATIELLO et al., 2005). A época mais crítica do ataque compreende o período entre dezembro a abril, porém, devem-se considerar as flutuações populacionais. As medidas de controle são as culturais, biológicas, genéticas ou químicas (REIS & SOUZA, 1996; MATIELLO et al., 2005).

A maior dificuldade no controle do bicho-mineiro é determinar o nível de dano econômico, e as medidas de controle podem ser preventivas e/ou curativa.

Uma das formas preventivas compreende a aplicação via solo de inseticidas ou de misturas de inseticidas + fungicidas no período chuvoso. A forma curativa é realizada por meio de pulverização foliar com inseticidas fosforados ou piretróides, na época seca, que pode resultar em desequilíbrios no agroecossistema e favorecer o ataque de outras pragas (REIS & SOUZA, 1996; MATIELLO et al., 2005).

O controle químico via solo, é considerado de menor toxicidade e os produtos mais utilizados são o Thiamethoxan ou Imidacloprid, princípios ativos do grupo dos neonicotinóides, que conferem maior segurança ao aplicador e ao ambiente. A formulação Granulado Dispersível (WG) desses novos produtos é aplicada no solo, na forma de *drench*, ou seja, via líquida no solo (REIS & SOUZA, 1996; MATIELLO et al., 2005). Além disso, esses inseticidas aplicados no solo, via *drench*, como o thiamethoxan, tem a vantagem de serem compatíveis com microorganismos entomopatogênicos, que tem potencial para serem usados no controle de pragas na cultura do café (ANDALÓ et. al., 2004; BATISTA FILHO et. al., 2001).

A Região Norte do Espírito Santo, de clima quente e seco, é tradicional na produção de café Conilon e as lavouras nesta região são muito atacadas pelo bicho-mineiro durante todo o ano, principalmente nos meses de seca prolongada. Os pesquisadores, Souza et al., (1998) e Gallo et al., (2002), verificaram prejuízos de 30% a 80% na produtividade do café devido ao ataque do bicho-mineiro.

## 2.2 Broca-do-café - *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae)

A Broca-do-café é outra praga importante que ataca tanto frutos dos cafeeiros Arábica (*C. arabica*) como do Conilon (*C. canephora*), e sua infestação ocorre em todos os países onde se cultiva café, independente do estado de maturação dos frutos, se verdes, maduros ou secos (SOUZA & REIS, 1997; REIS & SOUZA, 1998). A broca é um pequeno inseto de cor brilhante escuro,



cujo macho mede entre 1,0-1,25 mm e a fêmea entre 1,4-1,85 mm. No processo de ataque à cultura, é a fêmea fecundada que perfura o fruto na região da coroa. As etapas de infestação consistem na penetração do grão e na deposição dos ovos. As larvas liberadas irão se alimentar das sementes. As fêmeas dessa espécie são as únicas que possuem asas e conseguem alçar vôos mais longos. A broca tem um ciclo de vida que varia de 17 a 46 dias, o qual é influenciado principalmente pela temperatura (SOUZA & REIS, 1997; MATIELLO et al., 2005).

Inicialmente, os prejuízos provocados pela broca-do-café consistem na queda de frutos, na redução do peso das sementes danificadas pelas larvas e, finalmente, pela perda da qualidade dos grãos brocados, onde se inclui o aspecto, o tipo e a bebida que irá originar (SOUZA & REIS, 1997; MATIELLO et al., 2005). Em períodos de elevada infestação, e de acordo com levantamentos realizados no Estado do Espírito Santo, os prejuízos são superiores a R\$ 40 milhões anuais (DE MUNER et al., 2000; FORNAZIER et al., 2000, 2001ab). As infestações de broca em café Conilon observadas em todos os Municípios capixabas eram superiores a 25% após o beneficiamento do café, com a redução da produtividade das lavouras e a qualidade intrínseca dos grãos, o que aumentou sensivelmente a incidência de defeitos e culminou com o lançamento da Campanha Estadual para Manejo da Broca-do-café (SOARES et al., 2001).

Os frutos que permanecem na planta ou mesmo no chão, após a colheita, favorecem a reprodução da praga, facilitando a migração do inseto para a safra seguinte. Outras condições que favorecem a sobrevivência do inseto e infestação futura são o sombreamento e/ou lavouras adensadas, período úmido, lavouras abandonadas, floradas desuniformes e período seco nos meses de dezembro e janeiro. As regiões de temperaturas mais elevadas onde se cultiva a variedade Conilon, possuem outro agravante relacionado à diminuição do ciclo da praga, o que eleva o número de gerações. O resultado observado é ataque mais intenso demandando alguma medida de controle (SOUZA & REIS, 1997; MATIELLO et al., 2005).

A metodologia padronizada para controle da praga consiste em realizar amostragens dos frutos até que o nível de infestação atinja 3 a 5%. A partir daí deve-se iniciar o controle (SOUZA & REIS, 1997; MATIELLO et al., 2005). Apesar da broca-do-café atacar os frutos em todos os estágios de maturação, a perfuração dos mesmos somente é iniciada quando as sementes atingem o teor de umidade adequado à postura dos ovos. Quando os frutos estão muito aquosos, a broca se aloja na região da coroa, porém, não faz galeria. Esse período ocorre entre os meses de outubro e dezembro, e é conhecido como do “trânsito da broca”, importante para o produtor iniciar os procedimentos de amostragem e o cálculo do índice de infestação. Estes procedimentos são fundamentais para o sucesso de medidas de controle (SOUZA & REIS, 1997; SOARES et al., 2001; MATIELLO et al., 2005).

Na prática, a identificação do grau de infestação é muito difícil, devido à distribuição desuniforme da broca nos talhões e nos frutos de uma mesma planta. Entretanto, para as lavouras capixabas, excelentes resultados práticos têm sido obtidos, com a recomendação da amostragem de 50 plantas por talhão, com 100 frutos por planta, sendo 25 de cada face num total de 500 frutos, para talhões de 3.000 a 5.000 plantas (FORNAZIER et al., 2000).

Algumas práticas culturais podem ser estabelecidas com objetivo de evitar a reprodução da broca tais como a colheita bem feita, recolher todos os frutos da planta e do chão, manter a lavoura mais aberta, realizar as podas necessárias e eliminar lavouras abandonadas (SOUZA & REIS, 1997; MATIELLO et al., 2005).

Os danos causados pela broca-do-café provocam prejuízos econômicos que variam de 5% a 25%, podendo chegar até 50% (CÁRDENAS & POSADA, 2001; WEGBE et al., 2003, DURHAM, 2004), e os custos estimados para o seu controle e os prejuízos causados mundialmente são estimados em US\$ 500 milhões anuais (DURHAM, 2004).

O controle químico com uso de inseticidas é bastante eficiente sendo que os produtos registrados mais utilizados são os ativos Endosulfan, do grupo

químico ciclodienoclorado, seguido pelo Clorpirifos, do grupo químico dos organofosforados. Entretanto, o Endosulfan é altamente tóxico à saúde humana e ao ambiente (BRUN et al., 1989; DAMON, 2000; WEGBE et al., 2003) e a resistência ao inseticida por *H. hampei* já foi relatado (BRUN, 1989). Esse produto é proibido em vários países (POSADA & VEGA, 2005).

Outras medidas de controle, como o biológico, podem ser realizadas tanto por insetos como fungos. O fungo *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) tem sido citado como inimigo natural da broca (*H. hampei*) em vários países, principalmente sob condições de alta umidade relativa e sombra (De La ROSA et al., 1997; BUSTILLO, 2005). Pesquisas relacionadas aos materiais genéticos resistentes à broca ainda são incipientes (SOUZA & REIS, 1997; MATIELLO et al., 2005).

### 2.3 Os Agrotóxicos

O Brasil é o maior mercado consumidor de agrotóxicos do mundo (ANDEF, 2010). A crescente demanda por alimentos acompanhada pela explosão demográfica aumentou o uso intensivo dos solos. Inicialmente, o cultivo dos solos era em áreas menores e mais férteis e nas últimas décadas, devido à expansão das fronteiras agrícolas, em áreas maiores e menos férteis. O uso intensivo e continuado do solo favoreceu maior ataque de pragas e doenças o que resultou no aumento do uso de agroquímicos. Nesse contexto, o uso de agrotóxicos deve ser analisado como de potencial risco à saúde humana e ao ambiente, como também de agente potencializador do processo produtivo agrícola (VEIGA, 2007).

Essas substâncias químicas têm a função de bloquear um processo metabólico vital dos organismos (BAIRD, 2002) e o seu uso indiscriminado nas lavouras tem provocado contaminação generalizada (BHANTI & TANEJA, 2007). A maior preocupação dos estudiosos é a contaminação dos corpos hídricos pelos princípios ativos (VEIGA et al., 2006). Ainda que parte desses princípios ativos

possa ser degradado no ambiente, resíduos e subprodutos podem permanecer por muitos anos (VIARENGO et al., 2007).

A aplicação dos inseticidas nas lavouras tem causado sérios danos aos aplicadores de agrotóxicos e ao ambiente (BARBIERI, 2006). Misturas de princípios ativos diferentes prontos ou misturados nas propriedades (inseticidas + fungicidas) podem causar efeitos tóxicos sinérgicos ou antagônicos em diferentes organismos (YADAV et al., 2009). Estes efeitos também estão relacionados ao uso indiscriminado, à elevada toxicidade, pouca informação dos aplicadores sobre o risco à saúde, e são agravados por condições culturais, sociais e econômicas (PERES et al., 2005).

Em resposta às necessidades de alimentos por meio do aumento da população mundial, torna-se importante o desenvolvimento de novos princípios ativos que apresentem alta eficiência e baixa toxicidade, além de baixo poder residual no ambiente, a fim de substituir os atuais de classe toxicológica alta (I) (DU et al., 2007).

O novo princípio ativo Chlorantraniliprole (EPA, 2008), é um inseticida da classe química Diamida Antranílico, registrado com o nome químico 3-Bromo-N-[4-chloro-2-methyl-6-(methylcarbamoyl)phenyl]-1-(3-chloro-2-pyridine-2-yl)-1H-pyrazole-5-carboxamide, com a fórmula  $C_{18}H_{14}N_5O_2BrCl_2$ . O nome é derivado do inseticida natural rianodina, um metabólito da planta *Ryania speciosa*, capaz de interferir no mecanismo de liberação de cálcio nas junções neuromusculares (HUMERICKHOUSE et al., 1993; CORONADO et al., 1994), o que interfere na contração muscular.

Esse novo princípio ativo está registrado em outros países, para 11 grupos de frutas, 12 grupos de frutas de caroço, 4 grupos de legumes, 5 grupos de brássicas, 9 grupos de cucurbitáceas, algodão, uvas, batatas, arroz, ornamentais e gramas (EPA, 2008).

Pela sua eficácia e elevada margem de segurança aos mamíferos, os inseticidas Diamidas pertencem a uma das classes mais promissoras de

inseticidas químicos. Chlorantraniliprole e Flubendiamida são os dois primeiros inseticidas dessa classe, que demonstram atividade sobre ampla gama de pragas da ordem Lepidoptera. A ação química foi testada no controle de insetos via ativação de receptores rianodina (LAHM et al., 2009).

Com relação à sua toxicidade crônica, subcrônica e outros, Chlorantraniliprole é não genotóxico, neurotóxico, imunotóxico, carcinogênico ou teratogênico, e apresenta ainda, mínima toxicidade em mamíferos, mesmo após exposição a longo prazo. O princípio ativo é classificado como de Classe toxicológica IV (pouco tóxico) para todas as rotas de exposição. Apresenta como características químicas e físicas a fórmula molecular:  $C_{18}H_{14}BrCl_2N_5O_2$ , solubilidade na água: 1,0 mg/L (20°C) e densidade: 1,51 g/mL (20°C) (EPA, 2008; LAHM et al., 2009). A mistura de Chlorantraniliprole + Thiamethoxan não tem registro comercial ainda no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Os inseticidas neonicotinóides, como o Thiamethoxan e Imidacloprid, são compostos orgânicos sintéticos, pertencem a uma classe relativamente nova de inseticidas e muito utilizados no controle de insetos sugadores. Essas substâncias representam 17% do mercado mundial de inseticidas (JESCHKE & NAUEN, 2008) e age no sistema nervoso central bloqueando as vias neuronais nicotinérgicas, o que causa acúmulo do neurotransmissor acetilcolina (YAMAMOTO & CASIDA, 1999).

Outro aspecto importante a ser considerado em relação aos agrotóxicos, são os resíduos presentes nas plantas, nos animais e nos alimentos. Especificamente em relação ao Endosulfan, resíduos foram também encontrados na atmosfera, no solo, nos sedimentos, em águas superficiais e nos alimentos (U.S.,1990). Resíduos de Endosulfan representam uma ameaça ao ambiente devido à sua toxicidade para a biota aquática, onde invertebrados e peixes são particularmente sensíveis (LEONARD et al., 2001; HOSE et al., 2003b).

A maioria dos agrotóxicos lançados recentemente no mercado apresenta maior concentração de princípio ativo/kg ou Litros de produto, o que reduziu o seu peso e volume, facilitando a embalagem, o transporte e o armazenamento. Porém, a necessidade de utilização por parte do agricultor de doses menores, como recomendado na bula, o fez duvidar da eficiência do produto, e no momento da aplicação é muito comum o processo de “dobrar a dose”.

#### 2.4 Características Fisiológicas

A fotossíntese é um processo importante nos vegetais, e faz a ligação entre o ambiente externo e interno da planta. Este processo pode ser avaliado qualitativamente e quantitativamente por meio da absorção e do aproveitamento da energia luminosa pelo aparelho fotossintético, o que possibilita o estudo de características relacionadas à capacidade de absorção e transferência dessa energia na cadeia transportadora de elétrons (KRAUSE & WEIS, 1991).

No cafeeiro, como na maioria das plantas  $C_3$ , a fotossíntese é saturada com 1/3 da irradiância máxima incidente sobre a copa, o que corresponde a 600-700  $\mu\text{mol}$  (fótons)  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  nas folhas expostas a luz (DaMATTA & MAESTRI, 1997). Do total de energia solar incidente sobre a superfície foliar apenas 5% é utilizado na formação Adenosina Trifosfato (ATP), Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato desidrogenase (NADPH) para a síntese de carboidratos (TAIZ & ZEIGER, 2009).

Conforme Carelli et al., (1999), não existem diferenças na Taxa Fotossintética Líquida Instantânea ( $A$ ) e Condutância Estomática ( $g_s$ ) entre as espécies arábica e robusta (Conilon), quando expostas a pleno sol ou com sombreamento artificial de 50%. Entretanto, foi observada uma redução significativa de  $A$  e  $g_s$  quando ambas as espécies foram cultivadas a 80% de sombra.

O cafeeiro apresenta baixas taxas fotossintéticas (ARAÚJO et al., 2008; CHAVES et al., 2008; DaMATTA et al., 2008) e, as máximas registradas situam-se na faixa de 7 a 12  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , porém, mais freqüentemente, esses valores concentram-se em torno de 4 - 5  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (DaMATTA et al., 2007), e indica que tanto o café arábica quanto o café Conilon apresentam baixa eficiência fotossintética quando comparado à maioria das plantas lenhosas (CANNELL, 1985). No entanto, a capacidade fotossintética (fotossíntese potencial) sob luz e  $\text{CO}_2$  saturantes e à temperatura ótima entre (25–30 °C), chega alcançar valores da ordem de 30 a 35  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (DaMATTA et al., 1997; CAMPOSTRINI & MAESTRI, 1998; DaMATTA et al., 2001). A pleno sol, há considerável flutuação diurna da taxa fotossintética líquida do carbono ( $A$ ), cujos valores tendem a ser máximos no início da manhã, podendo alcançar valores menores à tarde. De fato, em vários estudos realizados em Viçosa (ARAÚJO et al., 2008; CHAVES et al., 2008; DaMATTA et al., 2008), os decréscimos de  $A$ , no período da tarde, foram fundamentalmente governados pelas limitações difusivas à fotossíntese.

A temperatura exerce também influência direta na fisiologia do cafeeiro, conforme Kumar & Tieszen (1980) que observaram reduções em  $A$  em temperaturas acima de 25°C, apesar de a condutância permanecer constante entre 25-35°C, o que explica a maior diferença no crescimento vegetativo no verão, quando comparado ao inverno (SILVA et al., 2000). Por outro lado, a umidade relativa induz diferenças entre os valores elevados de  $g_s$  observados pela manhã, enquanto que essa diferença observada ao meio-dia é reduzida (GUTIE'RREZ et al., 1994). Esses resultados apresentaram relação direta com a secura do ar, que quando elevada, induzia a redução de  $g_s$  (TESHA & KUMAR, 1978; FANJUL et al., 1985; NUNES, 1988; HERNÁNDEZ et al., 1989; KANECHI et al., 1995, BARROS et al., 1997).

Em relação à espécie arábica, a maior freqüência estomática do café robusta (Conilon) foi demonstrada por Franco (1939); Williams, (1972); Voltan et al., (1992); DaMatta et al., (1997a), Carvalho et al., (2001) , apesar de apresentar aparentemente, menor sensibilidade estomática (FAHL et al., 2001). Em ambas as espécies, o fechamento estomático é indicado pelo déficit hídrico

(DaMATTA, 2004a; 2004b ), e a redução da disponibilidade de água diminui a condutância estomática ( $g_s$ ) (PINHEIRO et al., 2005).

Clones de café Conilon, sob estresse hídrico, apresentam rápida recuperação (1-2 dias) da hidratação foliar e da condutância estomática após ser irrigados, o que permite seu rápido restabelecimento do crescimento e desenvolvimento da copa do café após períodos prolongados de seca, o que atesta seu alto grau de tolerância à seca (DaMATTA & RENA, 2001; DaMATTA & RAMALHO, 2006).

Campostrini & Maestri (1998), verificaram que as diferenças de produtividade em cinco clones de café Conilon não eram em função da capacidade fotossintética, do rendimento quântico de folhas isoladas, nas diferenças na concentração de pigmentos cloroplastídicos. DaMatta et al., (2000), demonstraram que diferenças na produtividade dos clones estariam associadas mais diretamente à manutenção de uma área foliar sadia, com uma boa arquitetura de copa, responsáveis pelo aumento das trocas gasosas.

Para muitas espécies cultivadas em estufas, sob condições ótimas de nutrientes e água, ocorre um aumento na produtividade devido a uma maior concentração do dióxido de carbono em relação aos níveis atmosféricos naturais (TAIZ & ZEIGER, 2009). Plantas  $C_3$ , como o café, têm o ponto de compensação do  $CO_2$  mais elevado, indicador de maior capacidade de se beneficiar dos aumentos atuais nas concentrações do  $CO_2$  na atmosfera (LARCHER, 2000). Plantas podem respirar mais de 50% da produtividade fotossintética diária, e muitos fatores podem afetar a taxa respiratória, como a natureza e a idade do tecido vegetal, assim como fatores ambientais, como a luz, a concentração de oxigênio, a temperatura e a concentração de  $CO_2$  (TAIZ & ZEIGER, 2009).

Plantas de café podem ser cultivadas em baixa intensidade de luz (sombreadas), pois apresentam baixa irradiância de saturação, com variação de 300 a 600  $\mu mol m^{-2}.s^{-1}$  (KUMAR & TIESZEN, 1980; FAHL et al., 1994). Por outro lado, altas taxas fotossintéticas em café ocorrem sob moderada irradiância, com valores entre 1200-1300  $\mu mol m^{-2}.s^{-1}$  que não provocam



danos ao aparelho fotossintético, enquanto que radiações superiores a  $2200 \geq \mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , podem induzir à fotoinibição, o que é comum no verão (NUNES et al., 1993).

## 2.5 Biomarcadores

As espécies Reativas de Oxigênio (ROS), como o radical superóxido ( $\text{O}^{2-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ) e oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ), são produtos gerados normalmente pelo metabolismo celular. Os cloroplastos produzem o radical superóxido por Fotorredução de  $\text{O}_2$  no Fotossistema I (PSI) e Fotossistema II (PSII). O oxigênio singleto se forma pela transferência de energia para  $\text{O}_2$ , a partir do estado excitado da clorofila (NIYOGI, 1999). Peróxido de hidrogênio pode ser gerado pela síntese espontânea e ação enzimática. Estas ROS podem atacar membranas, proteínas e ácidos nucleicos causando peroxidação lipídica, desnaturação de proteínas e mutação do Ácido desoxirribonucléico (DNA) (BOWLER et al., 1992; NIYOGI, 1999). A instalação do efeito de estresse oxidativo ocorre quando a produção destas espécies ultrapassa a capacidade do organismo em neutralizar sua ação. Para evitar que ocorra danificação dos componentes celulares, a célula possui as defesas, constituídos por mecanismos enzimáticos, incluindo Superóxido dismutase, Catalase, Glutaciona peroxidase (GSH-Px) e não-enzimáticos como moléculas de baixo peso molecular que incluem a Glutaciona reduzida (GSH), ácido ascórbico e vitamina E (SIES, 1993; NIYOGI, 1999; SIES, 1991; MITTLER, 2002; FATTMAN et al., 2003; SUN e ZHOU, 2008).

As plantas apresentam várias fontes potenciais de geração de ROS. Algumas são resultantes de reações que ocorrem no metabolismo normal, como a fotossíntese e a respiração, enquanto que outras são originadas por estresses abióticos, por meio da fotorrespiração (ASADA & TAKAHASHI, 1987).

Sob condições normais de crescimento, a produção de Espécies Reativas de Oxigênio Intermediários (ROIs) em células é bem reduzida. Muitos fatores podem perturbar a homeostase celular aumentando a produção de ROIs

(POLLE, 2001), como o estresse hídrico e salino, frio, choque térmico, metais pesados, radiação ultravioleta, poluentes atmosféricos, estresse mecânico, deficiência mineral, ataque de patógenos e alta intensidade luminosa (DAT et al., 2000).

Essas defesas celulares podem ser utilizadas como biomarcadores, ferramenta importante na avaliação da toxicidade de compostos químicos ou situações às quais são expostos os vegetais. A caracterização do estresse e seus efeitos consideram as variações de tempo de exposição x concentração do agente (VIARENGO et al., 2007).

A função da SOD nas plantas deve dispensar atenção especial, uma vez que as ROS podem ser geradas por muitas condições de estresse ambiental como frio, calor, seca, salinidade, excesso de umidade, ataque de patógenos e ainda os agrotóxicos (BOWLER et al., 1992). Os efeitos negativos do estresse nas folhas, em nível molecular, pode ter como resultado o desequilíbrio entre a produção das ROS e as defesas antioxidantes.

A Catalase desempenha um papel importante na decomposição de  $H_2O_2$  gerado pela fotorespiração, e se expressa facilmente nas folhas dos vegetais, protegendo assim as células do efeito nocivo do acúmulo do superóxido. Há provas claras de que a Catalase existe em várias formas e pode ter alterações, com funções metabólicas diferentes, como as condições ambientais de estresse, principalmente pela luz e temperatura (DAT et al., 2000).

A Catalase (CAT) e a Glutathione (GS) são exemplos de dois importantes antioxidantes que desempenham a função de proteção de células vegetais do estresse oxidativo. No vegetal, a CAT é uma das enzimas mais potentes, responsável pela conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. (KNEER & ZENK, 1992; GRATÃO et al., 2005). Entretanto, Kertulis-Tartar et al., (2009), sugerem que a enzima pode ser importante na acumulação de arsênio pela *Pteris vittata*, devido à capacidade da espécie tolerar níveis elevados do metal.

As Fosfatases ácidas (ACP) são enzimas que catalisam a hidrólise de mono-ésteres de fosfato, e apresentam pH ótimo geralmente, abaixo de 6,0 (VINCENT et al., 1992). São enzimas amplamente distribuídas na natureza, e ocorrem em tecidos de mamíferos, microrganismos e plantas. Particularmente, em plantas, as fosfatases ácidas têm sido relatadas em tecidos dos bulbos (GUO & PESACRETA, 1997; SHINAMO et al., 2001), raízes (ZHANG & McMANUS, 2000), tubérculos (GELLATLY et al., 1994), sementes (FERREIRA et al., 1998; GRANJEIRO et al., 1999) e folhas (STASWICK et al., 1994).

A ACP desempenha muitas funções importantes em plantas, entre as quais a liberação de fosfato inorgânico no ambiente (DUFF et al., 1994), mecanismo vital para a transferência de energia e da regulação metabólica, além de ser integrante de fosfolípidios, proteínas e ácidos nucléicos, macromoléculas constituintes da estrutura celular. Conforme Dos Prazeres et al., (2004), o aparecimento da fosfatase ácida coincidiu com a diminuição do teor de fosfato inorgânico durante a germinação de sementes de soja. Os autores observaram ainda que durante o mesmo período o teor de proteína aumentou até o quinto dia do experimento, houve redução até o oitavo dia, e manteve-se constante após este período.

Em sementes de milho, o aumento da atividade da ACP foi evidenciado quando em deficiência de fósforo (FRIES et al., 1992), o que demonstra a função chave da enzima na mobilização desse nutriente em plantas. Alterações nas condições de germinação de sementes, provocadas pela presença de herbicidas, inseticidas e fatores ambientais, induzem alterações na atividade da ACP, o que pode ser associado às mudanças no processo de germinação, afetando a produtividade, e o capacita a ser utilizada como biomarcador (GRANJEIRO et al., 2008).

## 2.6 População Microbiana nos Solos

Os microorganismos no solo apresentam versatilidade metabólica e toleram condições ambientais desfavoráveis, além de estar sujeitos à dispersão por vários meios como a água, o vento, os animais, entre outros. No solo, a diversidade e a densidade microbiológica e suas funções, se relacionam com as características intrínsecas desse *habitat* (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Os fatores ambientais como temperatura e umidade, acrescidos aos do solo como: nutrientes, pH, matéria orgânica, textura, densidade, oxigênio, exercem influência, tanto na presença como na sobrevivência dos microorganismos (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Em um microambiente do solo, tanto a disponibilidade como a atividade da água depende das interações entre conteúdo de água, temperatura e natureza do ambiente coloidal (RAÍ & SRIVASTAVA, 1981; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Compostos ou elementos tóxicos (agrotóxicos, metais pesados) adicionados ao solo, por meio de diversas atividades antrópicas (agrícolas, industriais, mineradoras) podem prejudicar os microorganismos presentes nesses ambientes, e desta maneira torna-se importante ferramenta em estudos de avaliação da qualidade dos solos quando impactados (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Os efeitos nocivos da poluição dos agrotóxicos no solo ocorrem diretamente quando aplicados sobre a superfície ou, indiretamente quando aplicados sobre as plantas ou por dispersão aérea. Uma vez presentes no solo, podem ser adsorvidos pelos colóides, ser lixiviados, volatilizados ou sofrerem processos de degradação (SCHROLL et al., 1992), além de alterações que determinam a dissipação ou a persistência, o que pode provocar a impactação dos ecossistemas (LAVORENTI et al., 2003; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Nas regiões de cafeicultura brasileira, a aplicação de inseticidas no solo é uma prática comum, ficando estes disponíveis para os processos de absorção pelas raízes, adsorção nos colóides do solo, degradação microbiana, lixiviação, entre

outros (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006) o que reduz seus efeitos sobre os microorganismos.

As condições de clima tropical como a elevada radiação solar, as temperaturas e as precipitações aumentam a taxa de degradação dos resíduos e a mobilidade dos inseticidas no solo (SCHROLL, 1992). As fortes chuvas durante os meses de outubro a março provocam erosão (BERTONI & LOMBARDI-NETO, 1993), responsável pela mobilização dos agrotóxicos da superfície do solo pelo escoamento superficial, pela água e ou ligados aos colóides, o que resulta em um dos principais problemas de contaminação de rios e lagos (GAYNOR et al., 1992; LERCH & BLANCHARD, 2003). Fatores como o tipo de solo, a declividade, a cobertura, a umidade do solo, as propriedades dos agrotóxicos e as práticas culturais influenciam diretamente esses processos (PATTY et al., 1997).

O inseticida Thiamethoxan, da classe dos neonicotinóides, tem uma meia-vida em torno de 50 dias, sob condições de fotodegradação. Estudos no solo demonstraram elevada estabilidade, baixa adsorção, alto potencial de lixiviação, o que o caracteriza como um contaminante potencial da água do subsolo (ANTUNES-KENYON & KENNEDY, 2001; URZEDO et al., 2006).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a ação da nova mistura de Chlorantraniliprole + Thiamethoxan (Mistura: CGA293343/SYN545170 SC (100/200) - no controle do bicho-mineiro e compará-lo ao Imidacloprid; no controle da broca-do-café comparando com o Endosulfan, na variedade Conilon (*Coffea canephora*), além de verificar sua interferência em processos enzimáticos e fisiológicos da planta e na microbiota do solo.

### 3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da mistura Chlo + Thia na dose de 0,75 no controle do bicho-mineiro e comparar os resultados com o Imidacloprid na dose de 1,0 kg/ha;
- Avaliar as concentrações de 0,25; 0,50, 0,75 e 1,0 L/ha da mistura (1:2) de Chlo + Thia (Chlo + Thia) no controle da broca-do-café e comparar com o tratamento Endosulfan (padrão) na dose 2,0 L/ha;
- Avaliar o efeito do Chlo + Thia na dose de 0,75 L/ha e do Imidacloprid na dose de 1,0 kg/ha na microbiota do solo;
- Avaliar o efeito das concentrações dos inseticidas aplicados na folha (F) como no solo (S), sobre a atividade enzimática foliar da SOD, CAT e ACP;
- Caracterizar as possíveis alterações na  $A$ ,  $g_s$ ,  $E$ ,  $F_v/F_m$  e nos Centros de reação ativos ( $RC/CS_0$ ) e de crescimento, em mudas de café Conilon variedade Vitória, clone 02, expostos aos inseticidas.
- Isolar e identificar fungos importantes para a cultura do café;

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Área de Estudo do Bicho-Mineiro

A área escolhida para o desenvolvimento do projeto relativo ao Bicho-mineiro, foi a “Fazenda Porto Coqueiro (20° 39' 48,5”S e 40° 43' 34,7” W), propriedade particular, localizada no município de Anchieta, ES, a 58 metros de altitude (Figura 1). A área total da fazenda é de 175 hectares, dos quais, 20,0 ha são utilizados no cultivo do café Conilon, plantas produzidas por sementes. O cafezal tem 15 anos de idade, apresenta-se com espaçamento de 3,0 metros entre linhas e 2,0 metros entre plantas e com um total de 1667 plantas/ha. O inseticida usado foi a mistura do Chlorantraniliprole e Thiamethoxan (Chlo +

Thia), na proporção de 1:2 de princípio ativo, para o controle de bicho-mineiro, que foi comparado com o inseticida Imidacloprid. O delineamento experimental consistiu de blocos ao acaso, onde foram realizados 03 tratamentos com 04 repetições, contendo 10 plantas por parcela. A descrição dos tratamentos, princípios ativos e doses, está na Tabela 1. Os inseticidas usados estão no Anexo 1.

Tabela 1- Identificação dos tratamentos, princípios ativos e doses utilizadas no controle do Bicho-mineiro em café Conilon, Anchieta, ES

Tratamentos	Princípios Ativos	Dose (L ou kg/ha)
Controle	-	-
T1=(Chlo + Thia)	Chlorantraniliprole + Thiamethoxan	0,75 L
T2=Imidacloprid	Imidacloprid	1,00 kg



Figura 1. Área de estudo do Bicho-mineiro.



Figura 2. Aplicação dos inseticidas no solo via *drench* (A) e determinação do índice pluviométrico (B) em lavoura de café Conilon no controle do Bicho-mineiro em Anchieta, ES.

A aplicação dos inseticidas foi realizada no solo via *drench* no período da manhã (Figura 02-A) em fevereiro/2009, com volume de 0,50 L/planta em 0,5 m<sup>2</sup>/planta, utilizando-se de um regador manual de jardim. O volume foi cinco vezes maior que o recomendado. A aplicação foi realizada somente do lado direito das plantas e galhos e folhas foram removidos de forma a permitir maior contato da solução com o solo. A topografia da área é plana. Para os três tratamentos foram realizadas coletas de solo para a avaliação da sua microbiota, e foram realizadas em intervalos de 0 (antes da aplicação), 3, 6, 9, 12, 24, 60 e 120 dias após aplicação. A determinação do índice pluviométrico (Figura 02- B) foi ao longo de todo o experimento.

A amostragem do solo foi realizada em profundidade de 0 a 20 cm, com coleta de 1,0 kg/parcela, a fim de caracterizar possíveis alterações na microbiota. As avaliações do bicho-mineiro foram realizadas mensalmente, entre o mês de março a outubro/2009. A coleta das folhas foi realizada entre o segundo e o quinto par de folhas dos terços médio e superior das plantas, com um total de cem folhas por parcela para os três tratamentos. O índice de ataque foi calculado pelo percentual de folhas minadas com presença de lagartas vivas.



Para determinação das características químicas e granulométricas, foi realizada amostragem do solo na área de estudo do bicho-mineiro, com trado tipo “sonda terra” na camada de 0-20 cm. As análises foram realizadas no laboratório do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER). A análise granulométrica está na Tabela 2 e as características químicas do solo estão na Tabela 3.

Tabela 2- Análise granulométrica do solo na área de estudo do Bicho-mineiro em Anchieta, ES

Registro	Ident. amostra	Areia Grossa (%)	Areia Fina (%)	Silte (%)	Argila (%)	Classificação Textural
27P3/09	01	31	9	12	48	Argiloso

Tabela 3- Características químicas do solo na área de estudo do Bicho-mineiro em Anchieta, ES

Ref. Lab.	pH H <sub>2</sub> O	P mg/dm <sup>3</sup>	K mg/dm <sup>3</sup>	Na mg/dm <sup>3</sup>	Ca <sup>2+</sup> cmolc/dm <sup>3</sup>	Mg <sup>2+</sup> cmolc/dm <sup>3</sup>	Al <sup>3+</sup> cmolc/dm <sup>3</sup>	H + Al cmolc/dm <sup>3</sup>
390	5,7	3,9	57	32	3,43	1,6	0,01	2,6

Ref. Lab.	SB cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>	(t) cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>	(T) cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>	V %	m %	ISNa %	M.O dag/Kg	Zn mg/dm <sup>3</sup>	Fe mg/dm <sup>3</sup>	Mn mg/dm <sup>3</sup>	Cu mg/dm <sup>3</sup>	B mg/dm <sup>3</sup>
390	5,3	5,3	7,9	67	0	2,6	3,29	4	66	13	0	0,3

pH em água – relação 1:2,5

Ca- Mg – Al – Extrator KCl – 1 mol/L

H + Al – Extrator = SMP

B- Extrator água quente

SB = Soma de Bases

ISNa- Índice de Saturação de Sódio

CTC (t)- Capacidade de Troca Catiônica Efetiva

CTC (T)- Capacidade de Troca Catiônica a pH 7,0

P- Na- K- Fe- Zn- Mn- Cu –Extrator Melich 1

V= Índice de Saturação de Bases

m= Índice de Saturação de Alumínio

Matéria Orgânica (MO) – (C.org x 1,724)

## 4.2 Área de Estudo da Broca-do-Café

A área definida para o estudo do controle da Broca-do-café foi uma propriedade particular localizada em Bom Retiro (20<sup>o</sup> 36' 39,4" S e 40<sup>o</sup> 50' 19,1" W), município de Alfredo Chaves, ES (Figura 03), situada a 429 metros de altitude. A lavoura de café Conilon é tradicional de mudas produzidas por sementes e está implantada em um espaçamento de 2,0 x 1,5 metros, com uma população de 3.333 plantas/ha e com idade de 12 anos. O delineamento experimental consistiu de blocos ao acaso, com 6 tratamentos e quatro repetições, com 10 plantas por parcela. A descrição dos tratamentos, princípios ativos e doses, está na Tabela 4.

As aplicações foram realizadas por meio de pulverizador costal motorizado (Figura 04-A), marca Guarany, com volume de 550 L/ha de calda, nos meses de abril/2009 e maio/2009, em intervalos de 30 dias, no total de duas aplicações, deixando-se uma linha de bordadura entre os blocos. A metodologia consistiu em aplicar os inseticidas quando a infestação de frutos era de 3 a 5% na área de amostragem (FORNAZIER et al., 2000). As avaliações foram realizadas em 8 plantas da parcela (Figura 04-B).

Tabela 4- Identificação dos tratamentos, princípios ativos e doses utilizadas no controle da broca-do-café em café Conilon, Alfredo Chaves, ES

Tratamentos	Princípios Ativos	Dose (L/ha)
Controle	-	-
T1=(Chlo + Thia)	Chlorantraniliprole + Thiamethoxan	0,25
T2=(Chlo + Thia)	Chlorantraniliprole + Thiamethoxan	0,50
T3=(Chlo + Thia)	Chlorantraniliprole + Thiamethoxan	0,75
T4=(Chlo + Thia)	Chlorantraniliprole + Thiamethoxan	1,00
T5=Endosulfan	Endosulfan	2,00

A primeira avaliação da eficiência dos tratamentos foi realizada 15 e 30 dias após a segunda pulverização, realizadas em maio/2009 e junho/2009, respectivamente. Os frutos broqueados, no total de 50 unidades/parcela, foram

coletados de forma aleatória por parcela de 8 plantas, e em seguida etiquetados e levados para laboratório. Cada fruto foi aberto na região da coroa lateralmente com auxílio de um canivete e para identificação do parâmetro observado, conforme a Tabela 5, utilizando-se de um microscópio estereoscópico de duzentas vezes de aumento (SOUZA et al., 2008).

Foram observadas e contadas as fases vivas e mortas da broca, assim como as galerias abandonadas, como resultado da intoxicação da fêmea da broca na região da coroa e que depois podem abandonar o fruto para morrer fora dele, normalmente no chão, no caso dos tratamentos com inseticida. Para os frutos do café das plantas controle, sem aplicação dos inseticidas, as galerias abandonadas são resultantes da perfuração do fruto pela fêmea da broca, que depois o abandona e voa para perfurar outros frutos, instinto desse inseto. Após a identificação das fases da broca, vivas e mortas e galerias abandonadas nos 50 frutos broqueados de cada parcela, calculou-se a porcentagem de mortalidade para cada tratamento. Para o cálculo, as galerias abandonadas nos frutos broqueados, foram consideradas também; já que em cada fruto, teoricamente continha, um adulto fêmea da broca, que após a aplicação dos inseticidas por contato, se intoxica e o abandona para morrer fora do fruto. Das galerias abandonadas encontradas nos frutos broqueados dos tratamentos, foram descontadas as galerias abandonadas dos frutos broqueados das plantas controle, como pode ocorrer na prática no ato do ataque do adulto fêmea da broca, que pode perfurar e abandonar os frutos, sem neles ovopositar (SOUZA et al., 2008). As porcentagens de eficiência dos tratamentos em relação às plantas controle foram calculadas pela fórmula de Abbott (1925).



Figura 3. Área de estudo da Broca-do-café.



Figura 4. Aplicação dos inseticidas via foliar (A) com pulverizador costal motorizado e amostragem dos frutos (B) para determinação do índice de infestação da Broca-do-café em lavoura adulta de café Conilon, Alfredo Chaves, ES.

Tabela 5 – Identificação dos tratamentos, parâmetros observados (fases da broca) e o total de frutos broqueados para cada fase e por repetição pela abertura dos frutos broqueados em laboratório, sob microscópio estereoscópico

Tratamento		Total de frutos broqueados abertos/repetição			
Nº: ___	Parâmetros observados				
Item		I	II	III	IV
1	Galeria abandonada	-	-	-	-
2	Adulto morto s/ovos	-	-	-	-
3	Adulto morto c/ovos	-	-	-	-
4	Adulto morto c/fungos	-	-	-	-
5	Adulto vivo s/ovos	-	-	-	-
6	Adulto vivo c/ovos	-	-	-	-
7	Adulto vivo c/larvas	-	-	-	-
8	Adulto vivo c/ovos e larvas	-	-	-	-
9	Adulto vivo c/larvas e pupas	-	-	-	-
10	Adulto vivo c/larvas, pupas e adulto marrom	-	-	-	-
11	Sem adulto c/ovos	-	-	-	-
Total de frutos broqueados abertos		-	-	-	-

A segunda avaliação foi realizada na ocasião da colheita do café. Amostras das parcelas foram colhidas, secadas ao sol até atingirem teor de umidade de 12%, após o qual, foram beneficiadas. Para a determinação do percentual de grãos brocados, foram realizadas 8 amostragens de 100 grãos para cada parcela e classificados segundo tabela brasileira oficial (PAULINI & PAULINO,1979).

### 4.3 Estudo das Trocas Gasosas, Eficiência Fotoquímica e da Atividade Enzimática

#### 4.3.1 Área e condições de Cultivo

Os estudos foram realizados em estufa no Sítio Santa Maria (20<sup>o</sup> 26' 33,8" S e 40<sup>o</sup> 46' 47,1" W), localizado no município de Marechal Floriano, ES, a 720 metros de altitude. As plantas utilizadas foram café Conilon, variedade Vitória, Clone 2, obtidas do Viveiro Ipiranga em abril/2009, Linhares, ES; até então mantidos em viveiro com 50% de sombreamento. Esse clone, é um dos treze que compõem a Variedade Vitória – Incaper 8142, de propagação Clonal lançado pelo INCAPER em 2004 (FONSECA et al., 2004c). Essa variedade apresenta alta produtividade, estabilidade de produção, tolerância à seca e a ferrugem, uniformidade de maturação (maio a julho) e grãos grandes.

As mudas foram transplantadas imediatamente para vasos de capacidade de 5,0 L, em substrato composto por terra de barranco contendo 1,0 Kg de calcário dolomítico e 2,0 Kg de superfosfato simples pó/m<sup>3</sup>. As mudas foram alocadas em estufa, separadas em blocos de 05 indivíduos e regadas manualmente com mangueira de jardim. A temperatura do ambiente foi mantida entre 15,4 e 31,1°C, e as mudas tratadas segundo recomendações técnicas para cultivo de mudas do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). As avaliações foram realizadas aos 07 meses após o transplântio das mudas (novembro/2009).

#### 4.3.2 Análises Biométricas

A altura da planta foi determinada entre a região do colo e a gema apical com auxílio de uma régua milimetrada. O diâmetro do caule foi determinado próximo a região do colo com a utilização de um paquímetro. O número de folhas foi estabelecido pela quantidade daquelas que apresentaram tamanho maior do que 8 cm de comprimento. Essas avaliações foram realizadas no início e no final da parte experimental.

A área foliar foi determinada no final do experimento. As folhas foram retiradas, contadas, fotografadas sobre papel branco com escala, e a avaliação da área foliar total em cm<sup>2</sup>, foi realizada por meio do programa Image Tool.

#### 4.3.3 Aplicação dos Inseticidas

Amostras das novas formulações dos inseticidas foram utilizadas para aplicação foliar e via solo. Para aplicação via foliar (Figura 5-A), os tratamentos, princípios ativos e doses, estão na Tabela 6. Foi utilizado um volume de calda de 550 L/ha, semelhantes àqueles realizados, em campo, para o controle da broca. O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, com 5 repetições, com uma planta por parcela.



Figura 5. Aplicação dos inseticidas na Folha (A) com pulverizador manual de jardim e no solo via *drench* (B), em plantas de café Conilon, variedade Vitória, clone 02, em estufa, Marechal Floriano, ES.

Para aplicação via *drench* (Figura 5-B), os tratamentos, princípios ativos e doses, estão na Tabela 7. O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, com 5 repetições, com uma planta por parcela. Cada planta recebeu 50 mL de calda, calculados de acordo com os volumes utilizados em campo para o controle do bicho-mineiro.

Tabela 6- Identificação dos tratamentos, princípios ativos e doses utilizadas via foliar em plantas de café Conilon, variedade Vitória, Clone 2, em estufa no estudo das Trocas Gasosas, Eficiência Fotoquímica e da Atividade Enzimática, em Marechal Floriano, ES

Tratamentos	Princípios Ativos	Dose (L/ha)
Controle	-	-
T1=(Chlo + Thia)	Chlorantraniliprole + Thiamethoxan	0,25
T2=(Chlo + Thia)	Chlorantraniliprole + Thiamethoxan	0,50
T3=(Chlo + Thia)	Chlorantraniliprole + Thiamethoxan	0,75
T4=(Chlo + Thia)	Chlorantraniliprole + Thiamethoxan	1,00
T5=Endosulfan	Endosulfan	2,00
T6=(Chlo + Thia)	Chlorantraniliprole + Thiamethoxan	2,00
T7=Endosulfan	Endosulfan	4,00

Amostra do solo, coletado com auxílio de trado “sonda terra” e amostra de folhas foram realizadas no laboratório da fundação Norte Fluminense de desenvolvimento Regional (FUNDENOR) do Departamento de Produção Vegetal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (Uenf). As características químicas do substrato estão na Tabela 8 e as das folhas estão na Tabela 9.

Tabela 7- Identificação dos tratamentos, princípios ativos e doses utilizadas via *drench* em plantas de café Conilon, variedade Vitória, Clone 2, em estufa, no estudo das Trocas Gasosas, Eficiência Fotoquímica e da Atividade Enzimática, Marechal Floriano, ES

Tratamentos	Princípios Ativos	Dose (L ou kg/ha)
Controle	-	-
T1=(Chlo + Thia)	Chlorantraniliprole + Thiamethoxan	0,75
T2=Imidacloprid	Imidacloprid	1,00
T3=(Chlo + Thia)	Chlorantraniliprole + Thiamethoxan	1,50
T4=Imidacloprid	Imidacloprid	2,00



Tabela 8- Características químicas do substrato utilizado no plantio das mudas de café Conilon, Clone 02, Marechal Floriano, ES

Ident.	pH	S-SO <sub>4</sub>	P	K	Ca	Mg	Al	H + Al	Na	C	MO
	H <sub>2</sub> O	mg/dm <sup>3</sup>	mg/dm <sup>3</sup>	mmol/dm <sup>3</sup>							
1	5	160	54	3,1	41	7,3	2,1	57,9	0,6	30,7	52,93

Ident.	CTC	SB	V	m	ISNa	Fe	Cu	Zn	Mn	B
	mmol/dm <sup>3</sup>		(%)	(%)	(%)	mg/dm <sup>3</sup>				
1	109,9	52	47	4	1	78,8	0,43	2,97	22,89	0,51

pH em água – relação 1:2,5

Ca- Mg – Al – Extrator KCl – 1 mol/L

H + Al – Extrator = SMP

B- Extrator água quente

SB = soma de bases

S- Extrator – Fosfato monocálcio

ISNa- Índice de Saturação de Sódio

CTC (t)- Capacidade de Troca Catiônica Efetiva

CTC (T)- Capacidade de Troca Catiônica a pH 7,0

P- Na- K- Fe- Zn- Mn- Cu –Extrator Melich 1

V= Índice de Saturação de Bases

m= Índice de Saturação de Alumínio

Matéria Orgânica (MO) – (C.org x 1,724)

Tabela 9- Análise foliar de macro e micronutrientes das plantas de café Conilon, clone 02, Marechal Floriano, ES

	N	S	P	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Zn	Mn	B
	g/Kg						(mg/dm <sup>3</sup> )				
OBJETIVO	27	2,4	1,2	21	14	3,2	131	11	12	69	48
SIT. ATUAL	27,9	2,4	2,1	22,6	13,9	2,5	220	18	14	104	29

#### 4.3.4 Trocas Gasosas e Eficiência Fotoquímica

Antes de iniciar as análises, procedeu-se a medição da intensidade luminosa com o aparelho Sistema Portátil de Medição das Trocas Gasosas, modelo LI-6200, LI-COR, Lincoln, NE, USA. Os valores na área externa da estufa chegaram 2.000 ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) enquanto no seu interior o valor obtido foi de 1.400 ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), determinada às 14:00 horas, ou seja, com 70% do Fluxo de Fótons Fotossintéticos (FFF). Os dados da Temperatura (T) e da Umidade

Relativa (UR) em percentagem (%) foram determinados em intervalos de cinco minutos com o auxílio de Data logger no interior da estufa. O Déficit de Pressão de Vapor (DPV) em quilopascal (kPa) no momento da medição das trocas gasosas nos quatro dias da avaliação, são apresentados na Figura 6.

#### 4.3.4.1 Trocas Gasosas

A Taxa Fotossintética Líquida ( $A$ ), a Condutância Estomática ( $g_s$ ) e a Transpiração ( $E$ ) foram determinadas de 7:00 às 9:00 horas da manhã (Figura 07-A) e de 12:00 às 14:00 horas da tarde, no 2º par de folhas totalmente expandidas dos ramos contadas a partir do ápice. Para tanto, foi utilizado o Sistema Portátil de Medição das Trocas Gasosas, modelo LI-6200 (LI-COR, Lincoln, NE, EUA), auxiliado por uma câmara de 0,25 L com uma área de medição de aproximadamente  $6,8 \text{ cm}^2$ . As medições foram realizadas com um Fluxo de Fótons Fotossintéticos (FFF), cerca de  $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  fornecida por Light Emitting Diode (LEDs) e concentração de  $\text{CO}_2$  de  $360 \pm 30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

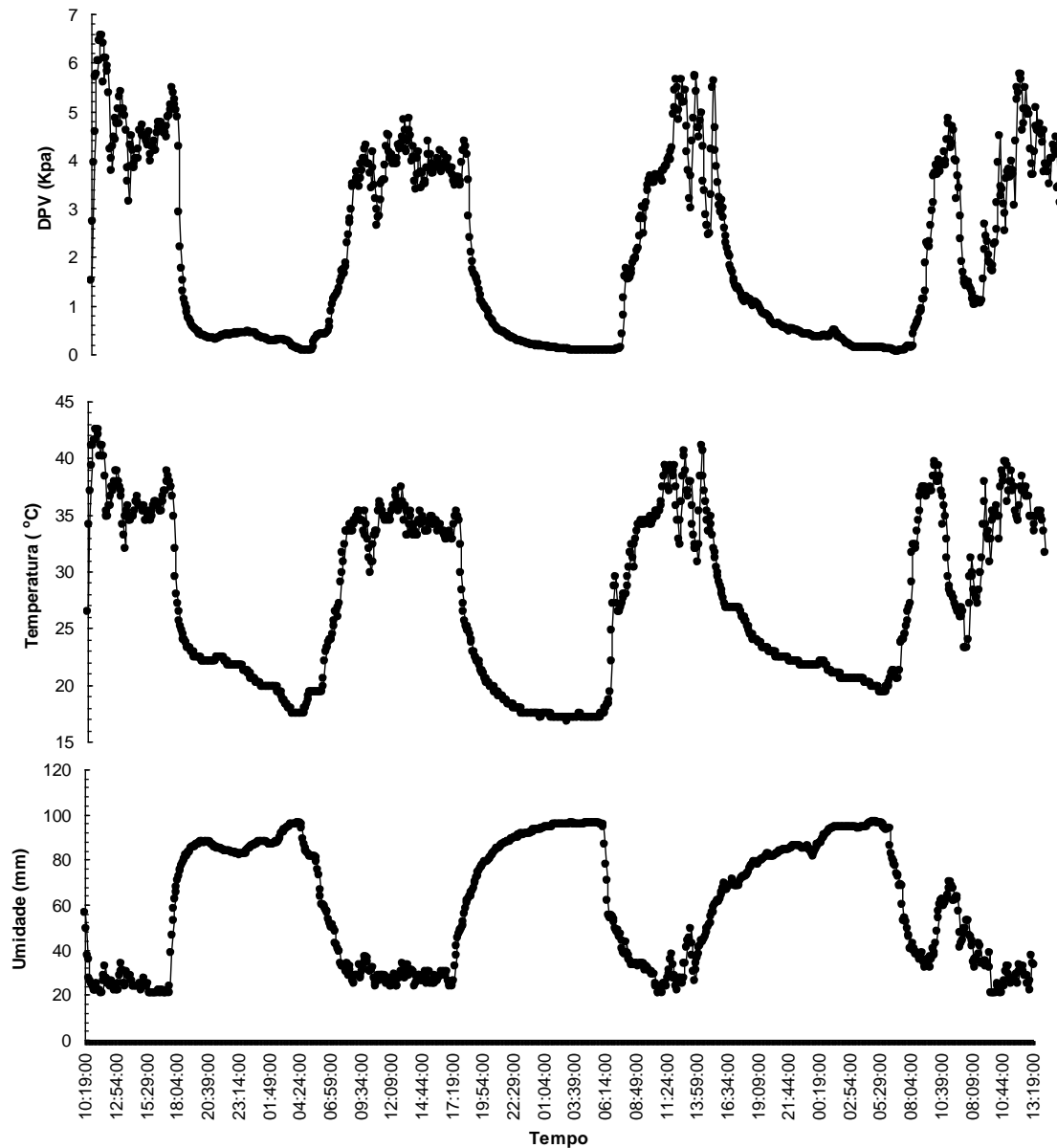


Figura 6. Valores da Umidade Relativa (UR) em percentagem (%), da Temperatura (T) em (°C) e do Déficit de Pressão de Vapor (DPV) em (kPa) durante os 4 dias de avaliação do experimento. Os dados da UR e T foram obtidos em intervalos de 5 minutos, e o DPV no momento das medições das trocas gasosas.

#### 4.3.4.2 Fluorescência da Clorofila a

A medição da fluorescência (Figura 07-B) foi determinada logo após a medição das trocas gasosas e na mesma folha. Esta determinação foi realizada com um fluorímetro não-modulado Plant Efficiency Analyser (PEA- Hansatech Ltd.,

King's14 Lynn, Norfolk, Inglaterra) com uma prévia adaptação ao escuro por 30 minutos com auxílio de pinças próprias para que os centros de reação do PSII mantivessem abertos e que a perda de calor fosse mínima. A Fluorescência inicial ( $F_0$ ) foi obtida com luz de baixa intensidade ( $< 0,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) para evitar o efeito na  $F_v$ . Os parâmetros  $F_0$ , a  $F_m$  foram determinados assim como a relação  $F_v/F_m$ . Segundo metodologia estabelecida por Strasser e Strasser (1995), foi possível obter cinco níveis de fluorescência [F1( $t_1=0010\mu\text{s}$ ), F2( $t_2=0020\mu\text{s}$ ), F3( $t_3=0030\mu\text{s}$ ), F4( $t_4=0002\text{ms}$ ), F5( $t_5=0003\text{ms}$ )] por meio do fluorímetro PEA. A partir desses valores, foram obtidos alguns indicadores utilizando o Programa Biolyzer (Strasser, R.J. - University of Geneva, Laboratory of Bioenergetics, Suíça) do desempenho do processo fotoquímico da fotossíntese (*JIP-test*) como a Concentração de Centros de Reação Ativos ( $RC/CS_0$ ).



Figura 7. Medição das Trocas Gasosas (A), com o Sistema Portátil Modelo LI-6200 e Fluorescência da clorofila *a* (B), com um Fluorímetro não-modulado PEA, em plantas de café Conilon variedade Vitória, Clone 02, no interior da estufa, em Marechal Floriano, ES.

O Déficit de Pressão de Vapor do ar (DPV), medido em kPa foi calculado segundo a equação proposta por Jones (1992):

$$DPV = 0,61137 \times \exp\left(\left(\frac{17,502 \times T}{240,97 + T}\right) \times \left(1 - \frac{UR}{100}\right)\right)$$

Após 196 dias do transplante das mudas para os vasos foram realizadas as seguintes análises:

#### 4.3.5 Teor de Clorofila

O teor de clorofila foi estimado por meio do medidor portátil de clorofila modelo SPAD-502, Minolta, na 4<sup>a</sup> ou 5<sup>a</sup> folha contadas a partir do ápice.

#### 4.4 Determinação das Enzimas

Para as alterações enzimáticas das SOD, CAT e ACP, foram realizadas coletas de folhas após 96 horas de aplicação dos inseticidas na folha, e 19 dias após a aplicação via *drench*. Duas folhas foram coletadas do segundo par do ramo plagiotrópico (Figura 08-A), das plantas submetidas aos tratamentos. O material coletado foi acondicionado e mantido a temperatura de -20°C.



Figura 8. Coleta do segundo par de folhas (A) após 96 horas da aplicação dos inseticidas via foliar e 19 dias via *drench*, em plantas de café Conilon para as determinações enzimáticas. Maceração das folhas (B), para obtenção dos extratos enzimáticos.

No momento do uso, o material mantido no gelo, foi descongelado, picado e triturado com auxílio de graal e pistilo, em soluções tampões (1:15 p/v), específicas para cada ensaio enzimático. O material triturado (Figura 08-B), foi homogeneizado em aparelho Homogenizer – high speed 4000 rpm, com pistilo de teflon, e em seguida, centrifugados em Centrífuga Sorvall Biofuge Stratos, a 15,000 x g, durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido foi utilizado como fonte de enzimas. As reações foram acompanhadas em

espectrofotômetro Amersham Biosciences, Modelo Ultrospec 2.100 pro, em triplicata.

#### 4.4.1 Superóxido Dismutase - SOD (E.C 1.15.1.1)

A atividade da SOD foi determinada de acordo com o método descrito por McCord & Fridovich (1969). Os tecidos foram homogeneizados em 50 mM de tampão fosfato de sódio pH 7,8 em relação 1:5 p/v, e centrifugados a 15.000 x g durante 15 minutos a 4°C. Amostras foram incubadas em meio de reação contendo solução tampão TRIS-HCl, 50 mM, pH 7.2, xantina 0.043 mM, 18.2 µM citocromo *c* e 0,2 U/mL de xantina oxidase. A reação foi iniciada pela adição da xantina oxidase. O íon superóxido é gerado pelo sistema xantina/xantina oxidase e a redução do citocromo *c* é monitorado a 550 nanômetros (nm). A atividade enzimática foi expressa em unidades de SOD, na qual uma unidade é definida como a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da redução do citocromo *c*/min./mg de proteína, a temperatura de 25°C.

#### 4.4.2 Catalase - CAT (E.C. 1.11.1.6)

A atividade da CAT foi analisada seguindo metodologia descrita por Beutler (1975). Os tecidos foram homogeneizados em solução tampão TRIS-HCl, 50 mM, pH 8.0 , em relação 1:5 p/v, e centrifugados a 15.000 x g durante 15 minutos a 4°C. Amostras foram incubadas em meio de reação contendo solução tampão TRIS-HCl, 50 mM, pH 8.0 , 10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A reação foi iniciada pela adição do extrato e acompanhada a 240 nm, durante 30 segundos. Uma unidade de Catalase é definida com a quantidade de enzima que catalisa a decomposição de 1µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto/mg de proteína a 25°C.

#### 4.4.3 Fosfatase ácida - ACP (E.C. 3.1.3.2)

A atividade da ACP foi determinada de acordo com Barred (1972), porém utilizando para-Nitrofenilfosfato (pNPP) como substrato. Os tecidos foram homogeneizados em tampão acetato de sódio, 20 mM, pH 5,0 , em relação 1:5 p/v, e centrifugados a 15.000 x g durante 15 minutos a 4°C. Amostras foram incubadas por 10 minutos em meio de reação contendo 20 mM de tampão acetato de sódio, pH 5.0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM pNPP e o extrato enzimático. A reação foi interrompida pela adição de 1mM de NaOH. A atividade foi determinada baseada na formação de p-nitrofenol, a 405 nm. Uma unidade foi definida como a quantidade de enzima capaz de formar 1 µmol p-nitrofenol/ mg proteína/min, a 25°C.

A concentração de proteína foi determinada de acordo com metodologia descrita por Lowry et al., (1951), usando gama globulina sérica bovina como padrão.

#### 4.5 Determinações da Massa Seca

No final da fase experimental com os inseticidas, as plantas foram retiradas dos vasos, lavadas em água corrente e secas levemente. Após esta etapa, as plantas foram separadas em folhas, caule e raiz, seguida de pesagem para a determinação do peso úmido. O material pesado foi transferido para estufa de circulação, mantidos durante 48 h, a 80 °C, e após, foi retirado e pesado em balança analítica a fim de se determinar a massa seca (Anexo 2).

Os dados biométricos para o crescimento também foram determinados como o diâmetro do caule (Ø), a Altura, o número de folhas, o Teor de clorofila (%) (Anexo 3 - antes das aplicações dos inseticidas), (Anexo 4 - 18 dias após a aplicação dos inseticidas), peso seco da raiz, do caule, das folhas, peso total e a relação parte aérea/raiz.

A avaliação dos inseticidas aplicados no solo via *drench* foi realizada 18 dias após aplicação, pois segundo Souza et al., (2006) , os teores mínimos do Thiamethoxan em folhas de café para controle do bicho-mineiro são de 0,2 a 0,4 ppm, e com 18 dias após aplicação os teores na folha já estão acima 0,7 ppm.

#### 4.6 Determinações Microbiológicas

As análises microbiológicas das amostras de solo coletadas no tempo zero e após aplicação dos inseticidas em campo (Figura 09-A), para controle do bicho-mineiro, foram realizadas conforme o método recomendado pela “American Paint Horse Association” (APHA): Unidades Formadoras de Colônias/mL (UFC/mL) e Número Mais Provável/mL (NMP/mL), baseadas na técnica de diluições seriadas (APHA, 1995).

Para os ensaios com UFC, as diluições seriadas foram desenvolvidas com a transferência de 10g de amostra da terra e 90 mL de água destilada, para um Becker em constante agitação, durante 10 minutos. Com o auxílio de pipeta esterilizada foi retirado 1,0 mL do sobrenadante e transferido para um tubo de ensaio contendo 9,0 mL de solução salina peptonada a 1%. Após homogeneização, 1,0 mL dessa solução ( $10^{-1}$ ) foi transferido para outro tubo de ensaio contendo 9,0 mL de água destilada, obtendo-se então, diluição de  $10^{-2}$  (VASCONCELLOS et al., 2006).

Volume de 0,1 mL da cada solução foi transferido para placa de Petri contendo 20 mL de Agar nutriente, que foram espalhados com auxílio de alça de Drigalski. Todos os procedimentos foram realizados em fluxo laminar, próximo a chama do bico de Bunsen. Na etapa final, as placas foram identificadas e incubadas, em posição invertida, em estufas a 37°C. Após 48 horas foram realizadas as contagens das colônias. Os fungos identificados nas placas foram isolados em tubos para crescimento (Figura 09-B), e identificados no Laboratório de Fitopatologia do INCAPER- Centro Serrano.



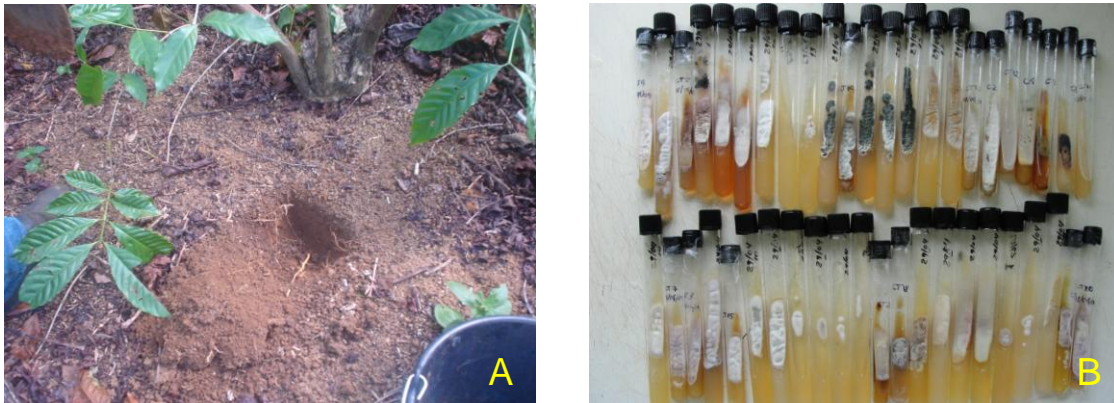


Figura 9. Amostragem do solo (A) para avaliação da população de fungos e bactérias e isolamento destes fungos (B), em lavoura de café Conilon após a aplicação de inseticidas no solo via *drench*, em Anchieta, ES.

#### 4.7 Análise Estatística

Os resultados de porcentagem de mortalidade da broca, obtidos na primeira e segunda avaliação, realizadas aos 15 e 30 dias após aplicação (DAP) dos inseticidas, as características fisiológicas e enzimáticas foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de Duncan a 5% de significância e a análise de correlação polinomial entre a % de grãos brocados, a Taxa fotossintética Líquida ( $A$ ), o Rendimento Quântico Máximo do PSII ( $F_v/F_m$ ) e as doses dos inseticidas, aplicados via foliar, foram realizados utilizando o programa estatístico Statistica 7.0. As porcentagens de eficiência dos tratamentos no controle da broca foram calculadas pela fórmula de Abbott (ABBOTT,1925). A normalidade dos dados foi testada de acordo Zar (1999).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Eficiência dos Inseticidas no Controle do Bicho-mineiro

No controle do bicho-mineiro não foram observados nenhuma diferença entre os tratamentos, inclusive nas plantas controle (Tabela 10), que mantiveram um nível de infestação da praga, inferior a 2%, no período avaliado.

Tabela 10 - Percentual de ataque do bicho-mineiro através de minas vivas nas folhas, durante oito meses após aplicação dos inseticidas no solo via *drench*, em Anchieta, ES

Tratamentos	% de ataque (minas vivas) do bicho-mineiro							
	Mar.	Abr.	Maio	Jun.	Jul.	Ago.	Set.	Out.
Controle	0	0	0	1	1	1	1	2
T1=Chlo + Thia	0	0	0	0	0	0	1	1
T2=Imidacloprid	0	0	0	0	0	0	1	1

### 5.2 Eficiência dos Inseticidas no Controle da Broca-do-café

Os resultados obtidos após 15 e 30 DAP dos inseticidas são apresentados na Tabela 11.

Os resultados demonstram que a dose 0.25 L/ha, foi eficiente em 17,8%, nos 15 DAP dos inseticidas. Este resultado foi significativamente diferente quando comparado ao controle ( $p=0,000732$ ). As doses maiores da mistura, 0,50; 0,75 e 1,0 L/ha, aumentaram a eficiência no controle da broca-do-café em Conilon, não se diferenciando da dose de 2,0 L/ha de Endosulfan (padrão). Entretanto, todos os tratamentos apresentaram diferenças altamente significativas

( $p=0,000060$ ,  $p=0,000075$ ,  $p=0,000032$  e  $p=0,000036$ , respectivamente), quando relacionados ao Controle e ao tratamento 0,25 L/ha.

Em relação aos 30 DAP, observou-se que o tratamento 0,25 L/ha apresentou eficiência de 22,2% em relação ao controle, não diferindo significativamente ( $p=0,113216$ ) do tratamento 0,50 L/ha. Quando comparados os tratamentos 0,75; 1,0 e 2,0 L/ha, constataram-se semelhanças estatísticas quando relacionadas ao 0,50 L/ha, diferenciando-se, porém, do controle e de 0,25 L/ha ( $p=0,000084$ ;  $p=0,000060$ ;  $p=0,000036$  e  $p=0,000032$ ), respectivamente (Tabela 11).

A Figura 10 mostra a regressão polinomial entre a % de frutos brocados 15 DAP (A) e 30 DAP (B) e as doses da mistura dos inseticidas Chlo + Thia aplicados via foliar para o controle da broca-do-café, com valores de  $R^2=0,93$  e  $0,96$ , respectivamente, para 15 DAP e 30 DAP.

Tabela 11 – Porcentagem da mortalidade da broca na entrada da galeria dos frutos broqueados e porcentagem de eficiência dos inseticidas aplicados nas folhas em duas avaliações realizadas aos 15 e 30 DAP da segunda pulverização. Anchieta, ES

Tratamentos	Dosagem L p.c./ha <sup>I</sup>	15 DAP		30 DAP	
		Mortalidade (%)*	Eficiência (%)**	Mortalidade (%)*	Eficiência (%)**
Controle <sup>II</sup>	-	5,48 a	-	2,73 a	-
T1=(Chlo + Thia)	0,25	22,33 b	17,83	22,20 b	20,02
T2=(Chlo + Thia)	0,50	37,99 c	34,39	29,61 cb	27,63
T3=(Chlo + Thia)	0,75	37,71 c	34,08	36,58 c	34,80
T4=(Chlo + Thia)	1,0	40,49 c	37,04	37,88 c	36,14
T5=(Endosulfan)	2,0	38,40 c	34,82	38,77 c	37,05
C.V. (%)		17,18		19,88	

<sup>I</sup> Litros de produto comercial/ha; <sup>IV</sup> Controle - porcentagem de mortalidade natural; \* Letras diferentes nas colunas indicam diferença significativa pela ANOVA (n=8) e teste Duncan ( $p\leq 0,05$ ). \*\*A eficiência dos inseticidas foi calculada pela fórmula de Abbott (ABBOTT,1925).

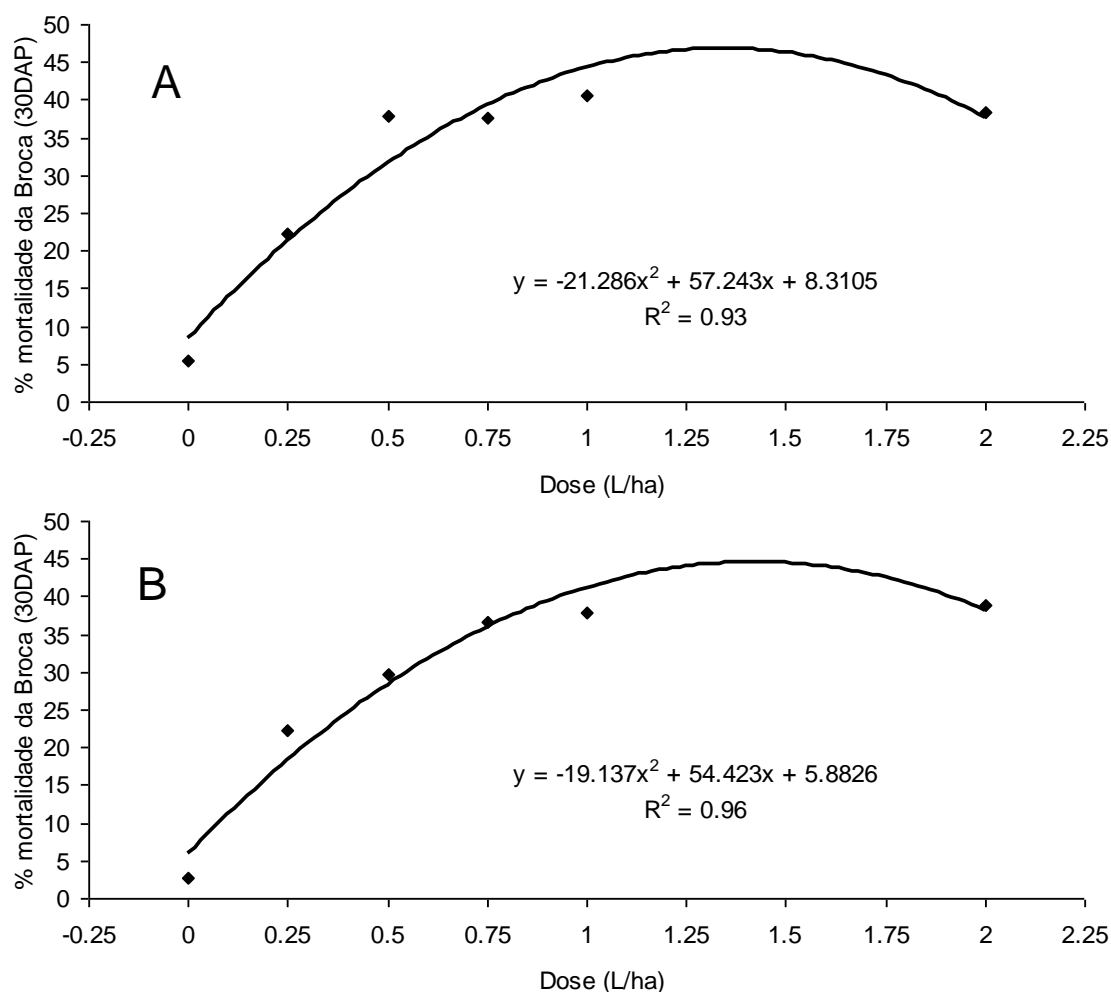


Figura 10. Regressão polinomial entre a % de frutos brocados 15 DAP (A) e 30 DAP (B) e as doses da mistura dos inseticidas Chlo + Thia, aplicados via foliar para o controle da broca-do-café, em café Conilon, Alfredo Chaves, ES.

A segunda avaliação da incidência da praga, realizada nos grãos após a colheita e secagem, são apresentados na Tabela 12.

Conforme os resultados apresentados (Tabela 12) é possível constatar a inexistência de diferenças significativas ( $p=0,731009$ ) entre os tratamentos Controle e 0,25 L/ha. Entretanto, essa diferença passa a ser significativa ( $p=0,004700$ ), quando comparados ao tratamento 0,50 L/ha e ao Controle. Ao serem comparados todos os tratamentos, observa-se igualdade entre 0,75; 1,0 e 2,0 L/ha, porém altamente significativos ( $p \leq 0,05$ ) entre 0,25 e 0,50 L/ha e Controle.

A Regressão polinomial entre a % de grãos brocados e as doses da mistura dos inseticidas Chlo + Thia aplicados via foliar para o controle da broca foram altamente significativas ( $p < 0,000000$ ) com valor de  $R^2 = 0,92$  (Figura 11). A dose ideal de Chlo + Thia para o controle da broca-do-café nas condições do experimento no campo foi de 0,79 L/ha, calculado pela Análise de regressão, Múltipla regressão, com  $R = 0,79$ .

Tabela 12 - Percentagem de grãos brocados após aplicação foliar dos inseticidas Chlo + Thia e Endosulfan e suas respectivas doses, em café Conilon, Alfredo Chaves, ES

Tratamentos	Dose (L/ha)	Média ± DP
Controle	-	14,0 ± 1,3 a *
T1=(Chlo + Thia)	0,25	12,25 ± 1,25 ab
T2=(Chlo + Thia)	0,50	9,375 ± 1,06 b
T3=(Chlo + Thia)	0,75	3,00 ± 0,76 c
T4=(Chlo + Thia)	1,0	2,875 ± 0,83 c
T5=Endosulfan	2,0	3,00 ± 0,76 c

\* Letras diferentes nas colunas indicam diferença significativa pela ANOVA (n=8) e teste Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

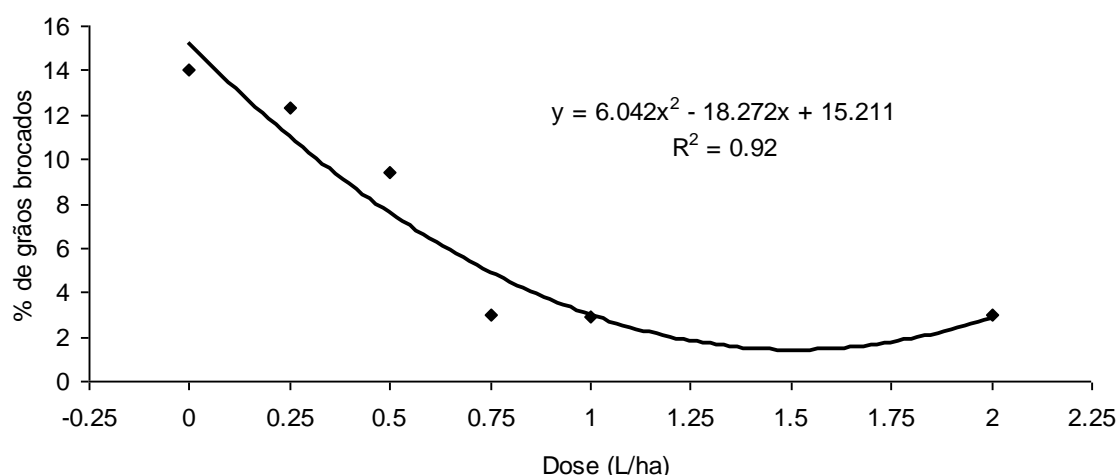


Figura 11. Correlação polinomial entre a % de grãos brocados e as doses dos inseticidas Chlo + Thia, aplicados via foliar para o controle da broca-do-café, em café Conilon, Alfredo Chaves, ES.

### 5.3 Características Fisiológicas

Neste estudo observou-se que os inseticidas aplicados tanto via foliar como via *drench*, nas doses testadas, induziram variações nas trocas gasosas e nas relações  $F_v/F_m$  e  $RC/CS_o$ , ao longo do período experimental, conforme Figuras 12,14,15,17 e 18.

#### 5.3.1 Taxa Fotossintética Líquida (A) – na Folha (F)

A maior variação na taxa fotossintética líquida foi obtida quando os vegetais foram tratados, com doses 2,0 L/ha da mistura Chlo + Thia (T6) e 4,0 L/ha do Endosulfan (T7). Essas características foram significativamente reduzidos, ao longo dos dias de ensaio, e os percentuais obtidos 1 Dia Após Aplicação (DAP) dos inseticidas na folha, foram de 36,9% ( $p=0,000043$ ) para T6 e 37,4% ( $p=0,000060$ ) para T7, quando comparados ao Controle. As reduções maiores foram constatadas 2 DAP dos inseticidas, quando os resultados apontaram reduções de 46,1% ( $p=0,000144$ ) e 60,0% ( $p=0,000068$ ), para os mesmos tratamentos, respectivamente. A partir do terceiro até o décimo nono dia, percebeu-se leve recuperação da taxa fotossintética líquida, comprovada pelos valores de redução, claramente menores quando comparados ao obtidos no Dia 03 do experimento. Os percentuais de recuperação foram 37,5% e 31,2% para os tratamentos T6 e T7, respectivamente (Figura 12 –F).

#### 5.3.2 Taxa Fotossintética Líquida (A) – no Solo (S)

A melhor resposta ao inseticida aplicado via solo, ocorreu no décimo nono dia, ou seja, 18 DAP dos inseticidas, prazo suficiente para que as substâncias interferissem na taxa fotossintética líquida. Quando comparados ao Controle, foi possível detectar redução significativa após 18 DAP, desenvolvida pelo Imidacloprid nas concentrações de 1,0 L/ha (T2) e 2,0 Kg/ha (T4), cujos percentuais foram de 22,6% e 26,9% respectivamente, ao contrário do

inseticida (Chlo + Thia) que nas duas doses testada não diferiram do controle (Figura 12-S).

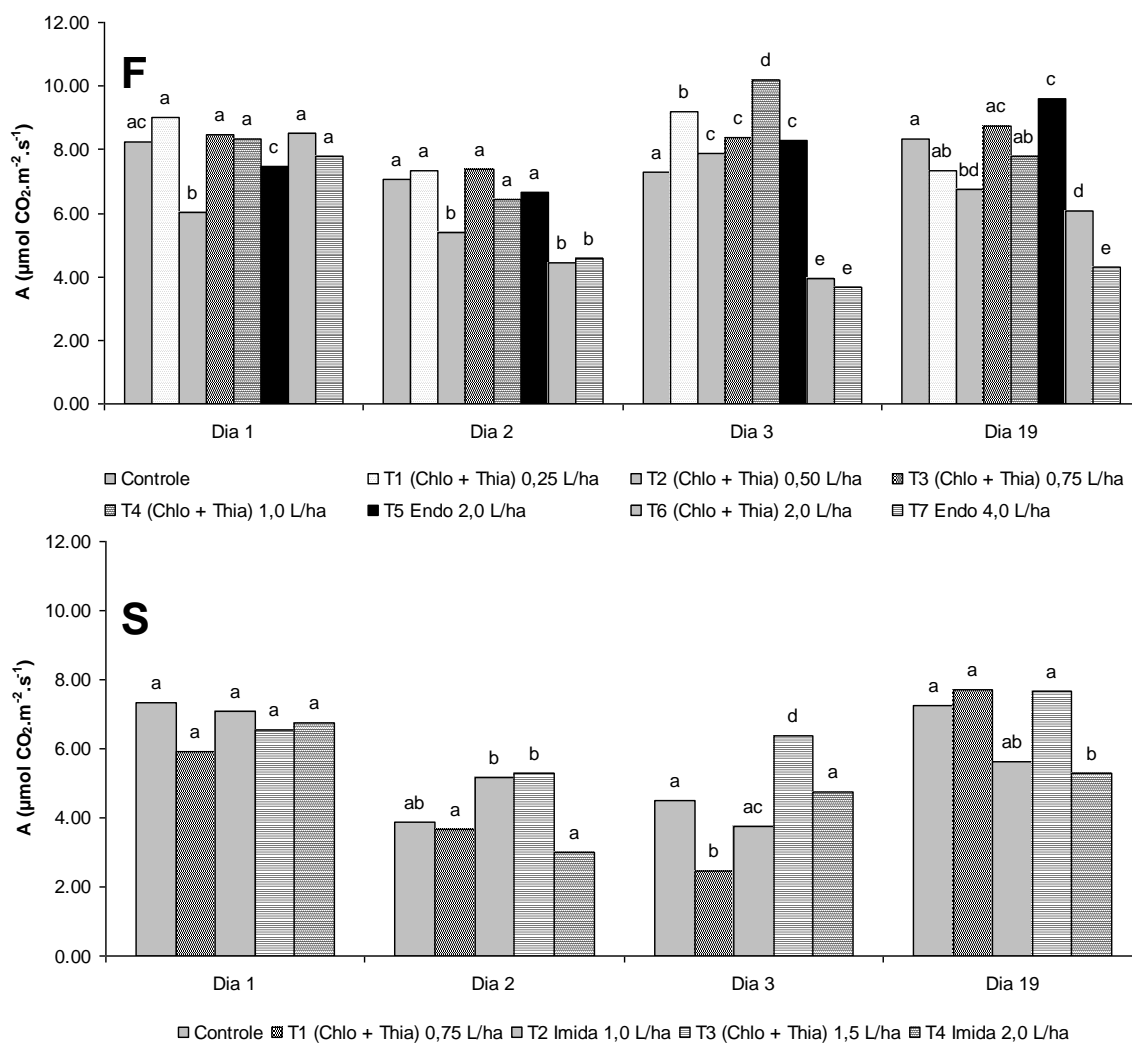


Figura 12. Efeito dos inseticidas aplicados na Folha (F) e no Solo (S), na Taxa Fotossíntese Líquida de CO<sub>2</sub> (A) em  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , nos dezanove dias de avaliação do experimento. O Dia 1 foi antes da aplicação dos inseticidas, o Dia 2 foi 1 DAP, o Dia 3 foi 2 DAP e o Dia 19 foi 18 DAP. Letras diferentes nas barras indicam diferença estatística significativa pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ). As médias foram comparadas pela ANOVA e  $n=5$ .

A correlação polinomial (Figura 13) demonstra a interferência das doses dos inseticidas, após 24 horas de aplicados via foliar, na redução da Taxa fotossintética das plantas de café Conilon em estufa, com  $R=0,77$ .

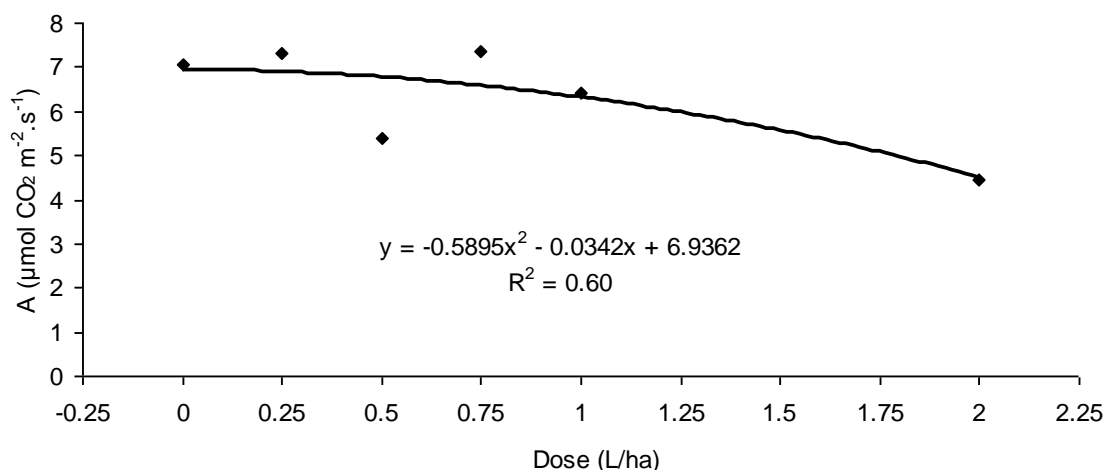


Figura 13. Correlação polinomial entre a Taxa Fotossíntese Líquida de CO<sub>2</sub> (A) em  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e as doses dos inseticidas Chlo + Thia, 1 DAP via foliar em plantas de café Conilon na estufa, Marechal Floriano, ES.

### 5.3.3 Condutância Estomática ( $g_s$ ) – na Folha (F)

A Condutância Estomática ( $g_s$ ) foi significativamente reduzida em resposta à exposição aos tratamentos 2,0 L/ha da mistura Chlo + Thia (T6) e 4,0 L/ha do Endosulfan (T7). No segundo dia, ou seja, 1 DAP a redução da  $g_s$ , foi de 19,2% ( $p=0,001668$ ) e 17,3% ( $p=0,002678$ ) para os tratamentos T6 e T7 respectivamente, quando comparadas ao controle. Maior percentual de redução ocorreu 2 DAP, quando os valores detectados foram 28,8% ( $p=0,000056$ ) para T6 e 20,5% ( $p=0,000068$ ) para T7. Assim comparando, é possível afirmar que 18 DAP, ocorreu uma redução significativa ( $p=0,001828$ ) da condutância estomática pelo inseticida em relação a esta característica fisiológica, cujos valores chegaram ao máximo de 17,6% para ambos tratamentos (Figura 14-F).



#### 5.3.4 Condutância Estomática ( $g_s$ ) - no Solo (S)

Em relação à aplicação via *Drench*, os resultados mostram uma redução entre 6,3% a 25,0% quando comparado ao controle, para as plantas expostas aos tratamentos com Imidacloprid e a mistura (Chlo + Thia), porém não significativa. Mesmo se tratando de princípios ativos diferentes, a resposta 2 DAP, foi semelhante àquele observado com aplicação foliar, caracterizado por maior redução 18 DAP (Figura 14-S).

#### 5.3.5 Transpiração ( $E$ ) – na Folha (F)

A partir de 18 DAP do tratamento com a mistura (Chlo + Thia) na dose de 2,0 kg/ha e Endosulfan (4,0 kg/ha), os resultados demonstram a inexistência de diferenças significativas em relação ao controle. Entretanto, quando observadas as respostas dos mesmos tratamentos, com 1 DAP e 2 DAP, podemos caracterizar uma ativação pelos percentuais obtidos, cujos valores foram de 6,8% e 5,1% para 1 DAP e 8,6% e 9,4% para 2 DAP (Figura 15-F).

#### 5.3.6 Transpiração ( $E$ ) – no Solo (S)

Ao considerarmos 18 DAP dos inseticidas, devido o tempo de absorção, transporte e efeito nas folhas, podemos caracterizar esse dia como o mais sensível em relação aos anteriores. A Figura 15-S mostra que os percentuais de redução variaram de 25,0% a 28,9% e foram significativos em relação ao controle.

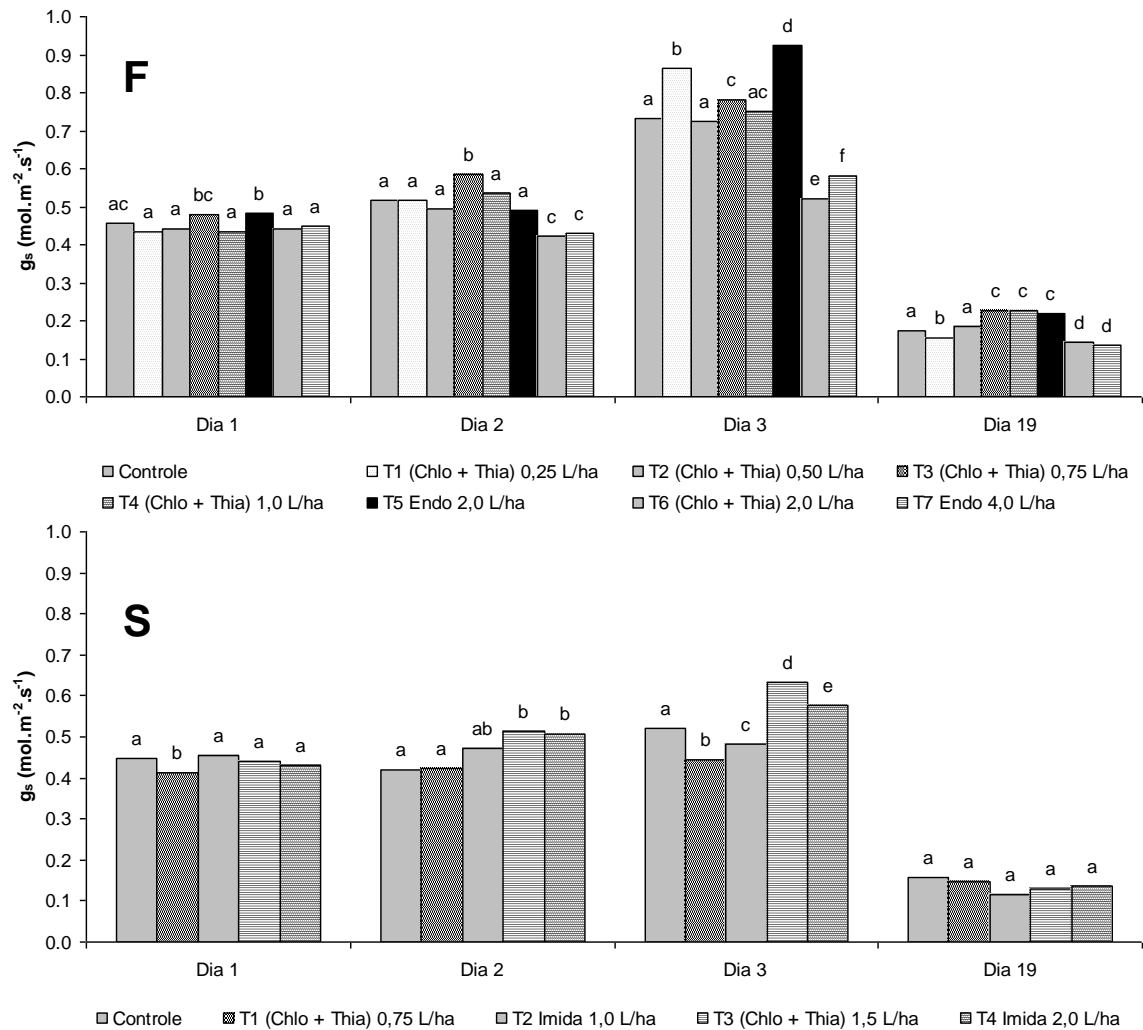


Figura 14. Efeito dos inseticidas aplicados na Folha (F) e no Solo (S), na Condutância Estomática ( $g_s$ ) em  $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , nos dezoito dias de avaliação do experimento. O Dia 1 foi antes da aplicação dos inseticidas, o Dia 2 foi 1 DAP, o Dia 3 foi 2 DAP e o Dia 19 foi 18 DAP. Letras diferentes nas barras indicam diferença estatística significativa pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ). As médias foram comparadas pela ANOVA e  $n=5$ .

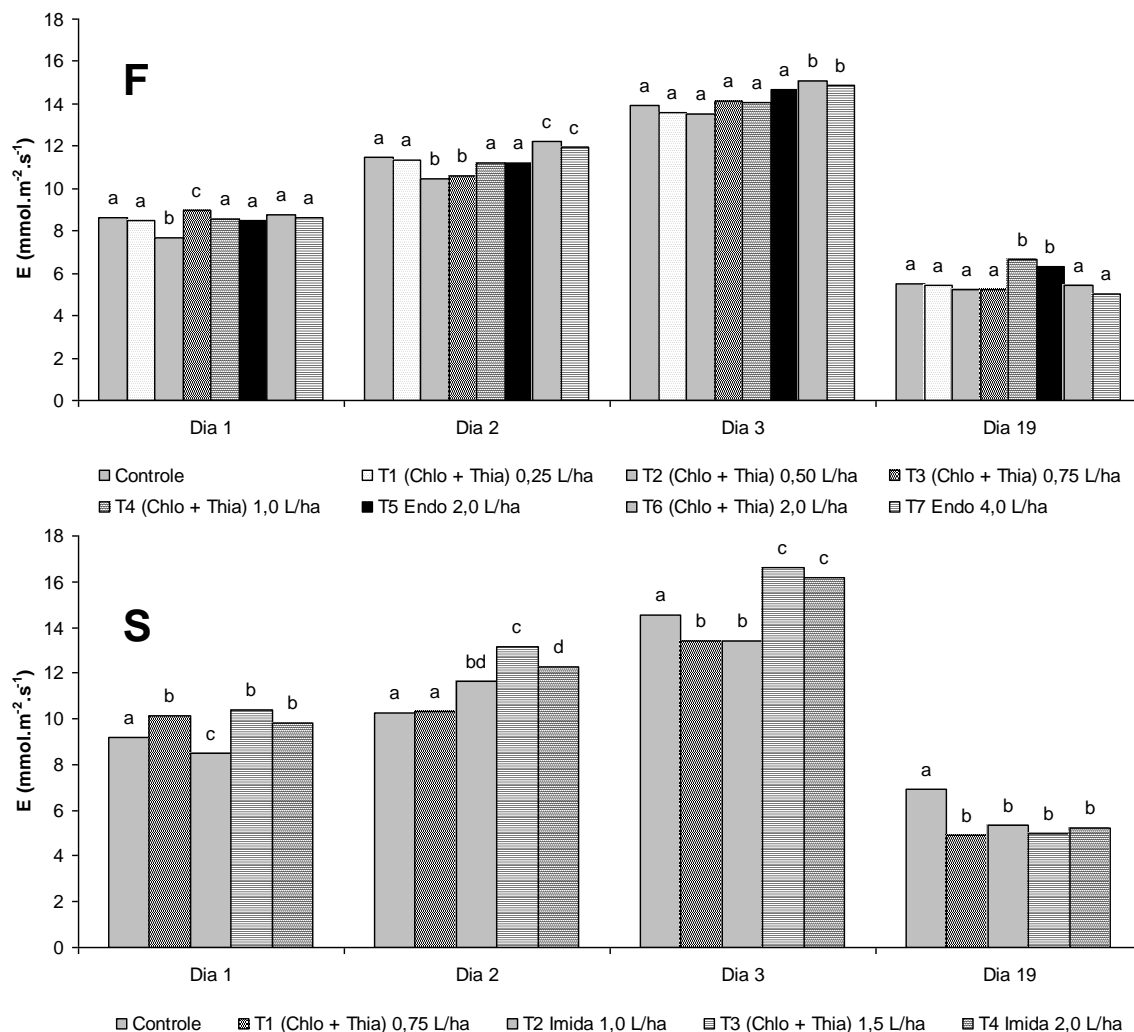


Figura 15. Efeito dos inseticidas aplicados na Folha (F) e no Solo (S), na Transpiração ( $E$ ) em  $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , nos dezenove dias de avaliação do experimento. O Dia 1 foi antes da aplicação dos inseticidas, o Dia 2 foi 1 DAP, o Dia 3 foi 2 DAP e o Dia 19 foi 18 DAP. Letras diferentes nas barras indicam diferença estatística significativa pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ). As médias foram comparadas pela ANOVA e  $n=5$ .

### 5.3.7 Rendimento Quântico Máximo do PSII ( $F_v/F_m$ ) – na Folha (F)

A eficiência fotoquímica do PSII das plantas, submetidas aos inseticidas, foi diferente para cada tratamento. No segundo dia experimental, para as plantas expostas aos tratamentos T3, T5, T6 e T7, constataram-se uma redução que variou de 2,5% a 4,9%. Entretanto, quando considerado o terceiro dia, somente o tratamento T7 apresentou redução significativa. Esses resultados permitem

supor que a partir do segundo dia, até o décimo nono, as variações de redução foram semelhantes, demonstrando maior estabilidade de resposta quando comparado aos parâmetros anteriores. É importante relatar a pequena variação nos valores do controle ao longo do período experimental, característica não observa anteriormente (Figura 17-F).

A regressão polinomial (Figura 16) mostra a interferência das doses dos inseticidas, após 24 horas de aplicados via foliar, na redução do Rendimento Quântico Máximo do PSII ( $F_v/F_m$ ) das plantas de café Conilon em estufa, com  $R=0,77$

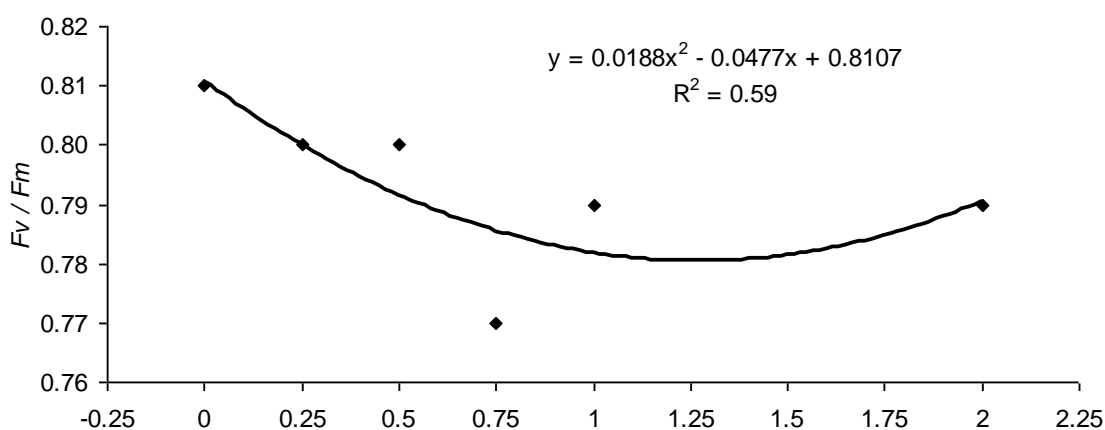


Figura 16. Regressão polinomial entre o Rendimento Quântico Máximo do PSII ( $F_v/F_m$ ) e as doses dos inseticidas Chlo + Thia, 1 DAP, via foliar em plantas de café Conilon na estufa, Marechal Floriano, ES.

### 5.3.8 Rendimento Quântico Máximo do PSII ( $F_v/F_m$ ) – no Solo (S)

Aparentemente, como mostrado na Figura 14-S, houve danos no rendimento quântico do PSII quando as plantas foram expostas aos tratamentos T1, T2 e T4, no décimo nono dia, de forma que os valores do rendimento quântico permaneceram quase inalterados. Apenas no tratamento T3 (Chlo + Thia), ocorreu um aumento de 3,9%, porém significativos devido aos baixos valores de desvio padrão.

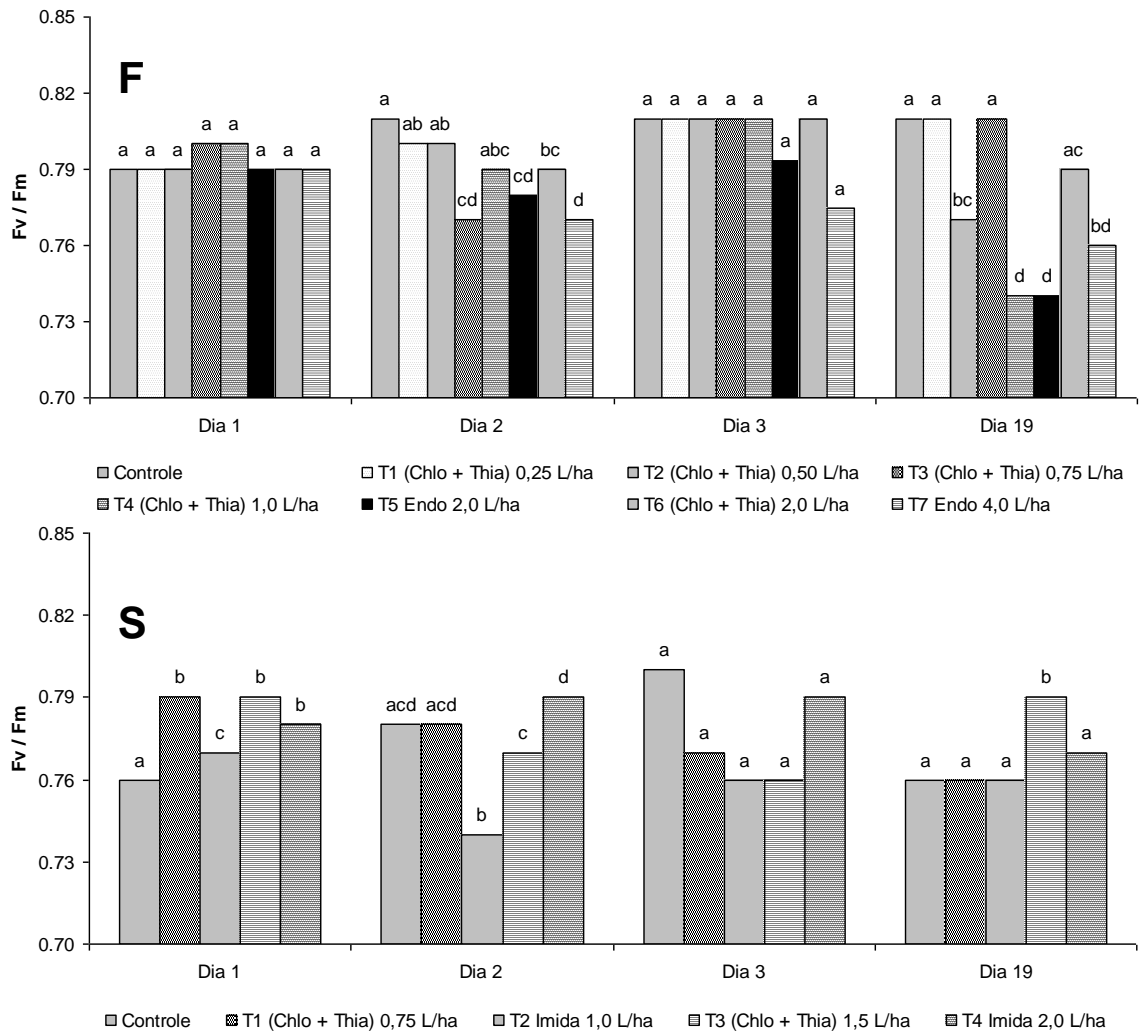


Figura 17. Efeito dos inseticidas aplicados na Folha (F) e no Solo (S), no Rendimento Quântico Máximo do Fotossistema II ( $F_v/F_m$ ), nos dezoito dias de avaliação do experimento. O Dia 1 foi antes da aplicação dos inseticidas, o Dia 2 foi 1 DAP, o Dia 3 foi 2 DAP e o Dia 19 foi 18 DAP. Letras diferentes nas barras indicam diferença estatística significativa pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ). As médias foram comparadas pela ANOVA e  $n=5$ .

### 5.3.9 Concentração de Centros de Reação Ativos ( $RC/CS_0$ ) – na Folha (F)

Como pode ser observado na Figura 18-F, ocorreu uma redução significativa ( $p \leq 0,05$ ) para os dois inseticidas testados para os dias 2, 3 e 19 na relação  $RC/CS_0$ , ou seja, na concentração de centros de reação ativos nas folhas. No Dia 3, os inseticidas (Chlo + Thia) na concentração de 2,0 L/ha e o Endosulfan a 4,0 L/ha reduziram a relação em aproximadamente 10%. Em relação ao Dia 19, observou-se uma redução significativa ( $p \leq 0,05$ ) nos centros de reação ativos induzidos pelo (Chlo + Thia) em 10,8% e de 15,6% pelo Endosulfan, nas mesmas concentrações. A Figura 19-B mostra os centros de reação não danificados das plantas controle, enquanto, as Figuras 20-B e 21-B mostram os centros de reações danificados pelos inseticidas que correspondem aos tratamentos (Chlo + Thia) e Endosulfan nas doses de 2,0 L/ha e 4,0 L/ha, respectivamente.

### 5.3.10 Concentração de Centros de Reação Ativos ( $RC/CS_0$ ) – no Solo (S)

Para os inseticidas aplicados via *drench* no solo, pode ser observado na Figura 18-S, que não ocorreu redução na concentração dos centros de reação nas plantas submetidas a todos os tratamentos durante todo o período avaliado.

Outra forma de expressar o fluxo de energia em biomembranas é o uso do modelo 'pipeline' do aparato fotossintético (Figura 19, 20 e 21). Nas Figuras 19-A, 20-A e 21-A, observa o modelo foliar, relativo à seção da folha excitada, denominado de fluxo fenomenológico de energia, baseado no Programa Biolyzer, proposto por Dr. Reto Strasser (Laboratório de Microbiologia e Bioenergética – Universidade de Geneva). Nas Figuras 19-B, 20-B e 21-B, pelo modelo foliar, observa-se a inativação dos centros de reação, indicados por círculos cheios (centros danificados) em relação aos círculos abertos (centros ativos).

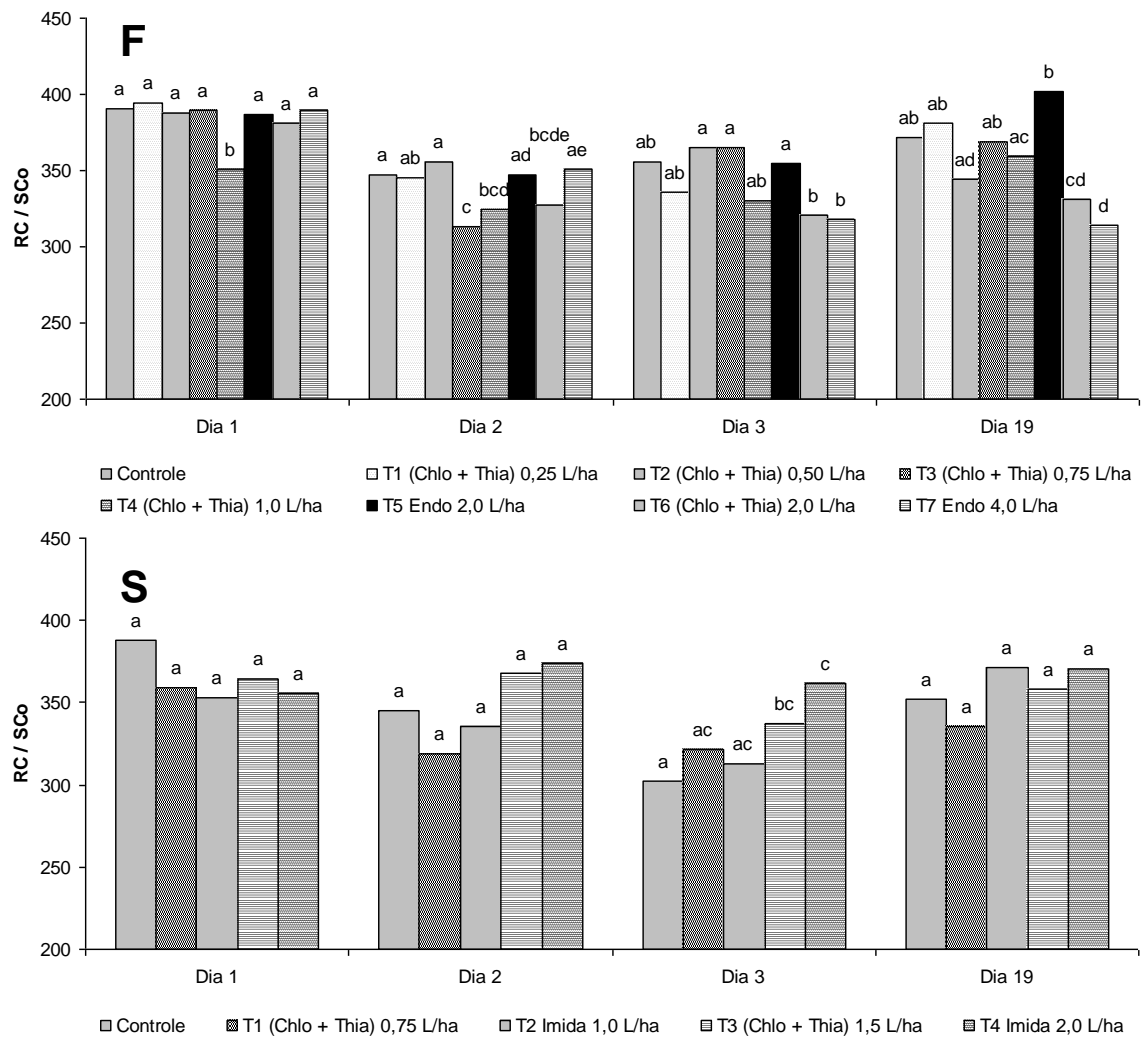


Figura 18. Efeito dos inseticidas aplicados na Folha (F) e no Solo (S), na Concentração de Centros de Reação Ativos ( $RC/CS_0$ ), nos dezanove dias de avaliação do experimento. O Dia 1 foi antes da aplicação dos inseticidas, o Dia 2 foi 1 DAP, o Dia 3 foi 2 DAP e o Dia 19 foi 18 DAP. Letras diferentes nas barras indicam diferença estatística significativa pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ). As médias foram comparadas pela ANOVA e  $n=5$ .

### Modelo 'Pipeline' do aparato fotossintético

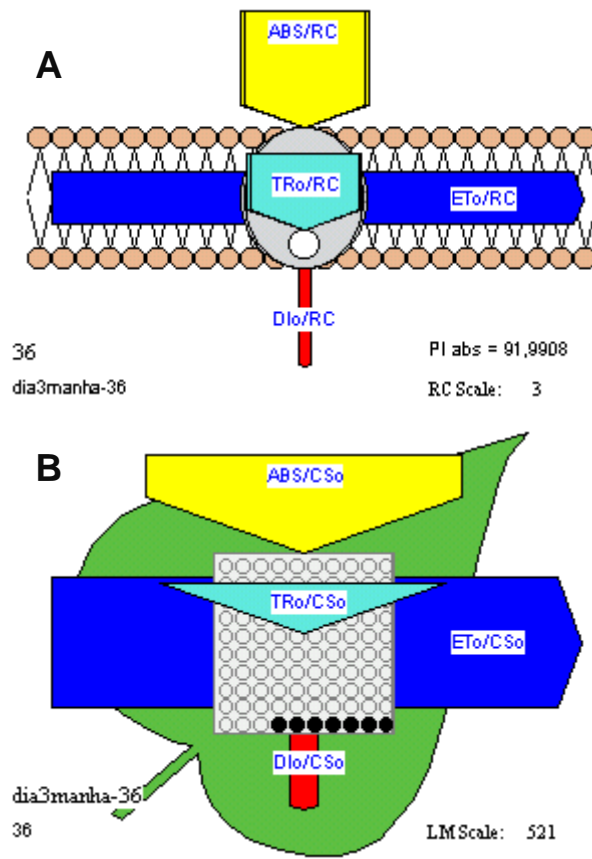


Figura 19. Modelo 'pipeline' de membrana (Figura 19-A) e da área da seção transversal das plantas Controle do Dia 3 – Manhã (Figura 19-B), do fluxo de energia em folhas de café Conilon, variedade Vitória, clone 02. Os círculos fechados (coloração preta) correspondem aos centros de reação inativos, e os abertos aos centros de reação ativos. A largura das setas indica a energia absorvida pelo sistema antena do PSII por centro de reação ( $ABS/RC$ ), energia usada para reduzir  $Q_A$  por centro de reação ( $TRo/RC$ ), dissipação efetiva dos centros de reação ativos ( $DIo/RC$ ), número total de fótons absorvidos por seção transversal da amostra ( $ABS/CS_0$ ), máxima taxa de captura de fótons por seção transversal da amostra ( $TRo/CS_0$ ) e dissipação efetiva por seção transversal ( $DIo/CS_0$ ) indicam a intensidade do fluxo de energia.



## Modelo 'Pipeline' do aparato fotossintético

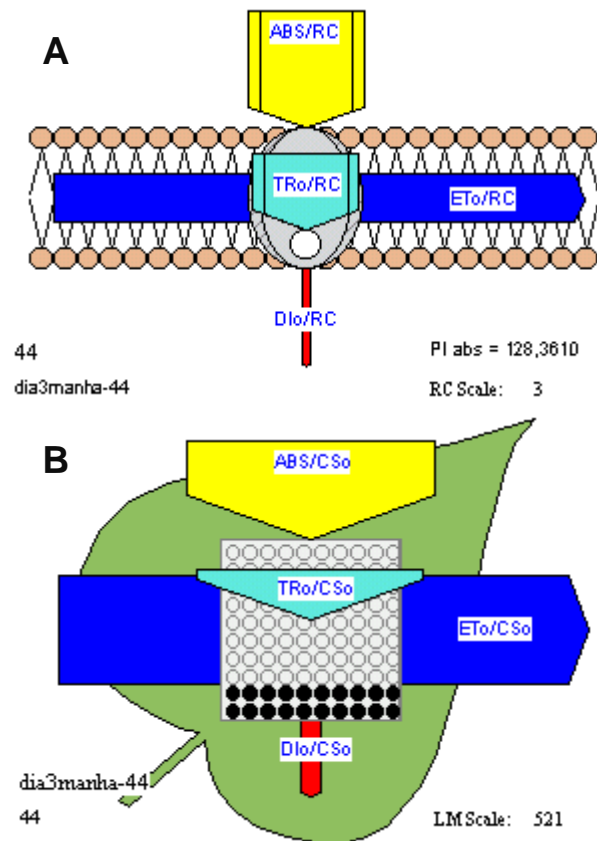


Figura 20. Modelo 'pipeline' de membrana (Figura 20-A) e da área da seção transversal das plantas do tratamento com o inseticida foliar (Chlo + Thia) na concentração de 2,0 L/ha, do Dia 3 – Manhã (Figura 20-B), do fluxo de energia em folhas de café Conilon, variedade Vitória, clone 02. Os círculos fechados (coloração preta) correspondem aos centros de reação inativos e os abertos, aos centros de reação ativos. A largura das setas energia absorvida pelo sistema antena do PSII por centro de reação ( $ABS/RC$ ), energia usada para reduzir  $Q_A$  por centro de reação ( $TRo/RC$ ), dissipação efetiva dos centros de reação ativos ( $DIo/RC$ ), número total de fótons absorvidos por seção transversal da amostra ( $ABS/CS_0$ ), máxima taxa de captura de fótons por seção transversal da amostra ( $TRo/CS_0$ ) e dissipação efetiva por seção transversal ( $DIo/CS_0$ ) indicam a intensidade do fluxo de energia.

## Modelo 'Pipeline' do aparato fotossintético

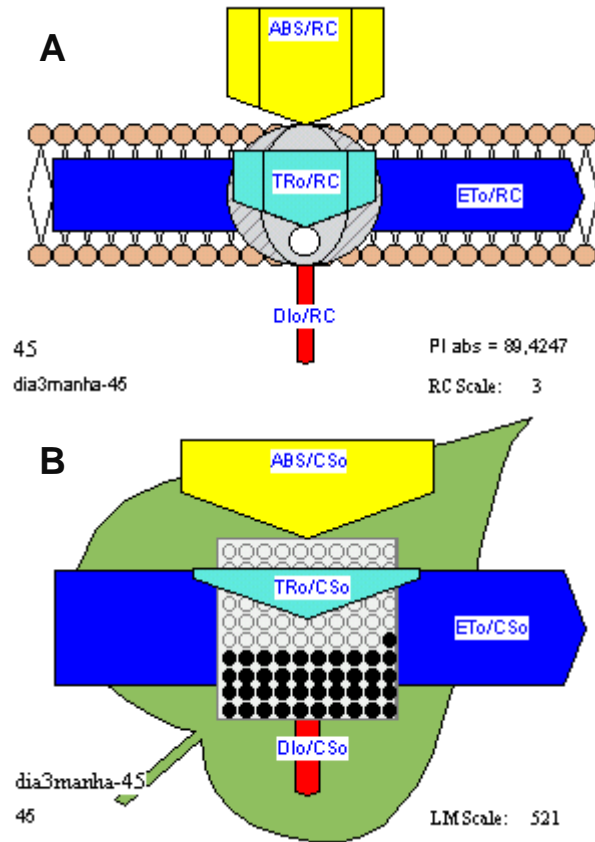


Figura 21. Modelo 'pipeline' de membrana (Figura 21-A) e da área da seção transversal das plantas do tratamento com o inseticida foliar (Endosulfan) na concentração de 4,0 L/ha, do Dia 3 – Manhã (Figura 21-B), do fluxo de energia em folhas de café Conilon, variedade Vitória, clone 02. Os círculos fechados (coloração preta) correspondem aos centros de reação inativos e os abertos, aos centros de reação ativos. A largura das setas energia absorvida pelo sistema antena do PSII por centro de reação ( $ABS/RC$ ), energia usada para reduzir  $Q_A$  por centro de reação ( $TR_0/RC$ ), dissipação efetiva dos centros de reação ativos ( $DI_0/RC$ ), número total de fótons absorvidos por seção transversal da amostra ( $ABS/CS_0$ ), máxima taxa de captura de fótons por seção transversal da amostra ( $TR_0/CS_0$ ) e dissipação efetiva por seção transversal ( $DI_0/CS_0$ ) indicam a intensidade do fluxo de energia.

## 5.4 Atividade das Enzimas

### 5.4.1 Superóxido Dismutase (SOD) - na Folha (F) e no Solo (S)

Todos os valores da atividade enzimática dos tratamentos no experimento relacionados à aplicação via foliar diminuíram de forma significativa. As concentrações 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 L/ha da mistura (Chlo + Thia), não apresentaram variações significativas de atividade entre si, porém se apresentaram reduzidas quando comparadas ao Controle. Observou-se que os tratamentos T2 (0,50 L/ha) e o T6 (2,0 L/ha), Figura 22-F; quando comparados, apresentaram respostas enzimáticas semelhante, apesar de, nesse último, ter sido utilizado concentração quatro vezes maior do que o tratamento T2. O tratamento, no qual foi utilizado o princípio ativo Endosulfan (T5), a resposta enzimática foi semelhante a todos os tratamentos anteriores, o que significa mesma resposta ao stress provocado pelo agente químico. Entretanto, a atividade da SOD relativa à aplicação foliar de Endosulfan, na concentração de 4,0 L/ha, foi altamente significativa ( $p=0,000025$ ), tanto em relação ao controle como aos tratamentos anteriores, com percentual de redução igual a 38,0% (Figura 22- F).

A aplicação dos inseticidas via *drench*, Figura 22-S, resultaram em reduções na atividade da SOD, quando comparados às concentrações 0,75 e 1,5 L/ha. Entretanto, somente a segunda concentração diferiu significativamente em relação ao controle ( $p=0,000681$ ). Entretanto, quando comparados os métodos de aplicação entre si, observou-se que a resposta via *drench*, para o tratamento de 0,75 L/ha, foi de 20,2% inferior àquela obtida para a atividade da SOD via foliar. A utilização do Imidacloprid, nas concentrações 1,0 e 2,0 Kg/ha, diferiram na resposta enzimática de forma que a maior concentração reduziu em 19,2% ( $p=0,000113$ ) a atividade da SOD (Figura 22- S).

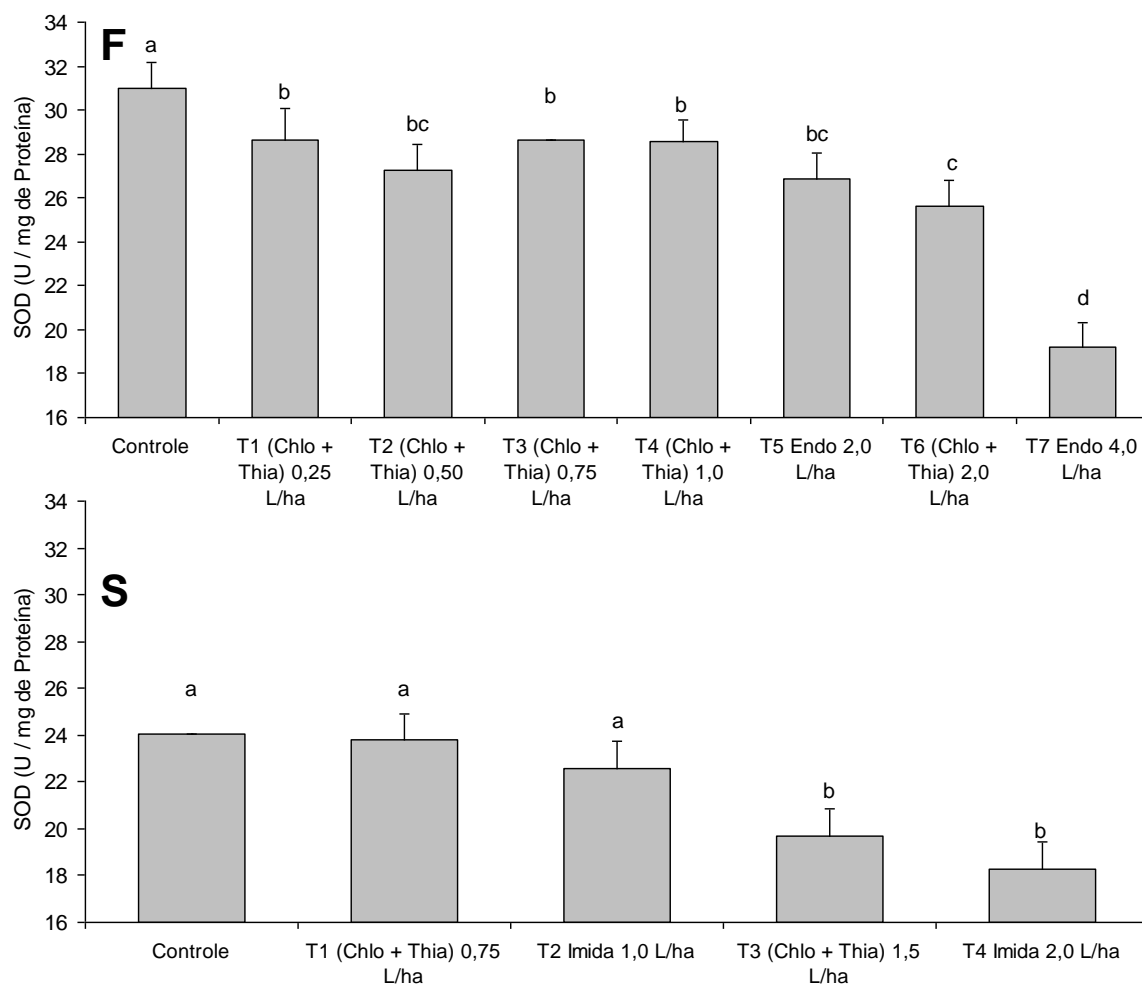


Figura 22. Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) em folhas de café Conilon, 96 horas após aplicação de inseticidas na Folha (F) e 18 DAP no Solo (S). A atividade enzimática foi expressa em U/mg de proteína. Os valores das médias foram comparadas pela ANOVA, com cinco plantas (n=5), com 03 determinações enzimáticas por planta. Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

#### 5.4.2 Catalase (CAT) - na Folha (F) e no Solo (S)

A resposta da CAT, na aplicação foliar da mistura 0,25 L/ha (Chlo + Thia), foi 11,5% e 18,2% superiores quando comparados ao controle e ao tratamento T4 (1,0 L/ha), Figura 23-F, respectivamente. Essa resposta foi única, entre todos os ensaios, que resultou em ativação enzimática. As concentrações utilizadas

em T2, T3 e T4, não foram capazes de induzir maior resposta ao estresse oxidativo, quando comparados ao controle, o que resultou em não-significância ( $p \geq 0,05$ ). Entretanto, os resultados obtidos permitem afirmar que o Endosulfan, na concentração de 2,0 L/ha, foi capaz de promover redução de 12,5%, superior aos tratamentos anteriores. Por outro lado, as atividades foram reduzidas em 39,1% e 45,2%, em relação ao controle, quando os vegetais foram expostos às concentrações de Chlo + Thia (2,0 L/ha) e Endosulfan (4,0 L/ha), o que indica efeito prejudicial dos princípios ativos, em relação à proteção da CAT ao estresse oxidativo (Figura 23–F).

A resposta da CAT aos inseticidas aplicados via *drench*, apresentou pequena diferença quando comparados à aplicação foliar para a concentração 0,75 L/ha. Essa concentração foi capaz de ativar a CAT em 6,4%, ao contrário da resposta não significativa para o tratamento foliar. A ativação observada para a mistura Chlo + Thia, foi semelhante àquela obtida com o Imidacloprid na concentração de 1,0 kg/ha, o que significa que ambos os princípios ativos, nas menores concentrações são capazes de atuar na ativação da CAT. Entretanto, houve redução de 21,9% para a mistura Chlo + Thia (T3) ( $p=0,000191$ ) e 31,0%, quando exposto ao Imidacloprid (T4) ( $p=0,000100$ ), nas maiores concentrações, quando comparados ao Controle (Figura 23–S).

#### 5.4.3 Fosfatase Ácida (ACP) - na Folha (F) e no Solo (S)

Os resultados demonstram que no mesmo período experimental, a resposta da ACP às concentrações 0,25 L/ha e 0,50 L/ha da mistura dos inseticidas (Chlo + Thia), aplicados via foliar, foram semelhantes, com percentual de redução de 3,4% em relação ao Controle. A mesma resposta foi observada para os tratamentos 0,75; 1,0 e 2,0 L/ha da mistura Chlo + Thia, que apresentaram o mesmo potencial inibitório, com média de 8,4%. De todos os tratamentos, a exposição do vegetal à concentração de 4,0 kg/ha de Endosulfan, foi o mais expressivo ( $p=0,000021$ ), com 14,4% de redução na atividade quando comparada ao controle (Figura 23–F)

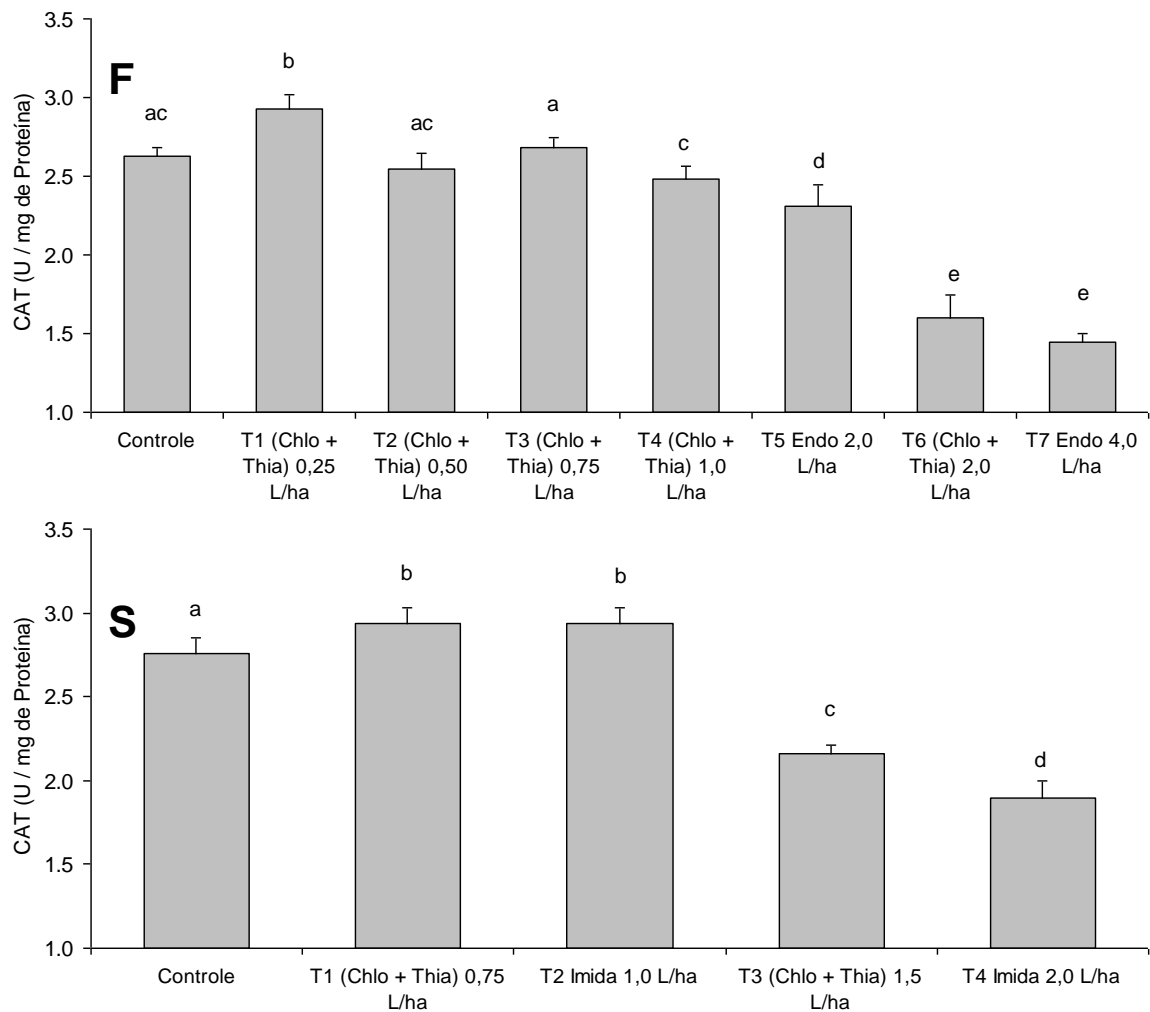


Figura 23. Atividade da enzima Catalase (CAT) em folhas de café Conilon, 96 horas após aplicação de inseticidas na Folha (F) e 18 DAP no Solo (S). A atividade enzimática foi expressa em U/mg de proteína. Os valores das médias foram comparadas pela ANOVA, com cinco plantas (n=5), com 03 determinações enzimáticas por planta. Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

Os níveis de redução na atividade da ACP, quando os inseticidas foram aplicados via *drench*, não diferiram daqueles obtidos via foliar, principalmente no que tange à concentração 0,75 L/ha (6,6%). Entretanto, os efeitos negativos do Imidacloprid (2,0 Kg/ha) sobre a função enzimática da ACP, foram significativos, com percentual de inibição de 7,7% (Figura 23-S).

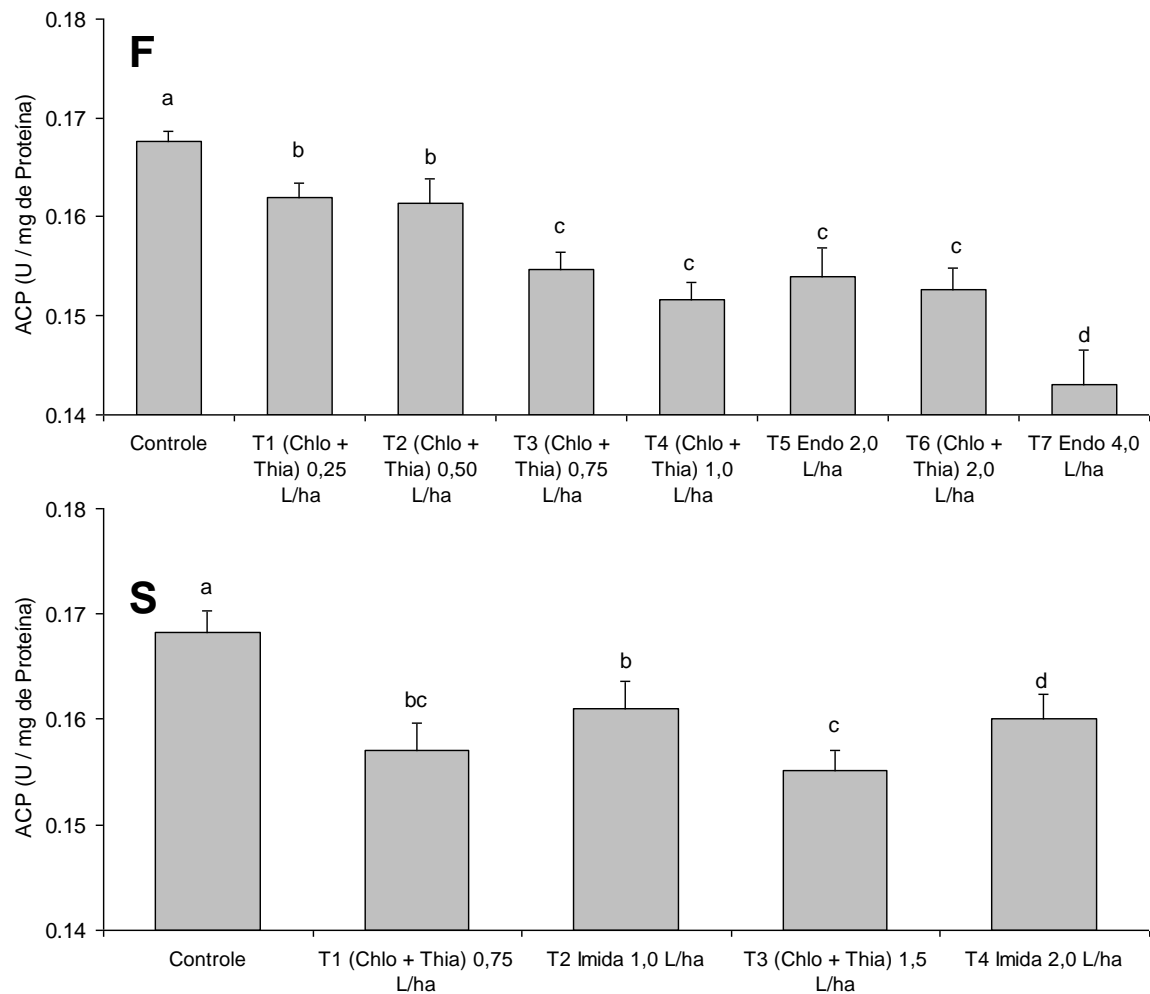


Figura 24. Atividade da enzima Fosfatase Ácida (ACP) em folhas de café Conilon, 96 horas após aplicação de inseticidas na Folha (F) e 18 DAP no Solo (S). A atividade enzimática foi expressa em U/mg de proteína. Os valores das médias foram comparadas pela ANOVA, com cinco plantas (n=5), com 03 determinações enzimáticas por planta. Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

### 5.5 Microbiota do Solo

A população de fungos e bactérias em Unidades Formadoras de Colônias (UFC/g de solo) foi avaliada em oito períodos diferentes, antes e após a aplicação dos inseticidas no solo via *drench* para o controle do bicho-mineiro associado à precipitação local em Anchieta, ES.

Análise temporal do número de microrganismos antes e após a aplicação dos inseticidas no solo, revelaram que a população de fungos mostrou-se ser menos sensível à aplicação dos inseticidas se comparado à população de bactérias (Figura 25-A e B). Com exceção dos 9 dias após aplicação, o tratamento com Imidacloprid apresentou uma interessante estimulação na população bacteriana ao longo do experimento se comparado ao Chlo + Thia, o qual inibiu o crescimento destes microrganismos em alguns dias analisados. Coincidentemente, as significativas alterações na população de bactérias nos 24 primeiros dias após a aplicação se correlacionam com a baixa umidade do solo, uma vez que a precipitação também foi baixa para o período (Figura 25-B).

Nas amostras de solo coletadas no campo na camada de 0 a 20 cm, onde os inseticidas Thiamethoxan e Imidacloprid foram aplicados foram encontrados os seguintes gêneros e espécies de fungos: *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizoctonia*, *Verticillium*, *Cladosporium*, *Fusarium spp.* (Laboratório de Fitopatologia do INCAPER – Centro Serrano), para os três tratamentos após o nono dia de aplicação e não foram observadas alterações nas populações de fungos e de bactérias com a aplicação dos inseticidas via solo.



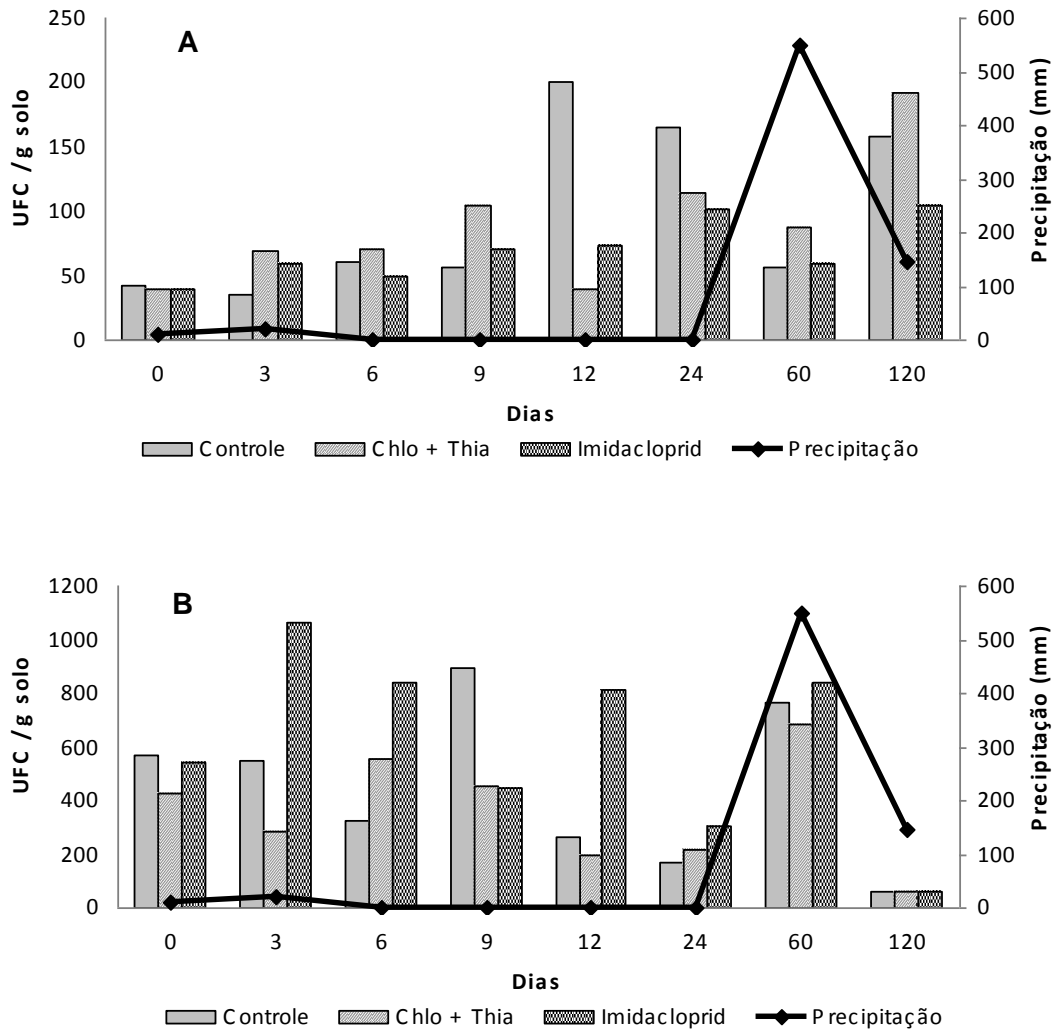


Figura 25. Unidades Formadoras de Colônias (UFC) para Fungos (A) e Bactérias (B) nos tratamentos sem aplicação (Controle) e com aplicação de inseticidas (Chlorantraniliprole + Thiamethoxan ou imidacloprid) no solo via *drench*, no controle de Bicho-mineiro a 0 (antes da aplicação) e 3, 6, 9, 12, 24, 60 e 120 DAP, em função da Precipitação (mm), em Anchieta, ES.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Eficiência dos Inseticidas no Controle do Bicho-mineiro

Os resultados (Tabela 11), no presente trabalho, mostram que vários fatores podem ter influenciado à baixa incidência da praga na área experimental como mostrado na Tabela 10. Uma delas pode ser creditada ao fato do produtor ter aplicado, na lavoura anexa, mistura do inseticida Thiamethoxan (300g/kg) mais o fungicida Cyproconazole (300g/kg). Além disso, o índice pluviométrico, segundo Matiello et al. (2005), é capaz de reduzir o índice de ataque de pragas devido a lavagem dos ovos após posturas na face superior da folha, o que ocorreu no presente estudo, já que entre janeiro e maio, o índice pluviométrico foi, em média, de 265 mm. Outros fatores importantes a serem considerados são a presença de predadores e parasitas que ocorrem naturalmente nas lavouras, principalmente nesse período, e o modo de aplicação via *drench* ou via gotejamento, que impedem que esses predadores sejam dizimados da região (PARRA et al., 1977; REIS & SOUZA, 1983; SOUZA, 1979).

Após estudos sobre forma de aplicação do inseticida Thiamethoxan WG, Souza et al., (2006) concluíram que os melhores resultados foram obtidos quando utilizado método de irrigação por gotejamento ou na forma de *drench*. A eficiência do inseticida persistiu por período de até 130 dias, ao contrário do Imidacloprid, também do grupo dos neonicotinóides, que mesmo após 120 dias, não apresentou resultado satisfatório. Resultados semelhantes foram observados no presente estudo, o que demonstra ser os meses de fevereiro e março, época ideal para aplicação dos inseticidas, já que o efeito negativo persistiu por 180 dias, resultando em percentual máximo de 2% de folhas minadas nas plantas controle.

## 6.2 Eficiência dos Inseticidas no Controle da Broca-do-café

Conforme Souza et al., (2008), a eficiência da mistura Chorrantraniliprole + Thiamethoxan, nas dosagens de 0,50 e 1,0 L/ha resultou em eficiência de 88,0% e 90,3% respectivamente, superior ao padrão Endosulfan (59,4%), no controle da broca-do-café. Os resultados, no presente estudo, demonstram que a eficiência para todos os tratamentos foi de apenas 40,49%, como demonstrado na Tabela 11, resultados esses diferentes dos obtidos pelos pesquisadores relacionados.

A contagem dos grãos brocados, realizada após a colheita, demonstrou que os tratamentos T1, T2, T3, T4 e T5 reduziram os níveis de infestação em até 78,5%, como apresentado na Tabela 12. Esses valores demonstram a eficiência dos inseticidas e corroboram com os resultados obtidos por Souza et al., (2008). Segundo Papa, et al., (2009), essa mesma mistura (Chlo + Thia), utilizada no controle do pulgão *Aphis gossypii* em algodoeiro, alcançou eficiência superior a 80%, o que demonstra sua importância no Manejo Integrado de Pragas (MIP) aos agrotóxicos atualmente usados, devido ao novo mecanismo de ação do inseticida.

## 6.3 Trocas Gasosas ( $A$ , $g_s$ e $E$ ) e as Relações ( $F_v/F_m$ e $RC/CS_o$ ) – Folha e Solo

Os resultados da Taxa Fotossintética Líquida ( $A$ ), da Condutância Estomática ( $g_s$ ), da Transpiração ( $E$ ) e da Relação  $F_v/F_m$  obtidos nas plantas Controle de café Conilon no período da manhã, variaram de 3,87 a 8,31  $\mu\text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de  $\text{CO}_2$  para  $A$ ; de 0,16 a 0,73  $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  para  $g_s$ ; de 5,53 a 14,53  $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  para  $E$  e de 0,11 a 0,81 a Relação  $F_v/F_m$ . Os valores de  $A$ , observados para o café Conilon podem ser considerados elevados, pois, segundo DaMatta (1997), as taxas fotossintéticas obtidas em cafeeiro Conilon cultivados no período de inverno e do verão, foram iguais a 2,8 e 4,9  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de  $\text{CO}_2$ , respectivamente.

Entretanto, Carvalho et al., (2001) ao estudarem a mesma espécie no período matutino do verão, obtiveram os valores  $4,3 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  de  $\text{CO}_2$  para  $A$ ;  $0,137 \text{ mol}\cdot\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  para  $g_s$ ;  $2,81 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  para  $E$  e  $0,736$  para a Relação  $F_v/F_m$ . Ao compararem a Eficiência Quântica do PSII entre as espécies arábica e robusta, os autores concluíram que valores maiores para do Conilon estão relacionados a maior capacidade do sistema antena, além do número e tipo de estômatos presentes nas folhas da espécie.

Entretanto, é importante ressaltar que os valores de  $A$  e  $g_s$ , obtidos no presente estudo, foram reduzidos após 48 horas da aplicação foliar dos inseticidas nos tratamentos T6 e T7, o que permite deduzir que concentrações elevadas de inseticidas, interferiram no metabolismo fotossintético de plantas de café Conilon. Tal ação foi por meio dos efeitos estomáticos, e em doses elevadas teve um efeito não-estomático via danos no PSII.

Porém, foi observado que doses menores dos inseticidas testados foram capazes de elevar o valor de  $A$ , quando comparado ao Controle, e ainda, induzir aumento da condutância para valores iguais ou superiores ao controle, o que demonstra o efeito inverso dos inseticidas, quando em concentrações elevadas.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Xia et al., (2006) ao estudarem nove pesticidas e seus efeitos sobre as trocas gasosas e fluorescência em pepino (*Cucumis sativus* L. cv. Jinvan Nº 4). Os autores observaram que o herbicida Paraquat foi responsável pelos sintomas mais graves na Fotossíntese Líquida, o que resultou na drástica inibição da Eficiência Quântica Máxima do PSII ( $F_v/F_m$ ). Em menor intensidade, agiram os outros inseticidas como Clorpirifos, que reduziu  $A$  em 81%, seguido pelo Abamectina com 40%, e finalmente o Imidacloprid que foi responsável pela redução em 36%. Em relação a  $g_s$ , os valores obtidos também foram consideráveis para chlorpirifos e Abamectina, que reduziram a condutância em 72 e 41%, respectivamente, ao contrário do Imidacloprid, que não promoveu qualquer alteração.

Em relação à taxa fotossintética líquida ( $A$ ), a utilização da mistura Chlorantraniliprole + Thiamethoxan, na maior concentração nas folhas, induziu nas plantas, uma recuperação a partir do terceiro dia de aplicação que persistiu até o décimo nono dia, valores esses maiores do que aqueles obtidos pela utilização do Endosulfan (Figura 12-F). Tal fato pode mostrar uma ação metabólica da planta, o que promoveu uma diminuição da ação intensa do produto. Resultados opostos foram observados em relação ao Rendimento Quântico ( $F_v/F_m$ ), que apresentou valores iguais ou menores durante os 19 dias do experimento (Figura 17-F).

A Concentração de Centros de Reação Ativos ( $RC/CS_o$ ), Figura 18-F, também teve alterações pelos inseticidas quando aplicados na folha, resultando na inativação de alguns centros de reação, o que pode causar uma diminuição do transporte de elétrons e aumento da dissipação da energia do sistema foliar, comprometendo assim a estrutura e a atividade do PSII.

Por outro lado, a quantificação dos resultados das aplicações via solo, devem ocorrer após o 19º dia, o que permite que os princípios ativos ajam na folha, e atinjam concentrações maiores que 0,4 ppm (SOUZA et al., 2006). Essa afirmativa corrobora com os resultados observados no presente trabalho, no quais os tratamentos T2 e T4, com Imidacloprid, induziram a redução nos valores da Taxa Fotossintética, após 19 dias de ensaio (Figura 12-S), enquanto que os mesmos tratamentos não alteraram os valores de  $g_s$ . Esses resultados estão de acordo com os descritos por Xia et al., (2006) ao fazerem uso do inseticida Imidacloprid.

Em relação ao crescimento vegetativo, é importante ressaltar os resultados obtidos por Barros et al., (1977), que verificaram a redução no crescimento vegetativo de café arábica nas estações de outono e inverno, na Zona da Mata de Minas. Os autores relacionaram as alterações observadas com o decréscimo da temperatura no período experimental e excluíram qualquer possibilidade de interferência da disponibilidade de água nos resultados. Os autores relacionaram ainda a taxa de crescimento com a condutância estomática e confirmaram uma proporcionalidade direta, no período de inverno,

com os estômatos permanentemente fechados, na maior parte do tempo. No presente estudo, a fase experimental ocorreu no mês de novembro, quando a temperatura variou entre  $31,6 \pm 4,5^{\circ}\text{C}$  a  $34,3 \pm 3,7^{\circ}\text{C}$ , no período matutino. Os valores das condutâncias (Figura 14) variaram entre o mínimo de  $0,14 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Dia 19) e máximo de  $0,92 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Dia 3). Dados estes, coerentes com os discutidos por Barros et al., (1977), que relacionaram a condutância e temperatura. O terceiro dia dos tratamentos chama atenção pelos resultados que apresentaram a mais elevada em ambos nos períodos da manhã e tarde (dados do período da tarde não mostrados).

Nossos resultados mostram ainda uma redução significativa da relação  $F_v/F_m$ , no período da manhã, naquelas plantas que receberam aplicação foliar do inseticida Endosulfan, em concentrações de 2,0 e 4,0 L/ha (Figura 17-F). Os dados confirmam a redução nos dias de avaliação, que foram o segundo, terceiro e décimo nono dia. Pinheiro et al., (2004), testaram o herbicida Paraquat, em clones tolerantes ou não à seca. Os autores observaram maior sensibilidade naqueles não-tolerantes, que apresentaram ainda um maior estresse oxidativo, ao contrário daqueles tolerantes, cujos valores de  $F_v/F_m$  foram mais expressivos, e mais resistentes ao estresse oxidativo.

#### 6.4 Atividade das Enzimas ACP, SOD e CAT na Folha (F) e no Solo (S)

Os resultados apresentados demonstram o potencial inibitório das misturas comerciais de Cho + Thia, Imidacloprid e do Endosulfan, utilizados como inseticidas no café nas enzimas estudadas. As alterações observadas nas atividades da SOD em folhas de café Conilon, aplicados tanto via foliar como via *drench* (Figura 22-F e S), influenciaram profundamente a resposta da enzima responsável por um dos mecanismos regulatório do metabolismo vegetal. A SOD catalisa a dismutação dos radicais superóxido e representa a enzima mais importante no processo de defesa celular e sua atuação regula as concentrações de  $\text{O}_2^-$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  no vegetal (MITTLER, 2002).

A atividade de SOD nas folhas de café Conilon, submetidas ao estresse químico, não foram capazes de desenvolver a defesa celular devido à resposta inibitória observada nas duas formas de tratamento. Esses resultados estão de acordo com os observados por vários autores ao exporem vegetais a diferentes estressores. Hernandez et al., (2001), por exemplo, relataram redução na atividade da SOD foliar em cultivar de ervilha, tanto na enzima contida nos cloroplastos quanto naquela extraída de mitocôndria, submetidas ao estresse salino.

Por outro lado, Cavalcanti et al.,(2004), relataram que o mesmo estressor não apresentou variações expressivas de atividade quando comparados ao controle. Os dados apresentados no presente trabalho sugerem que as alterações observadas nos tratamentos químicos não foram capazes de disparar o processo de defesa do organismo, muito pelo contrário, resultou em inibição da enzima.

Estudos realizados com clones 109A e 120 de café Conilon, exposto ao estresse do déficit de água, resultaram em tolerância diversa à geração de ROS, o que sugere que alterações enzimáticas dependem da espécie, do genótipo, das condições de crescimento, idade das plantas, período e intensidade do estresse (SGHERRI et al., 2000; LIMA et al. 2002). Os resultados do presente trabalho, permitem excluir a possibilidade das alterações serem decorrentes das variáveis sugeridas por Sgherri et al., (2000a), pois as plantas utilizadas no ensaio pertenciam a mesma espécie, mesmo genótipo, o mesmo porte de desenvolvimento, além de estarem sob condições ótimas de umidade, nutrição e temperatura.

É importante ressaltar que a inibição observada não está relacionada aos períodos de iluminação como descrito por Chaves et al., (2008), para café arábica, no qual, a atividade da SOD foi reduzida no mês de dezembro quando comparada ao mês de outubro. No presente trabalho, excluimos a variação de luminosidade pelo fato da exposição ter ocorrido ao longo de 4 dias, para detecção foliar e 19 dias para as alterações observadas para aplicação dos inseticidas via solo. Essa afirmativa é corroborada pelo controle da

luminosidade e umidade no ambiente experimental (Figura 6), o que permite excluir a influência destes fatores nas alterações enzimáticas.

Por outro lado, resultado contrário demonstra elevada atividade da SOD quando *Catharanthus roseus* (L.), foi exposta ao triadimefon (JALEEL et al., 2006). Nossos resultados permitem supor que as concentrações utilizadas induziram a formação de ROS, em concentração superior à capacidade de resposta do vegetal e que, fatores não-enzimáticos também auxiliam a defesa oxidativa do vegetal, como observado por Deuner et al., (2008), que demonstraram resposta inalterada da SOD quando folhas de cafeeiro foram suplantadas com ascorbato.

Outro aspecto a ser considerado no presente trabalho, é a resposta positiva para o fechamento estomático quando as folhas do café foram expostas a elevadas concentrações dos inseticidas (Figura 14-F). Esta resposta foliar coincidiu com maior percentual inibitório das enzimas estudadas, resultado semelhante ao descrito por Deuner et al., (2008), quando avaliaram a resposta da condutância estomática em café arábica, exposta ao ascorbato e peróxido de hidrogênio. A inibição das enzimas responsáveis pela defesa da planta resulta em maior concentração das ROS, que por sua vez são capazes de reduzir a abertura estomática, como observado no presente trabalho.

As enzimas catalases são conhecidas por sua capacidade em degradar  $H_2O_2$ , e em vegetais expostos ao estresse oxidativo, constata-se a elevação de sua atividade. O presente trabalho apresentou elevada atividade da catalase quando amostras do café Conilon foram expostas às concentrações de 0,25 L/ha, da mistura Chlo + Thia, via foliar e os tratamentos 0,75 L/ha da mesma mistura e 1,0 kg/ha de Imilacropid, via *drench* (Figura 23-F e S). Esses resultados permitem supor a necessidade do desencadeamento do sistema protetor do vegetal (FOYER et al., 1994), considerando que a degradação de  $H_2O_2$  pela catalase é a mais importante resposta relacionada à tolerância a uma variedade de agentes estressores, como descrito por Willekens et al., (1997) e Sairam et al., (1998).



Entretanto, a atividade da Catalase pode ser reduzida em condições na qual a degradação supera a capacidade de ressíntese pelo vegetal. Nos ensaios com elevadas concentrações dos inseticidas, a enzima mostrou-se inibida, o que permite supor que a Catalase não foi suficiente para acionar a defesa da planta contra a geração de radical peróxido; indicando resposta semelhante aos obtidos por Shim et al., (2003), ao exporem vegetal ao ácido salicílico.

Em presença de elevadas concentrações dos inseticidas, utilizadas no presente trabalho, a Catalase foi inibida de forma semelhante ao descrito para a SOD. Uma vez que a atividade da SOD está relacionada à formação de  $H_2O_2$  é possível supor que a inibição da primeira, resulte naturalmente na redução da atividade da segunda, Catalase, como constatado em nossos resultados e pelo fato da enzima ser inibida pelo substrato.

A Fosfatase ácida, por sua vez, apresentou-se inibida em todos os tratamentos, seja via foliar ou via *drench* (Figura 24-F e S). Esses resultados são semelhantes aos descritos por Skrebsky et al., (2008) em plantas de *Pfaffia glomerata*, expostas às concentrações crescentes de cádmio. Os autores associam a inibição enzimática ao fato das fosfatases serem metaloenzimas dependentes da  $Ca^{+2}$  ou  $Mg^{+2}$ , e substituídos pelo excesso do metal estudado. Por outro lado, a atividade também se mostra inibida em presença de  $Cu^{+2}$ , metal capaz de oxidar cadeias laterais da tirosina que integra o sítio ativo da enzima (KIM et al., 2000), além de  $Zn^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Al^{3+}$  e  $(MoO_4)^{2-}$ , como demonstrado por Garcia et al., (2004), em folhas do feijoeiro.

Entretanto, as fosfatases desempenham importante papel no metabolismo do fósforo e, independente do tipo cultivar, a atividade é reduzida na ausência ou em presença de pequenas concentrações de fosfato (Starnes et al, 2008). No presente estudo, a inibição da atividade catalítica não pode ser creditada às alterações nas concentrações de fosfato, já que análises do solo e das folhas das plantas de café Conilon apresentaram teores do nutriente igual a 64  $mg/dm^3$  e 2,1 g/kg, respectivamente, e com teores de Matéria Orgânica igual 5,29  $mg/dm^3$  (Tabelas 8e 9). Por outro lado, é possível sugerir que as alterações enzimáticas foram resultantes da ação dos inseticidas quando se

considera a atividade normal observada nos controles de ambos os tipos de ensaios. Entretanto, nos próximos estudos, é necessário determinar alterações de membrana, responsáveis pela geração de radicais livres, e sua relação com alterações no metabolismo celular.

## 6.5 Microbiota do Solo

Nos resultados obtidos não foram observadas alterações nas populações de fungos e de bactérias com a aplicação dos inseticidas via solo. Olson et al., (1984), ao pesquisarem o efeito da trifluralina no crescimento de microorganismos *in vitro*, observaram que das vinte espécies fúngicas estudadas, somente a *Mortierella isabellina* e duas espécies de *Penicillium*, apresentaram inibições quando em presença de concentrações superiores a 50 mg g<sup>-1</sup> do herbicida.

Os resultados do presente trabalho (Figura 25) demonstram a ocorrência de elevação do número de colônias de fungos e bactérias com o aumento do volume de precipitação na área de aplicação dos inseticidas no solo. Esses dados são corroborados com os obtidos por Cook & Greaves, (1987), que observaram atividade microbiológica máxima e variável entre as amostras, quando em períodos de chuva intensa.

Normalmente, a maior atividade biológica do solo, ocorre na camada de 0 a 20 cm de profundidade, região com maior acúmulo de matéria orgânica, onde as raízes influenciam consideravelmente nos organismos ali presentes (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Neste estudo, a avaliação da microbiota do solo (fungos e bactérias) foi realizada na camada de solo de 0 a 20 cm.

De acordo com Raí & Srivastava, (1981), variações sazonais de temperatura e umidade do solo afetam muito as comunidades biológicas do solo e sua atividade. Os autores observaram que a variação mensal na população microbiana (fungos e bactérias) do solo, estava diretamente relacionada à temperatura e a umidade do solo. Neste estudo também foi verificado que o

aumento da população microbiana do solo coincidiu com períodos de maior intensidade de chuva.

Os efeitos dos agrotóxicos sobre a microbiota podem ser negativos ou positivos e são muito variáveis e difíceis de serem avaliados no campo. Por isso, a avaliação e interpretação dos resultados devem ser criteriosas e com cautela. (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Domsch et al., (1983) analisando os resultados de 48 estudos, concluíram que os efeitos dos agrotóxicos sobre a biota do solo são de curta duração e semelhantes àqueles causados por estresses naturais, compactação do solo, predação microbiana e flutuações térmicas do solo. Domsch, (1984), avaliando estudos com 71 diferentes agrotóxicos, concluiu que a variação destas substâncias é dependente da natureza do produto, da dosagem, da frequência de aplicação, das condições ambientais (solo, clima, vegetação ou cultura) e do tipo de resposta microbiana empregada. Na etapa experimental de campo, no presente estudo, permitiu constatar que em determinados períodos, as UFC/g solo nos tratamentos com os inseticidas foram superiores àquelas do controle, o que mostra baixo impacto ambiental dos inseticidas aplicados na microbiota do solo.

## 7 CONCLUSÃO

- A nova mistura dos inseticidas Chlorantraniliprole + Thiamethoxan (Chlo + Thia), usado em lavoura de café Conilon, não apresenta diferenças quando comparado ao Imidacloprid e às plantas Controle no combate ao Bicho-mineiro.
- A aplicação dos inseticidas no solo pouco interferiu na população de fungos e bactérias, e aumento da umidade também aumentou a população microbiana.
- No controle da Broca-do-café, a correlação polinomial mostrou que a dose de 0,79 L/ha, da mistura Chlorantraniliprole + Thiamethoxan é a ideal para as condições do experimento, e tão eficiente quanto a concentração de 2,0 L/ha do Endosulfan.
- A aplicação dos inseticidas no Clone 02 de café Conilon da variedade Vitória, tanto via foliar como via *drench*, interferiu nas trocas gasosas e na fluorescência da clorofila *a*.
- Nas doses maiores dos inseticidas (Chlo + Thia) e Endosulfan os efeitos foram por ação estomática e não-estomática sobre o processo fotossintético.
- A geração de ROS, induzida pelos inseticidas, foi superior à capacidade de defesa da célula pela SOD, o que resultou em inibição enzimática.
- A ativação da CAT, em pequenas concentrações dos inseticidas, induz a defesa antioxidante do vegetal.
- A liberação de fosfato pela ACP, importante evento na atividade metabólica do vegetal, sofre influência pela presença dos inseticidas estudados.

## 8 REFERÊNCIAS

- 1 ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 18, p. 265-267, 1925.
- 2 ANDEF – **Associação Nacional de Defesa Vegetal**. “Disponível em”: [“<www.andef.com.br>”](http://www.andef.com.br). “Acesso em:” 10/03/2010.
- 3 ANTUNES-KENYON, S. E. & KENNEDY, G. Thiamethoxam: a new active ingredient review. Boston: **Massachusetts Pesticides Bureau**, Department of Food Agriculture. p. 37, 2001.
- 4 ANDALÓ, V.; MOINO JUNIOR, A.; SANTA-CECÍLIA, L. V. C.; SOUZA, G. C. Compatibilidade de *Beauveria bassiana* com agrotóxicos visando o controle da cochonilha-da-raiz do cafeeiro, *Dysmicoccus texensis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae). **Neotropical Entomology**, Itabuna, v. 33, n. 4, p. 463-467, 2004.
- 5 APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 19 th, edn. American Public Health Association. Washington, D.C., 1995.
- 6 ARAUJO, W. L.; DIAS, P. C.; MORAES, G. A. B. K.; CELIN, E. F.; CUNHA, R. L.; BARROS, R. S.; DaMATTA, F. M. Limitations to photosynthesis in coffee leaves from different canopy positions. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 10, p. 884-890, 2008.
- 7 ASADA, K. & TAKAHASHI, M. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In **Photoinhibition** (Kyle, D.J. *et al.*, eds), p. 227–287. 1987.
- 8 BAIRD, C. **Química Ambiental**. 2ª ed. Porto Alegre. Bookman, p. 315-400, 2002.

- 9 BARROS, R. S.; MOTA, J. W. S.; DaMATTA, F. M.; MAESTRI, M. Decline of vegetative growth in *Coffea arabica* L. in relation to leaf temperature, water potential and stomatal conductance. **Field Crops Research**, v. 54, p. 65–72, 1997.
- 10 BARRED, A. J. Lysosomal enzymes. IN: DINGLE, J. T. (Ed.), *Lysosomes: A. Laboratory Handbook*. North- Holland, Amsterdam, p. 46-135, 1972.
- 11 BARBIERI, E. **Pesticidas**: um problema grave de saúde pública e ambiental. 2006. Disponível em: < <http://abdl.org.br/article/view/2683/1/152>>. Acesso em 06 dez. 2007.
- 12 BARREIROS, A. L. B. S. & DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- 13 BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M.; LAMAS, C. Effect of thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. **Neotropical Entomology**, Itabuna, v. 30, n. 3. p. 437-447, 2001.
- 14 BELING, R.R. (Ed.). **Anuário Brasileiro do Café**. 2005. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2005.
- 15 BERTONI, J. & LOMBARDI-NETO, F. Fatores que influem na erosão. In: BERTONI, J. & LOMBARDI-NETO, F. *Conservação do solo*. 3ªed. São Paulo, **Icone**, p. 45-67, 1993.
- 16 BHANTI, M. & TANEJA, A. Contamination of vegetables of different seasons with organophosphorus pesticides and related health risk assessment in northern India. **Chemosphere**, v. 69, p. 63-68, 2007.

- 17 BEUTLER, E. **A Manual of Biochemical Methods**. 2<sup>a</sup> ed. New York. Grune & Stratton. 1975.
- 18 BOWLER, C.; VAN MONTAGU, M.; INZE, D. Superoxide dismutase and stress tolerance, **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 43, p. 83–116, 1992.
- 19 BRUN, L. O.; MARCILLAUD, C.; GAUDICHON, V.; SUCKLING, D. M. Endosulfan resistance in *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) in New Caledonia. **Journal of Economic Entomology**, v. 82, p. 1311–1316, 1989.
- 20 BUSTILLO, A. E. El papel del control biológico en el manejo integrado de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). **Revista Académica Colombiana Científica**, v. 29, p. 55–68, 2005.
- 21 CAMPOSTRINI, E. & MAESTRI, M. Photosynthetic potencial of Five genotypes of coffee canephora PIERRE. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 10, n. 1, p. 13-18, 1998.
- 22 CANNELL, M. G. R. Physiology of coffee crop. In: CLIFFORD, M. N.; WILSON, K. C. (Eds.). **Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage**. London, Croom Helm, p. 108-134, 1985.
- 23 CÁRDENAS, M. R. & POSADA, F. F. J. Los insectos y otros habitantes de cafetales y platanales. **Comité Departamental de cafeteros del Quindío-Cenicafé**, Armenia, Colombia, 2001.
- 24 CARELLI, M. L. C.; FAHL, J. I.; TRIVELIN, P. C. O.; QUEIROZ-VOLTAN, R. B. Carbon isotope discrimination and gas exchange in *Coffea* species grown under different irradiance regimes. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 11, p. 63–68, 1999.

- 25 CARVALHO, L. M. C.; SILVA, E. A. M.; AZEVEDO, A. A.; MOSQUIM, P. R.; CECON, P. R. Aspectos morfofisiológicos das cultivares de cafeeiro Catuaí Vermelho e Conilon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, 2001, v. 36, p. 411-416.
- 26 CASTLE, S.; PALUMBO, J.; PRABHAKER, N. Newer insecticides for plant virus disease management, **Virus Research**, v. 141, p. 131-139, 2009.
- 27 CAVALCANTI, F. R.; OLIVEIRA, J. T. A.; MARTINS-MIRANDA, A. S.; VIÉGAS, R. A.; SILVEIRA, A. G. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. **New Phytologist**, v. 163, p. 563-571, 2004.
- 28 CHAVES, A. R. M.; TEM-CATEN, A.; PINHEIRO, H. A.; RIBEIRO, A.; DaMATTA, F. M. Seasonal changes in photoprotective mechanisms of leaves from shaded and unshaded field-grown coffee (*Coffea arabica* L.) trees. **Trees**, v. 22, p. 351-361, 2008.
- 29 CHEN, S. K. & EDWARDS, C. A. A microcosm approach to assess the effects of fungicides on soil ecological processes and plant growth: comparisons of two soil types. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, p. 1981-1991, 2001.
- 30 COLEMAN, J.O.; BLAKE-KALFF, M.M.; DAVIES, T.E. Detoxification of xenobiotics by plants: Chemical Modification and Vacuolar Compartmentation. Reviews: **Trends in Plant Science**, v. 4, p. 144-151, 1997.
- 31 COMPÊNDIO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS: **Guia prático de produtos fitossanitários para uso agrícola**. 7ª ed., São Paulo: Organizações Andrei, 2005.
- 32 CONAB – **Companhia Nacional de Abastecimento**. 1ª estimativa de safra brasileira de café de 2010. “Disponível em:” “<[www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br)>”. “Acesso em:” 07/01/2010.



- 33 COOK, K. A. & GREAVES, M.P. Natural variability in microbial activities. In: Somerville L, Greaves MP (eds) **Pesticide effects on soil microflora**. Taylor and Francis, London New York Philadelphia, p. 15-43, 1987.
- 34 CORONADO, R.; MORRISSETTE, J.; SUKHAREVA, M.; VAUGHAN, D.M. Structure and function of ryanodine receptors. **American Journal of Physiology**, v. 266, p. 1485–1504, 1994.
- 35 DaMATTA, F. M. & MAESTRI, M. Photoinhibition and recovery of photosynthesis in *Coffea arabica* and *C. canephora*. **Photosynthetica**, v. 34, p. 439-446, 1997.
- 36 DaMATTA, F. M.; MAESTRI, M.; BARROS, R. S. Photosynthetic performance of two coffee species under drought. **Photosynthetica**, v. 34, p. 257–264, 1997a.
- 37 DaMATTA, F. M.; SILVEIRA, J. S. M.; DUCATTI, C.; LOUREIRO, M. E. Eficiência do uso da água e tolerância à seca em *Coffea canephora*. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2000, 1. Poços de Caldas, MG. **Anais...** Brasília: Embrapa Café, 2000, p. 907-910.
- 38 DaMATTA, F. M. & RENA, A. B. Tolerância do café à seca. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Tecnologia de produção de café com qualidade**. Universidade Federal de Viçosa, MG, p. 65-100, 2001.
- 39 DaMATTA, F. M.; LOOS, R. A.; RORIGUES, R.; BARROS, R. S. Actual and potencial photosynthetic rates of tropical crop species. **Brasilian Journal of Plant Physiology**, v. 13, p. 24-32, 2001a.
- 40 DaMATTA, F. M. Ecophysiological constraints on the production of shaded and unshaded coffee: a review. **Field Crops Research**, v. 86, p. 99-114, 2004a.

- 41 DaMATTA, F. M. Exploring drought tolerance in coffee: a physiological approach with some insights for plant breeding. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 16, p. 1-6, 2004b.
- 42 DaMATTA, F. M. & RAMALHO, J. D. C. Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, p. 55-81, 2006.
- 43 DaMATTA, F. M.; RONCHI, C. P.; MAESTRI, M. BARROS, R. S. Ecophysiology of coffee growth and production. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n.4, p. 485-510, 2007.
- 44 DaMATTA, F. M.; CUNHA, R. L.; ANTUNES, W. C.; MARTINS, S. C. V.; ARAUJO, W. L.; FERNIE, A. R. MORAES, G. A. B. K. In field-grown coffee trees source–sink manipulation alters photosynthetic rates, independently of carbon metabolism, via alterations in stomatal function. **New Phytologist**, v. 178, p. 348-357, 2008.
- 45 DAMON, A. A review of the biology and control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 90, p. 453–465, 2000.
- 46 DAT, J.; VANDENABEELE, S.; VRANOVA, E.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D.; VANBREUSEGEM, F. dual action of the active oxygen species during plant stress. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 57, p. 779-795, 2000.
- 47 DE LA ROSA, W., ALATORRE, R., TRUJILLO, J., BARRERA, J. F. Virulence of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes) strains against the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 90, p. 1531–1538, 1997.
- 48 DE MUNER, L. H.; MARTINS, D. dos S.; FORNAZIER, M. J.; ARLEU, R. J.; BENASSI, V. L. R. M. **Programa de manejo da broca-do-café no Estado do Espírito Santo**. Vitória, ES: Emcaper (Emcaper – folder), 2000. 6p.

- 49 DE MUNER, L. H.; FORNAZIER, M. J.; SCHMIDT, H. C.; DESSAUNE FILHO, N.; CARNIELLI, P. H. Características da cafeicultura de arábica de base familiar no Espírito Santo: Aspectos sociais. **Anais...** Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, Araxá, 2009, p. 279-280.
- 50 DEUNER, S.; ALVES, J. D.; FRIES, D. D.; ZANANDREA, I.; LIMA, A. A.; HENRIQUE, P. de C.; GOULART, P. de F. P. Peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico influenciando a atividade de enzimas antioxidantes de mudas de cafeeiro. **Revista Ceres**, v. 55, n. 2, p. 135-140, 2008.
- 51 DOMSCH, K. H. Effects of pesticides and heavy metals on biological processes in soil. **Plant and Soil**, v. 76, p. 367-378, 1984.
- 52 DOMSCH, K. H.; JAGNOW, G.; ANDERSON, T. H. An ecological concept for the assessment of side-effects of agrochemicals on soil microorganisms. **Residue Reviews**, v. 86, p. 65-105, 1983.
- 53 DOS PRAZERES, J. N.; FERREIRA, C. V.; AOYAMA, H. Acid phosphatase activities during the germination of *Glycine Max* seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, p. 15-20, 2004.
- 54 DU, D.; HUANG, X.; CAI, J. ZHANG, A. Comparison of pesticide sensitivity by electrochemical test based on acetylcholinesterase biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, p. 285-289, 2007.
- 55 DUFF, S. M. G.; SARATH, G.; PLAXTON, W. C. The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. **Physiology Plant**, v. 90, p. 791–800, 1994.
- 56 DURHAM, S. Stopping the coffee berry borer from boring into profits. **Agricultural Research Magazine**, v. 52, p. 10–11, 2004.

- 57 EPA – **Environmental Protection Agency (US)**. Office to Prevention, Pesticides and Toxic Substances. April, 2008. 750p.
- 58 FAHL, J. I.; CARELLI, M. L. C.; VEGA, J.; MAGALHÃES, A. C. Nitrogen and irradiance levels affecting net photosynthesis and growth of young coffee plants (*Coffea arabica* L.). **Journal of Horticulture Science**, Ashford, v. 69, p. 161-169, 1994.
- 59 FAHL, J. I.; CARELLI, M. L. C.; MENEZES, H. C.; GALLO, P. B.; TRIVELIN, P. C. O. Gas exchange, growth, yield and beverage quality of *Coffea arabica* cultivars grafted on to *C. canephora* and *C. congensis*. **Experimental Agriculture**, v. 37, p. 242–252, 2001.
- 60 FANJUL, L.; ARREOLA, R. R.; MENDEZ, C. M. P. Stomatal responses to environmental variables in shade and sun-grown coffee plants in Mexico. **Experimental Agriculture**, v. 21, p. 249–258, 1985.
- 61 FATTMAN, C. I.; SCHAEFER, L. M.; OURY, T. D. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 35, p. 236-256, 2003.
- 62 FERRAO, R. G. **Biometria aplicada ao melhoramento genético do café Conilon**. 2004. 256 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.
- 63 FERREIRA, C. V.; GRANJEIRO, J. M.; TAGA, E. M. AOYAMA, H. Purification and characterization of multiple forms of soybean seed acid phosphatase. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 36, p. 487–494, 1998.
- 64 FONSECA, A. F. A. da.; FERRÃO, M. A. G.; FERRÃO, R. G.; VERDIN FILHO, A. C.; VOLPI, P. S.; ZUCATELI, F. **Conilon Vitória – ‘Incaper 8142’**: variedade clonal de café Conilon. Vitória, ES: Incaper, 2004c, 24p. (Incaper. Documento, 127).

- 65 FORNAZIER, M. J.; DE MUNER, L. H.; SUNDERHUS, A. B.; BAUTZ, A. Amostragem de campo da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867), em pós-colheita de café arábica (*Coffea arábica*) e Conilon (*Coffea canephora*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIEIRAS, 26º, 2000, Marília, SP. **Anais...** Marília, 2000, p. 179-180.
- 66 FORNAZIER, M. J.; MARTINS, D. dos S.; DE MUNER, L. H. A broca-do-café no Espírito Santo – Safra Agrícola 2000/2001. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIEIRAS, 27º; 2001, Uberaba, MG. **Anais...** Uberaba, 2001a, p. 240-242.
- 67 FORNAZIER, M. J.; MARTINS, D. dos S.; DE MUNER, L. H.; ARLEU, R. J.; BENASSI, V. L. R. M.; OLIVEIRA, G. M. Danos da broca-do-café em café Conilon, em nível de propriedade agrícola, no Estado do Espírito Santo – Safra Agrícola 99/00. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2º, 2001. Vitória, ES. **Anais...** Brasília: Embrapa Café, 2002. CD-ROM: II. Consórcio Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 2001b, p. 1466-1470.
- 68 FOYER, C. H.; DESCOURVIERES, P.; KUNERT, K. J. Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. **Plant, Cell & Environment**, v. 17, p. 507-523, 1994.
- 69 FRANCO, C. M. Relation between chromosome number and stomata in *Coffea*. **Botanical Gazette**, v. 100, p. 817–827, 1939.
- 70 FRIES, L. L. M.; McKNIGHT, T. D.; GRIFFING, L. R. Phosphorus effect on phosphate activity in endomycorrhizal maize. **Physiologia Plantarum**, v. 103, p. 162-171. 1992.
- 71 GALLO, D.; NAKANO O.; SILVEIRA-NETO S.; CARVALHO R. P. L.; BAPTISTA G. C.; BERTI-FILHO E.; PARRA J. R. P.; ALVES S. B.; VENDRAMIN J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES J. R. S. & OMOTO C. **Manual de Entomologia Agrícola**. Piracicaba, FEALQ, 2002.

72 GARCÍA, N. A. T.; OLIVEIRA, M.; IRIBARNE, C.; LLUCH, C. Partial purification and characterization of a non-specific acid phosphatase in leaves and root of *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, p. 585-591, 2004.

73 GAYNOR, J.D.; MACTAVISH, D.C.; FINDLAY, W.I. Surface and sub-surface transport of atrazine and alachlor from a Brookston clay loam under continuous corn production. **Archives Environmental Contamination Technology**, v. 23, p. 240-245, 1992.

74 GELLATLY, K.; MOORHEAD, G. B. G.; DUFF, S. M. G.; LEFEBVRE, D. D.; PLAXTON, W.; PLAXTON, C. Purification of a potato tuber acid phosphatase having characteristics of a protein tyrosine phosphatase. **Plant Physiology**, v. 106, p. 223–232, 1994.

75 GENTZ, M. C.; MURDOCH, G.; KING, G. F. Tandem use of selective insecticides and natural enemies for effective, reduced-risk pest management. **Biological Control**, v. 52, p. 208-215, 2009.

76 GIL-DEL VALLE, L.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G.; GONZÁLEZ-BLANCO, I.; PÉREZ-AVILA, L. J. Estrés oxidativo: mecanismos generales involucrados y su relación con El virus de La inmunodeficiencia humana. **Bioquímica**, v. 24, p. 85-93, 1999.

77 GRANJEIRO, P. A.; FERREIRA, C. V.; GRANJEIRO, J. M.; TAGA, E. M.; AOYAMA, H. Purification and kinetic properties of a castor bean seed acid phosphatase containing sulfhydryl groups. **Physiologia Plantarum**, v. 107, p. 151– 158, 1999.

78 GRANJEIRO, P. A.; VERÍSSIMA, C. F.; AOYAMA, H. Uso de fosfatase ácida como biomarcador durante a germinação de sementes de mamona (*Ricinus communis*). **Engenharia Ambiental**, v. 5, n. 3, p. 307-322, 2008.

- 79 GRATÃO, P. L.; POLLE, A.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, v. 32, p.481-494, 2005.
- 80 GUO, J. & PESACRETA, J. C. Purification and characterization of an acid phosphatase from the bulb of *Allium cepa* L. var. sweet Spanish. **Journal Plant Physiology**, v. 151, p. 520–527, 1997.
- 81 GUTIE'RREZ, M. V.; MEINZER, F. C.; GRANTZ, D. A. Regulation of transpiration in coffee hedgerows: covariation of environmental variables and apparent responses of stomata to wind and humidity. **Plant Cell Environmental**, v. 17, p. 1305–1313, 1994.
- 82 HAEHNE, W.; NAIRD, J.A.; REISBERG, P.; SAUER, K. Picosecond fluorescence kinetics and transfer in chloroplast and algae. **Biochemistry and Biophysical Acta**, v. 1, p. 161-173, 1982.
- 83 HERNÁNDEZ, M. P.; COCK, J. H.; EI-SHARKAWY, A. The responses of leaf gas exchange and stomatal conductance to air humidity in shade-grown coffee, tea and cacao plants as compared with sunflower. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 1, p. 155–161, 1989.
- 84 HERNÁNDEZ, J. A.; FERRER, M. A.; JIMÉNEZ, A.; BARCELÓ, A. R.; SEVILLA, F. Antioxidant systems and  $O_2^-/H^2O^2$  production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. **Plant Physiology**, v. 127, p.817-831, 2001.
- 85 HOSE, G. C., LIM, R. P., HYNE, R. V. The transport, fate and effects of endosulfan in the Australian freshwater environment. **Australas Journal Ecotoxicology**, v. 9, p. 101–111, 2003b.
- 86 HUMERICKHOUSE, R. A.; BESCH, H. R.; GERZON, K.; RUEST, L.; SUTKO, J. L.; EMMICK, J.T. Differential activating and deactivating effects of natural ryanodine congeners on the calcium release channel of sarcoplasmic

reticulum: evidence for separation of effects at functionally distinct sites. **Molecular Pharmacology**, v. 44, p. 412–421, 1993.

87 JALEEL, C. A.; GOPI, R.; LAKSHMANAN, G. M. A.; PANNEERSELVAM, R. Triadimefon induced changes in the antioxidant metabolism and ajmalicine production in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Plant Science**, v. 171, p. 271-276, 2006.

88 JESCHKE, P. & NAUEN, R. Neonicotinoids—from zero to hero in insecticide chemistry. **Pest Management Science**, v. 64, p. 1084–1098, 2008.

89 JONES, H. G. **Plants and microclimate: A quantitative approach to environmental plant physiology**. Second Edition. Cambridge University Press. 1992, 85p.

90 KANECHI, M.; UCHIDA, N. U.; YASUDA, T.; YAMAGUCHI, T. Water stress effects on leaf transpiration and photosynthesis of *Coffea arabica* L. under different irradiance conditions. In: Proceedings of the 16th International Scientific Colloquium on Coffee, Kyoto. **Association Scientifique Internationale du Café**, Paris, p. 520–527, 1985.

91 KAUSE, G.H. & WEISS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 42, p. 313-359, 1991.

92 KERTULIS-TARTAR, G.M., RATHINASABAPATHI, B., MA, L. Q. Characterization of glutathione reductase and catalase in the fronds of two *Pteris* ferns upon arsenic exposure. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, p. 960-965, 2009.

93 KIM, J. H.; CHO, H.; RYU, S. E.; CHOI, M. U. Effects of metal ions on the activity of protein tyrosine phosphatase VHR: highly potent and reversible oxidative inactivation by Cu<sup>2+</sup> ion. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 382, p. 72-80, 2000.



- 94 KNEER, R. & ZENK, M. H. Phytochelatins protect plant enzymes from heavy metal poisoning. **Phytochemistry**, v. 31, p. 2663–2667, 1992.
- 95 KRAUSE, G. H. & WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 313-349, 1991.
- 96 KUMAR, D. & TIESZEN, L. L. Photosynthesis in *Coffea arabica*. I. Effects of light and temperature. **Experimental Agriculture**, v. 16, p. 13–19, 1980.
- 97 LAHM, G. P.; CORDOVA, D.; BARRY, J. D. New and selective receptor activators for insect control. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 4127-4133, 2009.
- 98 LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos, RiMa, 2000.
- 99 LAVORENTI, A.; PRATA, F.; REGITANO, J. B. Comportamento de pesticidas em solo – Fundamentos. In: CURI, N.; MARQUES, J. J.; GUILHERME, L. R. G.; LIMA, J. M. de; LOPES, A. S.; ALVAREZ, V. V. H. (Ed.). **Tópicos em Ciência do Solo**, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, v. 3, p. 335-340, 2003.
- 100 LEONARD, A. W., HYNE, R. V., LIM, R. P., LEIGH, K. A., LE, J., BECKETT, R. Fate and toxicity of endosulfan in the Namoi River water and bottom sediment. **Journal of Environmental Quality**, v. 30, p. 750–759, 2001.
- 101 LERCH, R.N. & BLANIARD, P.E. Watershed vulnerability to herbicide transport in northern Missouri and southern Iowa streams. **Environmental Science & Technology**, v. 37, p. 5518-5527, 2003.
- 102 LIMA, A. L. S.; DaMATTA, F. M.; PINHEIRO, H. A.; TOTOLA, M. R.; LOUREIRO, M. E. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. **Environmental and Experimental Botany**, v. 47, p. 239-247, 2002.

- 103 LOWRY, O. H. et al. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- 104 McCORD, J. M. & FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte cytochrome b<sub>5</sub> (hemocyanin). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969.
- 105 MATIELLO, J. B.; SANTINATO, R.; GARCIA, A. W. R.; ALMEIDA, S. R.; FERNANDES, D. R. **Cultura do café no Brasil**. Manual de Recomendações. Ed. MAPA/PROCAFÉ, Varginha, MAPA/Fundação Procafé, Varginha, 2005.
- 106 MARTÍNEZ-CAYUELA, M. Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. **Ars Pharmaceutica**, v. 39, p. 5-18, 1998.
- 107 MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Science**, v. 7, p. 405–410. 2002.
- 108 MOREIRA, F. M. S. & SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras, Ed. UFLA, 2ª ed., 2006.
- 109 NIKI, E. Antioxidants in relation to lipid peroxidation. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 44, p. 227- 253, 1987
- 110 NIYOGI, K. K. Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches, Annu. Rev. Plant Physiol. **Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 333–359, 1999.
- 111 NUNES, M. A. Environmental effects of stomatal and mesophyll regulation of photosynthesis in coffee leaves. **Photosynthetica**, v. 22, p. 547–553, 1988.
- 112 NUNES, M. A.; RAMALHO, J. D. C.; DIAS, M. A. Effect of nitrogen supply on the photosynthetic performance of leaves from coffee plants exposed

to bright light. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 44, n. 262, p. 893-899, 1993.

113 OLSON, B. M.; MCKERCHER, R. B.; GERMIDA, J. J. Microbial populations in trifluralin-treated soil. In: TINSLEY, J.; DARBYSHIRE, J. F. (Ed.). **Biological processes and soil fertility**. The Hague: Martinus Nijhoff and Junk publishers, p. 379-400, 1984.

114 PAPA, G.; OLIVEIRA, M. S.; TAKAO, W.; MACEDO, G. de C.; NANUCI, R. L. Atividade da mistura dos inseticidas chorantraniliprole + thiamethoxam, no controle do pulgão, *Aphis gossypii* (Hemíptera: Aphididae), na cultura do algodoeiro. **Anais...** VII Congresso Brasileiro do Algodão, Foz do Iguaçu, PR, 2009, p. 719-723.

115 PATTY, L.; REAL, B.E.; GRILL, J. J. The use of grassed buffer strips to remove pesticides, nitrates and soluble phosphorus compounds from runoff water. **Pesticide Science**, v. 49, p. 243-251, 1997.

116 PARRA, J. R. P.; GONÇALVES, W.; GRAVENA, S.; MARCONATO, A. R. Parasitos e predadores do bicho-mineiro *Perileucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville, 1842) em São Paulo. **Anais...** Sociedade Entomológica do Brasil, Itabuna, 1977, v. 6, n. 1, p. 138-143.

117 PAULINI, A. E. & PAULINO, A. J. Evolução de *Hyphotenemus hampei* (Ferrari, 1867) em café Conilon armazenado e influência da infestação na queda de frutos. **Anais...** Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, Araxá, 1979.

118 PERES, F.; OLIVEIRA-SILVA, J. J.; DELLA-ROSA, H. V.; LUCCA, S. R. Desafios ao estudo da contaminação humana e ambiental por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 10, p. 27-37, 2005.

119 PINHEIRO, H. A.; BORGES, R.; PEDRON e SILVA, M. A.; CENTENO, D. C. Activity of alternative oxidase and plant uncoupling mitochondrial protein

in potato tubers stored at low temperature or submitted to artificial aging. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 16, n. 2, p. 69-76, 2004.

120 PINHEIRO, H. A.; DaMATTA, F. M.; CHAVES, A. R. R.; LOUREIRO, M. E. Drought tolerance is associated with rooting depth and stomatal control of water use in clones of *Coffea canephora*. **Annals of Botany**, v. 96, p. 101-108, 2005.

121 PINHEIRO, H. A.; DaMATTA, F. M.; CHAVES, A. R. R.; FONTES, E. P. B.; LOUREIRO, M. E. Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. **Planta Science**, v. 167, p. 1307-1314, 2004.

122 POLLE, A. Dissecting the superoxide dismutase–ascorbate peroxidase–glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. **Plant Physiology**, v. 126, p. 445–462. 2001.

123 POSADA, F. & VEGA, F. A new method to evaluate the biocontrol potential of single spore isolates of fungal entomopathogens. **Journal Insect Science**, v. 5, n.37, p.10, 2005.

124 RAÍ, B. & SRIVASTAVA, K. Studies on microbial population of a tropical dry deciduous Forest soil in relation to soil respiration. **Pedobiologia**, Jena, v. 22, n. 2, p. 185-190, 1981.

125 REIS, P. R. & SOUZA, J. C. de. Controle biológico do bicho-mineiro das folhas do cafeeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 9, n. 104, p. 16-20, 1983.

126 REIS, P. R. & SOUZA, J. C. Manejo Integrado do bicho-mineiro do cafeeiro *Perileucoptera coffeella* (Guérin-Ménéville) (Lepidóptera: Lyonitiidae), e seu reflexo na produção de café. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 25, n. 1, p. 77-82, 1996.

- 127 REIS, P. R. & SOUZA, J. C. de. Manejo integrado das pragas do cafeeiro em Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 19, p. 17-25, 1998.
- 128 SAIRAM, R. K.; DESHMUKH, P. S.; SAXENA, D. C. Role of antioxidant system in wheat genotypes tolerance to water stress. **Biologia Plantarum**, v. 41, p. 387-394, 1998.
- 129 SCHROLL, R.; LANGENBACH, T.; CAO, G.; DÖRFLER, U.; SCHNEIDER, P.; SCHEUNERT, I. Fate of (<sup>14</sup>C)-terbutylazine in soil-plant systems. **Science of the Total Environment**, v. 124, p. 377-389, 1992.
- 130 SGHERRI, C.L.; MICHADA, M.; FLAVIA, M. I. Antioxidative enzymes in wheat subjected to increasing water deficit and rewatering. **Journal Plant Physiology**, v. 157, p. 270–273, 2000.
- 131 SGHERRI, C. L. M.; MAFFEI, M.; NAVARI-IZZO, F. Antioxidative enzymes in wheat subjected to increasing water deficit and rewatering. **Journal Plant Physiology**, v. 157, p. 273–279, 2000a.
- 132 SHIM, I. S.; MOMOSE, Y.; YAMAMOTO, H. A.; KIM, A. D. W.; USUI, K. Inhibition of catalase activity by oxidative stress and its relationship to salicylic acid accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 39, p.285-292, 2003.
- 133 SHINANO, T.; YONETANI, R.; USHIHARA, N.; ADACHI, H.; WASAKI, J.; MATSUI, H.; OSAKI, M. Characteristics of phosphoenolpyruvate phosphatase purified from *Allium cepa*. **Plant Science**, v. 161, p. 861–869, 2001.
- 134 SIES, H. Stress II Oxidants and Antioxidants. **Academic Press**. London (London, UK). 1991.

135 SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, p. 213-219, 1993

136 SILVA, E. A.; DaMATTA, F. M.; BARROS, R. S.; REGAZZI, A. J. Periodicidade do crescimento vegetativo em *Coffea arabica* L.: relações com a fotossíntese em condições de campo. In: **Resumos Expandidos** do I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Poços de Caldas (MG). Embrapa Café, Brazil, 2000, p. 65–68.

137 SKREBSKY, E. C.; TABALDI, L. A.; PEREIRA, L. B. RAUBER, R.; MALDANER, J.; CARGNELUTTI, D.; GONÇALVES, J. F.; CASTRO, G. Y.; SHETINGER, R. C.; NICOLOSO, F. T. Effect of cadmium on growth, micronutrient concentration, and  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase and acid phosphatase activities in plants of *Pfaffia glomerata*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 20, n. 4, p. 285-294, 2008.

138 SOARES, S. F.; DE MUNER, L. H.; FORNAZIER, M. J.; MARTINS, D. dos S.; SILVA, A. E. S.; SALGADO, J. S. Difusão e transferência de tecnologia para a cultura do cafeeiro no Estado do Espírito Santo: Manejo da broca-do-café. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2º, Vitória, ES. **Anais...** Brasília: Embrapa Café 2002. CD-ROM: Consórcio Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 2001, p. 2076-2079.

139 SOUZA, J. C. de. **Levantamento, identificação e eficiência dos parasitos e predadores do bicho-mineiro das folhas do cafeeiro, *Perileucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville, 1842) Lepidoptera: Lyonetiidae) no Estado de Minas Gerais.** 1979. 91 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1979.

140 SOUZA, J. C. & REIS, P. R. **Broca-do-café.** Histórico, reconhecimento, biologia, prejuízos, monitoramento e controle. Belo Horizonte (Brasil): EPAMIG, (EPAMIG. Boletim Técnico, 50), p. 1-40, 1997.

141 SOUZA, J. C.; Reis P. R.; RIGITANO, R. L. O. de. **Bicho-Mineiro do cafeeiro: biologia, danos e manejo integrado**. Boletim Técnico, Epamig. Belo Horizonte, 2 ed., n. 54, p. 1-48, 1998.

142 SOUZA, J. C.; REIS, P. R.; RIGITANO, R. L. O.; CIOCIOLA JUNIOR, A. I. Eficiência de thiamethoxam no controle do bicho-mineiro do cafeeiro. I – Influência da modalidade de aplicação. **Coffee Science**, v. 1, n. 2, p. 143-149, 2006.

143 SOUZA, J. C.; REIS, P. R.; RIGITANO, R. L. O.; CIOCIOLA JUNIOR, A. I. Eficiência de thiamethoxam no controle do bicho-mineiro do cafeeiro. II – Influência da época de aplicação via irrigação por gotejamento. **Coffee Science**, Lavras, v. 1, n. 2, p. 150-155, 2006.

144 SOUZA, J. C.; SILVA, R. A.; REIS, R. A.; ALEXANDRE JUNIOR, W. R.; MESQUITA, DN, N. Eficiência do inseticida chlorantraniliprole aplicado em misturas com os inseticidas Thiamethoxan e Abamectina em pulverização, no controle da broca-do-café. **Anais...** Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, Caxambu, 2008, p. 359.

145 STRASSER, B. J. & STRASSER, R. J. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP- Test. *In: Photosynthesis: from light to biosphere*. Mathis, P (ed). The Netherlands: **Kluwer Academic Publishers**, v. 5, p. 977–980, 1995.

146 STARNES, D. L.; PADMANABHAN, P.; SAHI S. V. Effect of P sources on growth, P accumulation and activities of phytase and acid phosphatases in two cultivars of annual ryegrass (*Lolium multiflorum* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, p. 580-589, 2008.

147 STASWICH, P. E.; PAPA, C.; HUANG, J.; RHEE, Y. Purification of the major soybean leaf acid phosphatase that is increased by seed-pod removal. **Plant Physiology**, v. 104, p. 49–57, 1994.

- 148 SUN, F. H. & ZHOU, Q. -X. Oxidative stress biomarkers of the polychaete *Nereis diversicolor* exposed to cadmium and petroleum hydrocarbons. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 70, p. 106–114. 2008.
- 149 TABALDI, L. A.; RUPPENTHAL, R.; CARGNELUTTI, D.; MORSH, V. M.; PEREIRA, L. B.; SCHETINGER, M. R. C. Effects of metal elements on acid phosphatase activity in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, v. 59, p. 43-48, 2007.
- 150 TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Fotossíntese: Considerações Fisiológicas e Ecológicas. 4ª Ed. Artmed editora, Porto Alegre, cap. 9, p. 220-243, 2009.
- 151 TESHAI, A. J. & KUMAR, D. Some aspects of stomatal behavior in *Coffea arabica* L. I. Effects of soil moisture, soil nitrogen and potassium, and air humidity. **Kenya Coffee**, v. 43, p. 339– 343, 1978.
- 152 URZEDO, A. P. F. M. de; GIGITANO, R. L. de O.; GUERREIRO, M. C.; CASTRO, N. R. do A. Dissipação do inseticida thiamethoxam em solos da região de Lavras-MG. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 16, p. 31-38, 2006.
- 153 U.S. Department of Health and Human Services. Toxicological profile for Endosulfan. **Agency for toxic substances and diseases registry**: Atlanta. 1990.
- 154 VASCONCELLOS, F. C.; IGANCI, J. R. V.; RIBEIRO, G. A. Qualidade microbiológica da água do rio são lourenço, são lourenço do sul, Rio Grande do Sul. **Arquivos Instituto Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 2, p. 177-181, 2006.
- 155 VEIGA, M. M. Agrotóxicos: eficiência econômica e injustiça socioambiental. Rio de Janeiro. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 145-152, 2007.



- 156 VEIGA, M. M.; SILVA, D. M.; VEIGA, L. B. E.; FARIA, M. V. de C. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 11, 2006.
- 157 VIARENGO, A.; LOWE, D.; BOLOGNESI, C.; FABBRI, E.; KOEHLER, A. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C.**, v. 146, p. 281-300, 2007.
- 158 VINCENT, J. B.; CROWDER, M. W.; AVERILL, B. A. Hydrolysis of phosphate monoesters: a biological problem with multiple chemical solutions. **Trends in Biochemical Science**, v. 17, p. 105–110, 1992.
- 159 VOLTAN, R. B. Q.; FAHL, J. I.; CARELLI, M. L. C. Variação na anatomia foliar de cafeeiros submetidos a diferentes intensidades luminosas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 4, p. 99–105, 1992.
- 160 XIA, X. J.; HUANG, Y. Y.; WANG, L.; HUANG, L. F.; YU, Y. L.; ZHOU, Y. H.; YU, J. Q. Pesticides-induced depression of photosynthesis was alleviated by 24-epibrassinolide pretreatment in *Cucumis sativus* L. **Pestic Biochemistry and Physiology**, v. 86, p. 42-48, 2006.
- 161 WEFERS, H. & SIES, H. The protection by ascorbate and glutathione against microsomal lipid peroxidation is dependent on vitamin E. **European Journal of Biochemistry**, v. 174, p. 353- 357, 1988.
- 162 WEGBE, K.; CILAS, C.; DECASY, B.; ALAUZET, C.; DUFOUR, B. Estimation of production losses caused by the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae) and calculation of an economic damage threshold in Togolese coffee plots. **Journal of Economic Entomology**, v. 96, p. 1473–1478, 2003.

163 WILLEKENS, H.; CHAMNONGPOL, S.; DAVEY, M.; SCHRAUDNER, M.; LANGEBARTELS, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D.; VAN CAMP, W. Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C<sub>3</sub> plants. **The Embo Journal**, v.16, n. 16, p. 4806-4816, 1997.

164 WILLIAMS, J. A. A method for differentiating between *Coffea arabica* and *C. canephora* plants and their hybrids. **Turrialba**, v. 22, p. 263–267, 1972.

165 YADAV, A.; GOPESH, A.; PANDEY, R. S.; RAI, D. K.; SHARMA, B. Acetylcholinesterase: a potential biochemical indicator for biomonitoring of fertilizer industry effluent toxicity in freshwater teleost, *Channa striatus*. **Ecotoxicology**, v. 18, p. 325-333, 2009.

166 YAMAMOTO, I. & CASIDA, J. E. Neonicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor. **Springer**, Verlag, Tokyo, Japan. 1999.

167 ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 4<sup>a</sup> ed. New Jersey. Prentice Hall. 1999.

168 ZHANG, C. & McMANUS, M. T. Identification and characterisation of two distinct acid phosphatases in cell walls of roots of white clover. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 38, p. 259–270, 2000.

Anexo 1. Descrição dos Inseticidas utilizados no controle da broca e bicho-mineiro do café Conilon.

Nome comercial: Durivo SC (solo) e Voliam Flexi 300 SC (folha) - (Syngenta Proteção de Cultivos Ltda)  
Nome Técnico: Chlorantraniliprole + Thiamethoxan  
Grupo químico: Chlorantraniliprole: Diamida antranílica – inseticida  
Thiamethoxan: Neonicotinóide – inseticida sistêmico  
Formulação: Suspensão concentrada (SC)  
Concentração: Chlorantraniliprole: 100g i.a. / L produto comercial  
Thiamethoxam: 200g i.a./L produto comercial  
Classe toxicológica: não registrado no MAPA

Nome comercial: Premier (Bayer CropScience Ltda)  
Nome Técnico: Imidacloprid  
Classe: Inseticida sistêmico  
Grupo químico: nicotinóide  
Formulação: Grânulos dispersíveis  
Concentração: 7000g i.a. / kg produto comercial  
Classe toxicológica: IV – Pouco tóxico

Nome comercial: Endosulfan<sub>AG</sub> (Agripec Química e Farmacêutica S.A.)  
Nome Técnico: Endosulfan  
Classe: Inseticida e acaricida  
Grupo químico: Éster sulfuroso de um dial cíclico  
Formulação: Concentrado Emulsionável (CE)  
Concentração: 350g i.a. / L produto comercial  
Classe toxicológica: I – Extremamente tóxico

Anexo 2. Matéria Seca das Raízes, Caule, Folhas, Peso Total e Relação: Parte Aérea/Raiz das plantas de café Conilon, que receberam a aplicação dos inseticidas na estufa, via Foliar (F) e no Solo (S) via *drench*, com 12 meses de idade (média  $\pm$  desvio padrão).

Tratamentos	Raízes (g)	Caule (g)	Folhas (g)	Peso Total(g)	Relação: Parte Aérea/Raíz
<b>F- Folha</b>					
Controle	16,68 $\pm$ 3,50	11,37 $\pm$ 2,10	18,39 $\pm$ 3,44	46,44 $\pm$ 7,94	1,82 $\pm$ 0,28
T1- (Chlo +Thia)	16,14 $\pm$ 1,74	11,29 $\pm$ 2,09	17,61 $\pm$ 1,74	45,04 $\pm$ 3,89	1,84 $\pm$ 0,19
T2- (Chlo +Thia)	16,56 $\pm$ 2,80	12,74 $\pm$ 1,82	20,40 $\pm$ 3,19	49,70 $\pm$ 7,11	2,01 $\pm$ 0,23
T3- (Chlo +Thia)	19,25 $\pm$ 4,08	12,38 $\pm$ 1,95	18,62 $\pm$ 2,79	50,25 $\pm$ 8,42	1,63 $\pm$ 0,15
T4- (Chlo +Thia)	17,19 $\pm$ 2,33	11,99 $\pm$ 0,52	17,54 $\pm$ 2,09	45,84 $\pm$ 3,59	1,74 $\pm$ 0,25
T5- Endosulfan	18,39 $\pm$ 2,30	12,67 $\pm$ 1,90	19,19 $\pm$ 2,43	50,25 $\pm$ 6,46	1,73 $\pm$ 0,11
T6- (Chlo +Thia)	11,47 $\pm$ 1,07	9,95 $\pm$ 1,97	14,83 $\pm$ 1,97	36,25 $\pm$ 1,07	2,17 $\pm$ 0,20
T7- Endosulfan	15,95 $\pm$ 0,56	12,81 $\pm$ 2,05	16,38 $\pm$ 0,43	45,13 $\pm$ 3,04	1,83 $\pm$ 0,09
<b>S-Solo</b>					
Controle	14,19 $\pm$ 2,96	9,53 $\pm$ 1,82	14,64 $\pm$ 3,49	38,37 $\pm$ 7,99	1,71 $\pm$ 0,21
T1- (Chlo +Thia)	13,86 $\pm$ 2,34	11,59 $\pm$ 1,42	16,41 $\pm$ 3,41	41,86 $\pm$ 6,89	2,02 $\pm$ 0,11
T2- Imidacloprid	13,79 $\pm$ 4,82	11,61 $\pm$ 1,47	16,85 $\pm$ 5,06	42,25 $\pm$ 11,11	2,15 $\pm$ 0,36
T3- (Chlo +Thia)	16,12 $\pm$ 5,44	12,59 $\pm$ 0,15	16,15 $\pm$ 3,59	44,85 $\pm$ 9,17	1,85 $\pm$ 0,40
T4- Imidacloprid	14,73 $\pm$ 5,73	12,03 $\pm$ 2,27	16,51 $\pm$ 1,54	43,27 $\pm$ 9,54	2,04 $\pm$ 0,54

Anexo 3. Dados biométricos individuais das plantas dos tratamentos e doses (mL ou g/ha) na Folha (F), e no Solo (S), com a média  $\pm$  desvio padrão do número de folhas,  $\varnothing$  do caule, altura e teor de clorofila no início das avaliações.

Tratamentos	Dose/ha	Nº de folhas	$\varnothing$ do caule (mm)	Altura (cm)	Teor de clorofila (%)
<b>F –Folha</b>					
Controle	-	36,40 $\pm$ 9,42	7,17 $\pm$ 1,02	38,60 $\pm$ 5,59	52,18 $\pm$ 7,72
T1- (Chlo +Thia)	0,25 L	39,00 $\pm$ 4,85	6,64 $\pm$ 0,73	40,20 $\pm$ 2,95	51,36 $\pm$ 6,34
T2- (Chlo +Thia)	0,50 L	41,20 $\pm$ 8,64	7,00 $\pm$ 0,96	40,40 $\pm$ 5,18	49,96 $\pm$ 7,47
T3- (Chlo +Thia)	0,75 L	39,80 $\pm$ 6,50	7,15 $\pm$ 0,73	40,00 $\pm$ 3,08	51,24 $\pm$ 16,29
T4- (Chlo +Thia)	1,0 L	44,60 $\pm$ 9,24	6,79 $\pm$ 0,45	40,20 $\pm$ 3,27	49,54 $\pm$ 7,89
T5- Endosulfan	2,0 L	39,40 $\pm$ 5,50	6,97 $\pm$ 0,31	41,00 $\pm$ 3,08	49,72 $\pm$ 0,49
T6- (Chlo +Thia)	2,0 L	34,00 $\pm$ 5,66	6,47 $\pm$ 0,95	37,25 $\pm$ 6,01	52,90 $\pm$ 6,22
T7- Endosulfan	4,0 L	38,50 $\pm$ 3,54	7,54 $\pm$ 0,82	39,75 $\pm$ 4,60	38,25 $\pm$ 8,70
<b>S- Solo</b>					
Controle	-	32,60 $\pm$ 7,73	6,48 $\pm$ 0,71	35,00 $\pm$ 8,28	45,36 $\pm$ 6,35
T1- (Chlo +Thia)	0,75 L	33,60 $\pm$ 1,67	6,45 $\pm$ 0,64	42,40 $\pm$ 1,95	50,00 $\pm$ 7,70
T2- Imidacloprid	1,0 kg	39,40 $\pm$ 8,11	6,66 $\pm$ 0,68	38,00 $\pm$ 4,18	51,58 $\pm$ 7,06
T3- (Chlo +Thia)	1,5 L	44,00 $\pm$ 8,49	9,13 $\pm$ 0,23	41,25 $\pm$ 0,35	41,25 $\pm$ 1,91
T4- Imidacloprid	2,0 L	34,50 $\pm$ 4,95	7,21 $\pm$ 0,08	41,75 $\pm$ 0,35	38,10 $\pm$ 1,41

Anexo 4. Dados biométricos individuais das plantas dos tratamentos e doses (mL ou g/ha) na Folha (F), e no Solo (S), com a média  $\pm$  desvio padrão do número de folhas,  $\varnothing$  do caule, altura e teor de clorofila no final das avaliações.

Tratamentos	Dose/há	Nº de folhas	$\varnothing$ do caule (mm)	Altura (cm)	Teor de clorofila (%)
<b>F –Folha</b>					
Controle	-	41,60 $\pm$ 10,04	7,80 $\pm$ 0,53	41,00 $\pm$ 6,40	54,02 $\pm$ 8,53
T1- (Chlo +Thia)	0,25 L	42,20 $\pm$ 6,26	7,64 $\pm$ 0,82	44,60 $\pm$ 3,27	53,62 $\pm$ 7,87
T2- (Chlo +Thia)	0,50 L	44,60 $\pm$ 7,40	7,63 $\pm$ 0,50	43,30 $\pm$ 5,56	47,68 $\pm$ 7,22
T3- (Chlo +Thia)	0,75 L	44,20 $\pm$ 6,69	8,69 $\pm$ 1,15	40,00 $\pm$ 1,97	48,28 $\pm$ 12,97
T4- (Chlo +Thia)	1,0 L	45,40 $\pm$ 6,07	8,00 $\pm$ 0,34	43,70 $\pm$ 3,67	49,12 $\pm$ 9,71
T5- Endosulfan	2,0 L	44,80 $\pm$ 8,85	7,86 $\pm$ 0,94	42,60 $\pm$ 3,31	46,82 $\pm$ 3,37
T6- (Chlo +Thia)	2,0 L	36,50 $\pm$ 6,36	7,24 $\pm$ 0,66	39,75 $\pm$ 4,60	51,15 $\pm$ 1,06
T7- Endosulfan	4,0 L	39,50 $\pm$ 6,36	7,92 $\pm$ 0,12	42,25 $\pm$ 5,30	41,90 $\pm$ 1,98
<b>S- Solo</b>					
Controle	-	34,40 $\pm$ 14,54	7,36 $\pm$ 0,27	38,50 $\pm$ 7,66	45,82 $\pm$ 5,80
T1- (Chlo +Thia)	0,75 L	33,60 $\pm$ 4,56	7,78 $\pm$ 0,62	44,30 $\pm$ 1,79	43,16 $\pm$ 7,23
T2- Imidacloprid	1,0 kg	39,60 $\pm$ 13,07	7,43 $\pm$ 0,66	40,20 $\pm$ 3,95	47,42 $\pm$ 7,90
T3- (Chlo +Thia)	1,5 L	43,00 $\pm$ 15,56	9,16 $\pm$ 0,21	43,25 $\pm$ 0,35	43,35 $\pm$ 8,84
T4- Imidacloprid	2,0 L	35,00 $\pm$ 1,41	8,01 $\pm$ 0,69	43,25 $\pm$ 1,06	40,15 $\pm$ 0,78

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)