

JOHANA ELIZABETH QUINTERO CORTES

**EFEITOS LETAIS E SUBLETAIS DA MISTURA BIFENTRINA-ACETAMIPRIDE NA
BROCA-DO-CAFÉ**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Eliseu José Guedes Pereira

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

Q7e
2021

Quintero Cortes, Johana Elizabeth, 1990-

Efeitos letais e subletais da mistura bifentrina-acetamipride na broca-do-afé / Johana Elizabeth Quintero Cortes. – Viçosa, MG, 2021.

1 dissertação eletrônica (26 f.): il.

Orientador: Eliseu José Guedes Pereira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Entomologia, 2021.

Referências bibliográficas: f. 24-26.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2021.177>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Hypothenemus hampei*. 2. *Hypothenemus hampei* - Comportamento. 3. Raios X. I. Pereira, Eliseu José Guedes, 1976-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Entomologia. Programa de Pós-Graduação em Entomologia. III. Título.

CDD 22. ed. 595.768

Bibliotecário(a) responsável: Renata de Fátima Alves CRB6/2578

JOHANA ELIZABETH QUINTERO CORTES

**EFEITOS LETAIS E SUBLETAIS DA MISTURA BIFENTRINA-ACETAMIPRIDE NA
BROCA-DO-CAFÉ**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 19 de maio de 2021

Assentimento:

Johana Quintero C.

Johana Elizabeth Quintero Cortes
Autora



Eliseu José Guedes Pereira
Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelas múltiplas bênçãos.

A minha família, principalmente, aos meus pais pelo amor incondicional, por sempre me incentivarem nos estudos e por me apoiarem ao longo dessa caminhada.

A meus irmãos pelo apoio que embora longe, sempre me incentivarem a continuar pela realização dos meus sonhos.

Aos meus amigos Lisbedt, Paula, Adelson, Paulo pelo apoio, amizade e por compartilharem comigo tantos momentos. A todas as pessoas que encontrei ao longo dessa minha jornada academia, pois mesmo que sendo só um breve momento, todas elas contribuíram para o término dessa etapa.

À Universidade Federal de Viçosa, especialmente ao programa de Pós-Graduação em Entomologia pela oportunidade e pelo aprendizado adquirido.

A meu Orientador Eliseu, pela disposição em me orientar, pela oportunidade de fazer parte do seu laboratório.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos membros da banca avaliadora pelas contribuições.

RESUMO

QUINTERO CORTES, Johana Elizabeth, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2021. **Efeitos letais e subletais de uma mistura inseticida para controle da broca-do-café.** Orientador: Eliseu José Guedes Pereira.

A broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) é uma das pragas mais importantes nos cultivos de café. O controle químico é o método mais usado no controle de *H. hampei*. No passado esta praga era controlada pelo organoclorado endossulfan que devido aos seus efeitos nocivos à saúde humana e ao ambiente foi banido. Desta forma, é necessário a seleção de inseticidas que sejam eficientes no controle desta praga e que não apresentem características ecotoxicológicas inadequadas. Entre os grupos de inseticidas registrados para uso em lavouras de café com essas características estão os piretróides e os neonicotinóides. Na seleção dos inseticidas é importante se estudar tanto os efeitos letais como os subletais. Assim, este trabalho teve por objetivo determinar os efeitos os letais e subletais do piretróide bifentrina e do neonicotinóide acetamipride isolados e em mistura. Nos bioensaios foram usados insetos adultos coletados em lavoura sem aplicação de inseticidas. Para o estudo do efeito letal dos inseticidas foram estimadas curvas concentração e tempo mortalidade para os adultos de *H. hampei*. Já para estudo dos efeitos subletais foram realizados bioensaios de preferência alimentar e da progênie (oviposição e desenvolvimento larval do inseto). Na dose recomendada a bifentrina causou 100% de mortalidade aos adultos da broca do café 12 horas após a aplicação. Já o acetamipride na dose recomendada não causou mortalidade à praga. A mistura dos dois inseticidas teve efeito similar à bifentrina. Não se observou efeito subletal dos inseticidas sobre *H. hampei*. Portanto, a bifentrina pode ser recomendada nos programas de manejo integrado de *H. hampei* em lavouras de café devido a este inseticida ser eficiente e ter ação rápida de controle desta praga. Além disso, a bifentrina apresenta baixo custo e baixa toxicidade ao homem e não é persistente no ambiente.

Palavras-chave: *Hypothenemus hampei*. Bifentrina. Acetamipride. Neonicotinoide. Piretroide. Comportamento. raios-x.

ABSTRACT

QUINTERO CORTES, Johana Elizabeth, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2021. **Lethal and sublethal effects of an insecticide mixture for control of the coffee berry borer.** Advisor: Eliseu José Guedes Pereira.

The coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) is one of the most important pests in coffee crops. Chemical control is the most used method to control *H. hampei*. In the past, this pest was controlled by the organochlorine endosulfan which, due to its harmful effects on human health and the environment, was banned. Thus, it is necessary to select insecticides that are efficient in controlling this pest and that do not present inappropriate ecotoxicological characteristics. Among the groups of insecticides registered for use on coffee plantations with these characteristics are the pyrethroids and neonicotinoids. When selecting insecticides, it is important to study both lethal and sublethal effects. Thus, this work aimed to determine the lethal and sublethal effects of the pyrethroid bifenthrin and the neonicotinoid acetamipride isolated and in mixture. In bioassays, adult insects collected in crops without insecticide application were used. To study the lethal effect of insecticides, concentration and mortality time curves for adults of *H. hampei* were estimated. In order to study the sublethal effects, food preference and progeny bioassays were performed (oviposition and larval development of the insect). At the recommended dose, bifenthrin caused 100% mortality in adults of the coffee berry borer 12 hours after application. Acetamiprid at the recommended dose did not cause pest mortality. The mixture of the two insecticides had a similar effect to bifenthrin. There was no sublethal effect of insecticides on *H. hampei*. Therefore, bifenthrin can be recommended in integrated management programs for *H. hampei* in coffee plantations because this insecticide is efficient and has fast action to control this pest. Furthermore, bifenthrin has a low cost and low toxicity to humans and is not persistent in the environment.

Keywords: *Hypothenemus hampei*. Bifenthrin. Acetamiprid. Neonicotinoid. Pyrethroid. Behavior. x-rays.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. MATERIAIS E MÉTODOS	9
2.1 Insetos e inseticidas	9
2.2 Bioensaios concentração/mortalidade com adultos de <i>H. hampei</i>	10
2.3 Bioensaios de preferência alimentar	10
2.4 Bioensaios da progênie (oviposição e desenvolvimento larval)	11
2.5 Análises dos dados	11
3. RESULTADOS	13
3.1 Curvas de sobrevivência	13
3.2 Curvas concentração-mortalidade	13
3.3 Preferência alimentar	14
3.4 Oviposição e desenvolvimento larval da progênie	14
4. DISCUSSÃO	15
5. CONCLUSÕES	18
FIGURAS	19
REFERÊNCIAS	24

1. INTRODUÇÃO

O café é um dos principais produtos agrícolas comercializados em todo o mundo, com circulação anual de aproximadamente 173 milhões de sacas de 60 kg (Aristizábal et al., 2016; FAO, 2019). Perto de 80 países produzem café e quase metade da produção (~8.5 milhões de toneladas / ano) vem de apenas três países: Brasil (28%), Vietnã (10%) e Colômbia (8.3%) (ICO, 2017). O Brasil é o maior produtor e exportador de café, sendo responsável por 33,73% das exportações mundiais. As espécies cultivadas são *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora*, com área total plantada em torno de 2.156,5 mil hectares. Os Estados de Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo são os principais produtores. A estimativa total da produção brasileira na safra 2017/2018 foi de 59,9 milhões de sacas, sendo 76% de café arábica, com receita bruta em torno de R\$ 22,9 bilhões (CONAB, 2018).

Entretanto, em muitos países a produção de café é ameaçada por uma série de pragas e doenças (Jaramillo et al., 2006), que têm contribuído para o baixo rendimento, qualidade e custo dos grãos de café (Vega et al., 2014). Dentre os insetos praga, a broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) é considerada a praga mais importante da cafeicultura mundial, é responsável por perdas quantitativas e qualitativas na produção (INFANTE et al., 2012). Somente no Brasil, os prejuízos anuais ultrapassam 300 milhões de dólares (OLIVEIRA et al., 2013; MOTA et al., 2017). Desta forma, os prejuízos causados à cultura chegam a afetar a economia de mais de 25 milhões de pequenos agricultores no mundo (SOUZA, 2014).

No Brasil a broca-do-café foi introduzida no estado de São Paulo, provavelmente em 1913, junto às sementes importadas da África e da Java. De 1913 a 1924 este inseto disseminou-se por muitos cafezais de Campinas e por vários municípios vizinhos. Na safra colhida em 1924 foram observados os primeiros prejuízos. A partir daí a broca espalhou-se por todas as regiões cafeeiras do Brasil (Souza et al., 2007).

Hypothenemus hampei provoca danos aos frutos, reduzindo o peso dos grãos e alterando a qualidade do café, afetando a classificação e sabor da bebida, sendo um dos principais obstáculos à cafeicultura mundial (Messing, 2012). Esta praga ataca a cereja e se reproduz internamente no endosperma, causando perda total de grãos e em muitos casos, queda prematura de frutos (Bustillo, 2006). As fêmeas acasaladas

de *H. hampei* constroem um orifício no fruto de café, preferencialmente na região da coroa, e depositam seus ovos em uma galeria construída no endosperma da semente, de modo que tanto as larvas como os adultos causam danos consideráveis aos frutos (Jaramillo et al., 2009). *Hypothenemus hampei*, passa todo seu ciclo de vida dentro do fruto, o que dificulta seu manejo (Damon, 2000). Os danos causados por *H. hampei* são a redução do rendimento e a qualidade do produto final, resultando em consideráveis perdas econômicas (Moore 1998).

Os métodos de manejo para *H. hampei* mais eficazes são as práticas culturais e o controle químico. As práticas culturais (colheita eficiente com repasse para colheita manual de todos os frutos), por não serem muitas vezes realizadas adequadamente, costumam não proteger lavouras de café das infestações de *H. hampei* (Damon, 2000; Rehner et al., 2006). O período em que o inseto está mais vulnerável ao controle químico é no final da entressafra, quando as fêmeas acasaladas saem em busca de novos frutos (Damon, 2000). Com isso, o sucesso no controle de *H. hampei*, depende de um monitoramento dos níveis de infestação no campo e da correta escolha das ferramentas de manejo a serem utilizados. A aplicação de inseticida é recomendada quando a porcentagem de infestação for de 3 a 5% (Souza et al., 2013).

Atualmente, um dos inseticidas registrados para o controle de *H. hampei* é a mistura bifentrina+acetamipride, composta por um piretroide e um neonicotinoide, respectivamente, com ação de contato e sistêmica contra alguns insetos. A bifentrina atua nas proteínas do canal de sódio, modulando a diferença de voltagem nas membranas das células nervosas dos insetos e outros animais. O funcionamento desses canais é essencial para a transmissão normal dos impulsos nervosos. Esse processo, se interrompido pela ação de um ligante (inseticida), pode levar à hiperexcitabilidade do inseto até seu colapso nervoso e eventual morte (Davies, Field, Usherwood, & Williamson, 2007). Por outro lado, o acetamipride imita o efeito da acetilcolina e compete com ela (Nauen e Denholm, 2005). A ação deste inseticida é geralmente sistêmica por suas propriedades físico-químicas, que permitem translocação na planta. Atualmente nos cultivos de café é frequente o uso de inseticidas outros que não o endosulfan, o qual teve seu uso suspenso na maioria dos países. Devido à eficácia e tradição de uso do inseticida contra a broca-do-café até meados da década de 2010 nos principais países produtores, atualmente pouco se conhece sobre a ação de outros inseticidas contra o inseto, inseticidas esses que se

tornaram importantes ou mesmo fundamentais no manejo da broca em muitos sistemas de produção de café.

Nesse contexto, é importante realizar estudos para avaliar os efeitos letais e subletais de inseticidas registrados para manejo da broca-do-café e de outros insetos-praga (SILVA, 2011). Nessa pesquisa, avaliou-se os efeitos letais e subletais da mistura bifentrina+acetamipride e de bifentrina e acetamipride na broca-do-café.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Insetos e inseticidas

Coletou-se frutos infestados com *H. hampei* em dois locais de produção de café: no campus da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, 20°44'38.2"S 42°50'57.6"O), esta lavoura não teve aplicações de inseticidas, além disso, foi implementado um manejo convencional e no distrito de Airões, Paula Cândido, MG, 20°48'37.1"S 42°57'54.4"O) a lavoura não teve aplicações de inseticidas durante o último ano. Nas coletas, a presença da broca foi identificada por sua típica perfuração na região da coroa dos frutos, na extremidade oposta ao pedúnculo. Os frutos coletados foram transportados para o laboratório e mantidos em bandejas de plástico (50 cm de largura x 30 cm de diâmetro x 8 cm de altura) em condições controladas (25 ± 2 °C, 60 ± 10% de umidade relativa). Para os bioensaios utilizou-se adultos (fêmeas) sem malformações aparentes. Os insetos foram extraídos dos frutos infestados algumas horas antes (< 3 h) da transferência para a unidade experimental.

Três formulações comerciais dos inseticidas foram utilizadas para os bioensaios. Essas foram: bifentrina+acetamipride (250 + 250 g/kg, Sperto, UPL, Brasil, bifentrina (100 g/L, Talstar 100 EC, FMC, Brasil) e acetamipride (200 g/kg) (Battus SP, UPL, Brasil). Para as diluições em água destilada, tomou-se como referência as informações do rótulo da mistura comercial bifentrina+acetamipride em vigência em 2019. No rótulo, a concentração recomendada para o controle de *H. hampei* era de 200 g dos ingredientes ativos por 600 L de água para um hectare. As concentrações das formulações individuais de bifentrina e acetamipride foram escolhidas baseando-se em pré-teste e na equivalência da quantidade de ingrediente ativo na formulação da mistura comercial de bifentrina+acetamipride.

2.2 Bioensaios concentração/mortalidade com adultos de *H. hampei*

Brocas-do-café adultas foram submetidas aos bioensaios de exposição por contato de cada formulação da seguinte maneira. Inicialmente, se preparou a solução estoque de cada formulação e em seguida se preparou as respectivas concentrações decrescentes para cada, usando um fator de diluição 5.

Para cada inseticida foram preparadas concentrações de forma seriada em ordem decrescente como se segue (mg/L): 160, 32, 6.4, 1.28, 0.256, 0.051, 0.010 para bifentrina+acetamipride e 80, 16, 3.2, 0.64, 0.128, 0.0256 e 0.005 para bifentrina e acetamipride. Água destilada foi utilizada como o tratamento controle. Após a preparação das concentrações, 80 frutos de café verdes, sadios e frescos (coletados de plantas de café no campus da UFV) foram imersos por 10 s na calda inseticida e deixados para secar por duas horas à temperatura ambiente do laboratório. Posteriormente, cada fruto foi colocado numa célula de uma bandeja plástica (de 16 células) individualmente (um por célula) e por último foi adicionada uma fêmea adulta de broca proveniente do campo, como descrito anteriormente (item 2.1). Cada tratamento correspondeu a uma concentração do inseticida, sendo cada uma com 5 repetições (5 bandejas) de 16 fêmeas adultas em cada repetição em um desenho experimental completamente aleatório.

A sobrevivência dos indivíduos foi avaliada ao longo do tempo, contabilizando-se as brocas-do-café mortas a cada 12 h até completar 96 h, quando finalizou-se o bioensaio. Foram considerados mortos os insetos que estavam sem capacidade de deslocamento ou moribundos (com pernas distantes do corpo, diferente do estado de tanatose com os membros encolhidos) quando tocados por um pincel fino (Arraya-Rojas, 2020). O tratamento controle foi utilizado para estimar a mortalidade natural e subsequentemente, fazer a eventual correção dos dados de mortalidade natural nos demais tratamentos.

2.3 Bioensaios de preferência alimentar

Nos bioensaios de chance de escolha e os demais realizados nesta dissertação, acetamipride foi excluído das análises por não apresentar um efeito letal na broca de café. Utilizou-se as duas formulações comerciais com três concentrações e mais uma correspondente à dose de campo: bifentrina+acetamipride (0.34, 1.13, 2.3

e 160 mg/L dos ingredientes ativos) e bifentrina (0.001, 0.006, 0.014 e 80 mg/L). Água destilada foi utilizada como o tratamento controle. Esses tratamentos simulam situações em que o inseticida foi recentemente aplicado nos frutos ou quando sua concentração já decaiu a baixos níveis no ambiente.

Uma bandeja de plástico (dimensões de 30x18x6 cm) serviu de arena experimental. Em cada extremo da arena foram colocados dez frutos, aqueles tratados com inseticida de um lado e os frutos do tratamento controle do lado oposto. Dessa forma que o centro da arena ficou livre para liberar os insetos, os quais tiveram chance de escolher o fruto a colonizar. As avaliações foram feitas visualmente durante 30 min, avaliando-se a posição de cada inseto. Determinou-se a preferência do inseto pela presença de perfuração (broqueamento) do fruto de café. Cada tratamento correspondeu a uma concentração do inseticida, sendo cada uma com 6 repetições de 5 fêmeas adultas em cada repetição.

2.4 Bioensaios da progênie (oviposição e desenvolvimento larval)

Frutos de café maduro foram tratados com cada inseticida (descrito no Item 2.1) e cada fruto foi colocado em uma placa de Petri. Em seguida se adicionou uma broca fêmea adulta permitindo sua colonização (postura de ovos). Foram utilizados dez frutos e dez brocas para cada concentração e o controle. A postura de ovos e o desenvolvimento das larvas de *H. hampei* nos frutos de café foram registrados digitalmente a cada dois dias ao longo de 30 dias mediante o sistema digital de raios-x usando-se o equipamento MX-20 equipado com uma câmera digital de 14 bits (Faxitron X-Ray Corp., Wheeling, IL, EUA). Os frutos de café antes de serem expostos aos tratamentos foram observados no sistema de raio-x para confirmar de que o fruto estava em boas condições e não estava infestado com algum inseto. Cada tratamento correspondeu a uma concentração do inseticida, sendo quatro concentrações cada uma com 10 repetições (10 frutos de café) e 1 fêmea adulta em cada repetição.

2.5 Análises dos dados

Os dados dos bioensaios de tempo-mortalidade foram submetidos a análise de sobrevivência não paramétrica usando estimadores Kaplan-Meier para obter as curvas de sobrevivência e estimativas de tempo mediano de sobrevivência. A

similaridade geral entre as curvas de sobrevivência foi testada usando o teste χ^2 log-rank, e comparações dicotômicas entre as curvas foram testadas usando o método de Holm-Sidak. Os valores do tempo sobrevivência obtidos foram submetidos a análise de regressão em função da concentração do inseticida visando testar se ele sofreu mudança na rapidez de ação no inseto. Além disso, os resultados do bioensaios concentração-mortalidade foram submetidos à análise de próbite usando o programa PoloPlus (Robertson et al. 2007). Foram estimados os parâmetros que descrevem a toxicidade dos inseticidas, incluindo concentrações letais (CL) e seus intervalos de confiança. Para testar se a toxicidade do inseticida na mistura foi alterada em relação à dele separadamente, foi testado se a declividade e o intercepto da linha de regressão de próbite eram os mesmos para os inseticidas ou se havia diferença significativa entre elas ($P > 0.05$) pelo menos na declividade delas (Robertson et al., 2007). Em caso positivo, calculou-se a razão de toxicidade a partir das estimativas das concentrações letais e da variância e covariância dos parâmetros da regressão de próbite. Se o intervalo de confiança a 95% de probabilidade para a razão de toxicidade não conter o valor 1, a razão é considerada significativa ($P < 0.05$, Robertson et al., 2007), ou seja, a toxicidade do inseticida na mistura foi alterada em determinada faixa de concentração letal.

Os dados de preferência foram submetidos à análise de deviance usando um modelo linear generalizado (GLM) com distribuição binomial; as comparações entre os níveis das variáveis explicativas na preferência por inseticidas e os modelos GLM foram feitas simplificando gradualmente o modelo. Os resíduos foram verificados para testar a adequação das distribuições em todos os modelos. O modelo linear generalizado (GLM) ajustado com distribuição Poisson foi usado para analisar os dados de progênie. Os resíduos foram analisados por inspeção visual (plotagem quantil-quantil), teste de Shapiro-Wilk e teste de Bartlett foram feitos para verificar a adequação da distribuição dos modelos. Essas análises estatísticas foram realizadas no sistema de software R (R Core Team, 2018).

3. RESULTADOS

3.1 Curvas de sobrevivência

As curvas de sobrevivência de *H. hampei* aos três compostos revelaram que a maior concentração testada causou mortalidade próxima de 100% em 12 h de exposição aos inseticidas bifentrina+acetamipride ($\chi^2 = 274$; $df = 5$; $P < 0.01$; Fig. 1A) e bifentrina ($\chi^2 = 431$; $df = 7$; $P < 0.01$; Fig. 1B). Contrariamente, as concentrações de acetamipride testadas não apresentaram diferença significativa com o tratamento controle ($\chi^2 = 13.7$; $df = 7$; $P > 0.05$; Fig. 1C). As concentrações de bifentrina+acetamipride 0.051 mg/L e 0.256 mg/L não tiveram diferença significativa com relação ao tratamento controle ($P > 0.05$). As concentrações de bifentrina 0.64 mg/L e 3.20 mg/L não tiveram diferença significativa entre elas ($P > 0.05$), de igual forma, as concentrações 16 mg/L e 80 mg/L tiveram o mesmo efeito ($P = 0.19$). Os insetos do controle exibiram alta sobrevivência, superior a 87% em todos os bioensaios. Durante as primeiras 12h de exposição, as concentrações máximas tanto de bifentrina+acetamipride 32 mg/L e bifentrina 80 mg/L exibiram alta mortalidade. Algo a destacar, é que a concentração máxima de bifentrina causou 100% de mortalidade após 12h de exposição, em comparação a concentração máxima utilizada para acetamipride, a qual não teve diferença significativa com o tratamento controle. Além disso, a rapidez de ação de bifentrina, estimada pelo tempo médio de sobrevivência dependeu da concentração do inseticida (Fig. 2). Essa relação não foi afetada pela presença do acetamipride na mistura ($P > 0.05$). Isso foi perceptível devido à similaridade de valores de tempo mediano de sobrevivência para os insetos expostos a bifentrina em formulação separada ou na sua mistura com acetamipride, valores tais que foram ser modelados com uma única equação logística (Fig. 2).

3.2 Curvas concentração-mortalidade

O modelo de próbite, utilizado para as curvas de concentração-mortalidade, foi adequado para estimar as concentrações letais de bifentrina+acetamipride e bifentrina como indica valor baixo do χ^2 e alto do seu P (Fig. 3). Como esperado, a mortalidade dos indivíduos tratados esteve diretamente relacionada com a concentração do

inseticida, sendo que concentrações mais altas de bifentrina+acetamipride e bifentrina causaram maior mortalidade e menores concentrações apresentaram baixa mortalidade. Contudo, para o inseticida acetamipride não foi possível calcular as concentrações letais dado que a concentração máxima testada (80 mg/L) e as demais consistentemente causaram baixa mortalidade dos insetos na faixa de concentrações usadas (Fig. 3A), mortalidade que não diferiu do tratamento controle (Fig. 1). A hipótese de igualdade das curvas concentração-resposta para bifentrina e bifentrina+acetamipride foi rejeitada ($\chi^2 = 11.24$, $gl = 2$, $P < 0.01$) bem como foi o paralelismo delas ($\chi^2 = 6.46$, $gl = 1$, $P = 0.01$) (Fig. 3B). O valor da concentração letal mediana (CL_{50}) dos inseticidas bifentrina+acetamipride e bifentrina foram 2.25 mg/L e 1.23 mg/L, respectivamente.

3.3 Preferência alimentar

Adultos de *H. hampei* não apresentaram diferença significativa na preferência entre frutos de café tratados e não tratados tanto para a mistura dos inseticidas bifentrina+acetamipride (SD = ± 3 ; $df = 4.73$; $P = 0.19$) como para a bifentrina (SD = ± 3 ; $df = 4.67$; $P = 0.20$). No ensaio, a broca-do-café não exibiu nenhum tipo de preferência pelos tratamentos.

3.4 Oviposição e desenvolvimento larval da progênie

A exposição das brocas-do-café nos frutos tratados com a concentração recomendada de bifentrina+acetamipride afetou o número de ovos (SD = 92.8, $df = 41$, $P < 0.01$) e consequentemente, o número larvas de *H. hampei* (SD = 30, $df = 41$, $P < 0.01$). Os insetos presentes em cada fruto de café tratado ao longo dos 30 dias de colonização foram observados usando raios-X (Fig. 4) e os números dos indivíduos contabilizados (Fig. 5). Os indivíduos expostos às concentrações de bifentrina não tiveram diferença significativa ($P > 0.05$) no número de ovos e larvas em comparação ao grupo controle (Fig. 4) (ovos (SD = 133, $df = 36$, $P = 0.06$); larvas (SD= 87, $df = 36$, $P = 0.83$)). Foi possível observar o desenvolvimento dos indivíduos no interior dos frutos nas imagens de raio-X (Fig.6).

4. DISCUSSÃO

Um dos inseticidas mais utilizados para o controle de *H. hampei* foi endosulfan, cujo uso foi interrompido em mais de 70 países dado o risco por sua alta toxicidade e potencial de bioacumulação, além da ocorrência de populações resistentes da broca-do-café no passado (Ffrench-Constant et al., 1994; Janssen, 2011). Na seleção de outras moléculas ou compostos que possam ser eficientes no controle deste inseto, tem sido testados diferentes inseticidas sintéticos e suas misturas. Não é claro se essas potencializam ou aumentam o efeito residual do inseticida e evitam rápida seleção de populações resistentes (Johnson et al., 2020; Metellus et al., 2020). Além disso, em café pouco se conhece dos efeitos letais e subletais dos inseticidas registrados nos países produtores, incluindo Brasil. Essa falta de embasamento técnico-científico aumenta o risco de falha de controle da praga-alvo, de perda econômica e de acidentes pelo uso de inseticida inadequado.

Atualmente, a mistura bifentrina + acetamipride é um dos inseticidas utilizados para o controle da broca-do-café. Neste trabalho este inseticida exibiu efeito letal em brocas-do-café expostas a frutos tratados com a concentração recomendada na bula para uso no campo. Estes resultados são consistentes com outro trabalho, reportando que a mistura teve uma eficiência maior que 90% em campo e 100% de mortalidade em laboratório (Andrade, 2019; Metellus et al., 2020). O mecanismo de ação rápida é importante pelo curto período em que a broca-do-café permanece em contato com o inseticida fora do fruto de café (Damon, 2000; Fishel, 2005).

Os inseticidas bifentrina e acetamipride foram avaliados separadamente para determinar o efeito letal de cada inseticida na broca-do-café. Aqui observou-se que o piretroide bifentrina tem rápido (< 12 h) e grande efeito tóxico neste inseto, inclusive em um intervalo de concentrações menor que aquele do ingrediente ativo recomendado na mistura. Alega-se que bifentrina age por contato e ingestão e tem rápida atividade de paralisia em baixas doses, estabilidade ambiental e um amplo espectro contra ácaros e insetos de diferentes ordens (Fishel, 2005). Este inseticida separadamente não tem registro para uso em café no Brasil (MAPA,2020), mas poderia ser uma alternativa em um programa de manejo integrado da broca-do-café. O amplo espectro de ação de bifentrina, entretanto, precisa ser estudado em espécies não-alvo dado a ampla gama de artrópodes associada às plantas de café em diversos agroecossistemas.

Acetamipride separadamente teve efeito letal negligenciável na broca-do-café, nem tampouco potencializou o efeito letal na mistura bifentrina+acetamipride, consistente com a baixa mortalidade pelo inseticida observada em um estudo na Colômbia (Pulgarin-Giraldo, 2016). Baseando-se nos valores da concentração letal mediana (CL₅₀) do presente estudo, a mistura bifentrina+acetamipride teve toxicidade aproximadamente duas vezes menor que bifentrina isolada. Essa redução não ocorreu em concentrações mais altas (a partir da CL₈₀) e nem na rapidez dos inseticidas para matar os insetos. O principal alvo de neoniconoides são insetos sugadores e alguns insetos da ordem Diptera (Salgado et al., 1983), porém até mesmo contra o pulgão do milho *Rhopalosiphum maidis*, acetamipride causou menos de 65% de mortalidade (Moratelli, 2010) e exibiu baixa mortalidade e falhas no controle da mosca-da-couve (*Delia radicum*) (Bažok et al., 2012).

As concentrações subletais avaliadas tanto para bifentrina+acetamipride como para bifentrina não causaram impacto negativo ou positivo no comportamento e desempenho da progênie na broca-do-café. Contudo, os indivíduos que sobreviveram à maior concentração da mistura tiveram uma diminuição de três vezes na quantidade de ovos colocados pela fêmea em cada fruto. Esses resultados concordam os encontrados com ciantraniliprole e clortraniliprole (Plata-Rueda et al., 2019a, 2019b) e indicam que mesmo um curto tempo de exposição do inseto ao inseticida pode resultar em diminuição na progênie, efeito que ajuda no potencial do inseticida de controlar os níveis de infestação de *H. hampei*. A avaliação de efeitos subletais auxilia a prever possíveis efeitos desejáveis e indesejáveis no uso de um determinado inseticida no controle de um inseto-praga (Cutler and Guedes, 2017).

Com relação aos bioensaios comportamentais de preferência, tanto bifentrina+acetamipride como bifentrina não afetaram a preferência dos insetos por frutos tratados ou não-tratados. Assim, as brocas parecem não ser repelidas pela presença do inseticida no fruto de café. A escolha de frutos de café por *H. hampei* parece se basear no estímulo por semioquímicos emitidos pelos frutos em diferentes estágios de maturação e no estado fisiológico da fêmea no processo de colonização do fruto (Damon, 2000; de Souza et al., 2020; Mathieu et al., 2001). Ainda existe uma lacuna de conhecimento a respeito deste comportamento e sua interação com a presença de inseticidas na planta.

O número de larvas diminuiu cerca de 3x sob exposição das brocas à concentração de campo de bifentrina+acetamipride e teve uma pequena diminuição

em concentrações mais baixas da mistura. A ação do inseticida pode ter ocorrido na fêmea antes da ovogênese ou posteriormente no desenvolvimento embrionário ou ainda no desenvolvimento pós-embrionário larval de *H. hampei*. Qualquer que seja esse efeito, ele é positivo no controle da praga, afetando a taxa de crescimento da população. A fase larval é a que consome a semente no fruto de café. Como implicação prática, se uma aplicação do inseticida deixar vivos alguns adultos da broca mesmo assim deve reduzir o número larvas no fruto. Além disso, como descreve Chediak (2009), no campo, a mortalidade natural de *H. hampei* é regulada por fatores que atuam sobretudo no estágio larval. Assim, se o inseticida predispor a progênie a uma maior mortalidade natural, em condições de campo ele pode ter um efeito interativo que pode ser superior ao aqui observado.

Em suma, os resultados deste estudo mostram que bifentrina+acetamipride causa efeito letal e subletal, mas, a bifentrina isolada mostra melhor efeito que mistura, portando o uso da mistura não é justificável contra a broca. Bifentrina pura demonstrou ser letal em concentrações e tempos de exposição semelhantes à mistura, resultado que deve ser considerado nas prescrições para controle da broca-do-café em um programa de manejo desta praga. Para disso, mais estudos devem ser feitos incluindo a determinação da residualidade a campo e seletividade do inseticida a insetos benéficos em agroecossistemas de café. Consistente com os resultados deste estudo, Gonring et al. (2019) e Plata-Rueda et al. (2019) mostraram evidência que a exposição de brocas adultas a inseticidas afeta o comportamento de locomoção e dificulta as trocas gasosas no inseto. A exposição tarsal neste estudo foi relativamente pequena porque *H. hampei* geralmente broqueava rápido, penetrando no fruto em aproximadamente 30 min (Arraya-Rojas, 2020). Esse tempo de contato foi suficiente para a ação de bifentrina, mas não de acetamipride. A toxicidade dos inseticidas pode ser significativamente aumentada com a adição de um sinergista, composto químico que aumenta a letalidade quando administrado em quantidade subletal (Brindley e Selim, 1984; Metcalf, 1967), mas acetamipride não mostra este efeito e pode inclusive exibir antagonismo a ação de bifentrina. Os resultados deste estudo mostram que acetamipride e bifentrina em uma mesma formulação não alterou a toxicidade do piretroide.

5. CONCLUSÕES

Na dose recomendada o piretróide bifentrina tem alta eficiência (100%) e ação rápida (em menos de 12 horas) no controle da broca do café *Hypothenemus hampei*. Já o neonicotinóide acetamipride não tem eficiência no controle dessa praga. A mistura acetamipride + bifentrina tem efeito similar a este piretróide. Esses inseticidas não apresentam efeito sobre a preferência alimentar, oviposição e desenvolvimento larval da broca do café.

Portanto, a bifentrina pode ser recomendada nos programas de manejo integrado de *H. hampei* em lavouras de café devido a sua eficiência ação rápida de controle.

FIGURAS

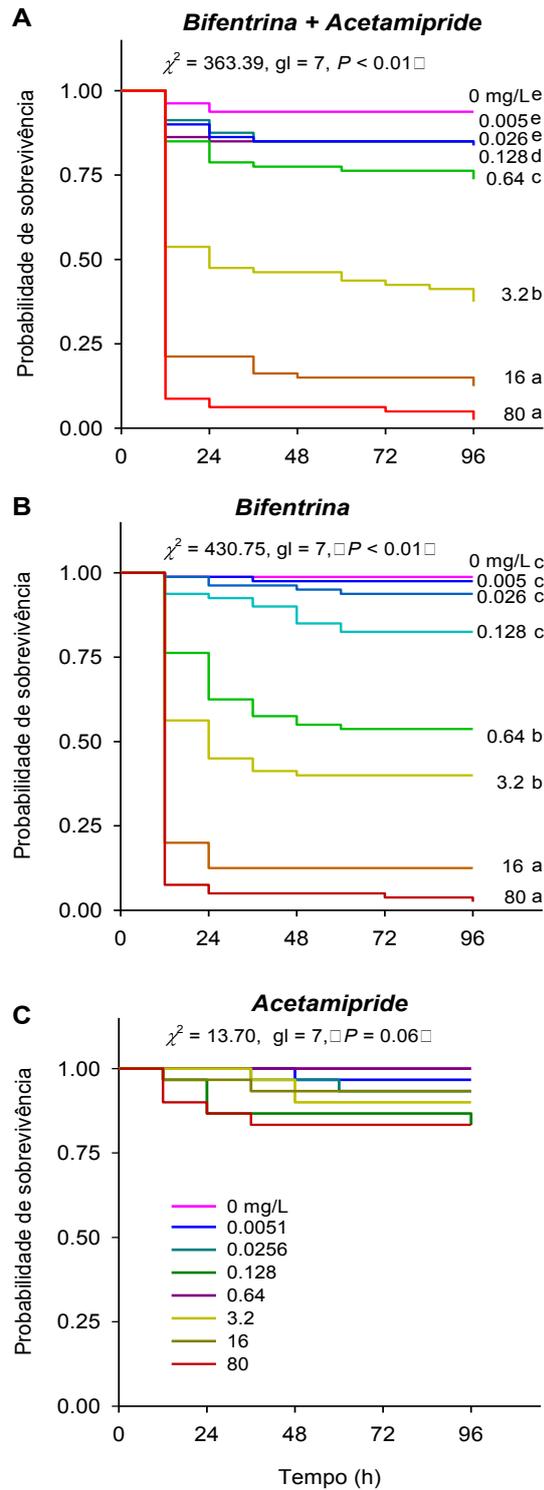


Figura 1- Curvas de sobrevivência de *Hypothenemus hampei* da expostos a frutos de café tratados com os inseticidas **A)** Bifentrina+acetamipride **B)** bifentrina e **C)** acetamipride. Curvas com a mesma letra não diferem entre si ($P > 0.05$, método de Holm-Sidak).

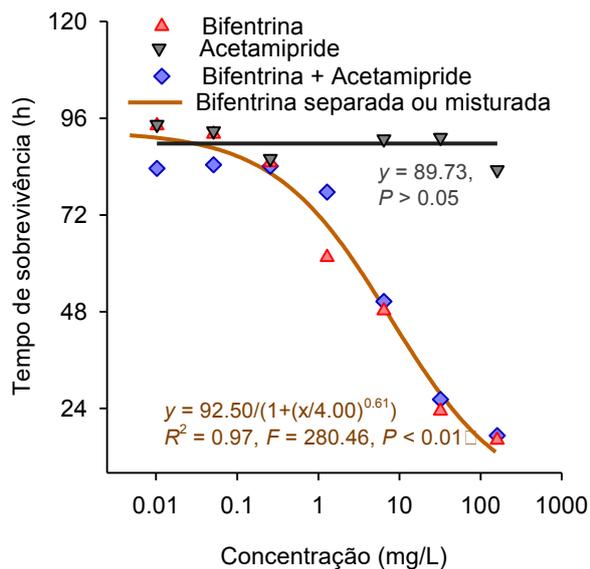


Figura 2 - Rapidez de ação inseticida contra *Hypothenemus hampei* em relação à concentração de bifentrina e acetamipride em mistura e separados. Os dados são estimativas do tempo médio de sobrevivência obtidas nas análises dos dados da Fig.1.

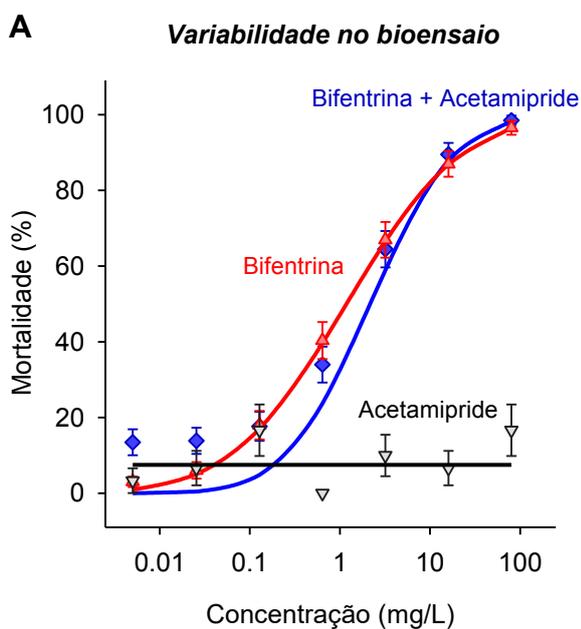


Figura 3 - Curvas concentração-mortalidade de *Hypothenemus hampei* expostas a frutos de café tratados com bifentrina+acetamipride (N = 790), bifentrina (N = 640) e acetamipride (N = 640). **A**) Sigmoide com eixo das coordenadas em escala linear mostrando a variação dos dados do bioensaio.

Raios-X Acetamipride + Bifentrina

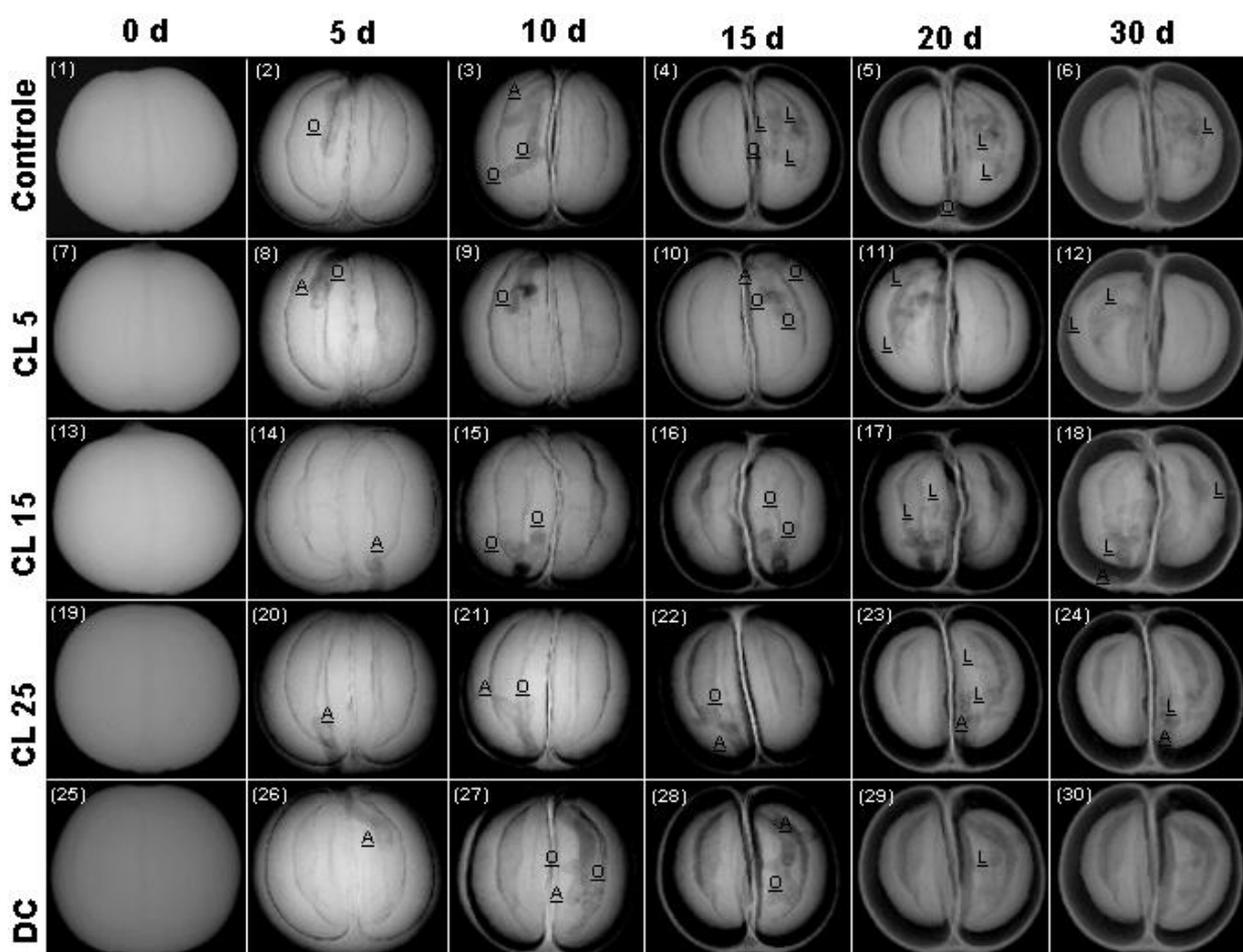


Figura 4 - Sequência de tempo de imagens de raios-X mostrando o número de indivíduos de *Hypothenemus hampei* presentes (ovos, larvas e adultos) em um único fruto de café colonizado após 30 dias de exposição aos diferentes tratamentos com o inseticida bifentrina+acetamipride e o tratamento controle. Cada letra dentro da imagem corresponde a larvas (L), adultos (A) e ovos (O).

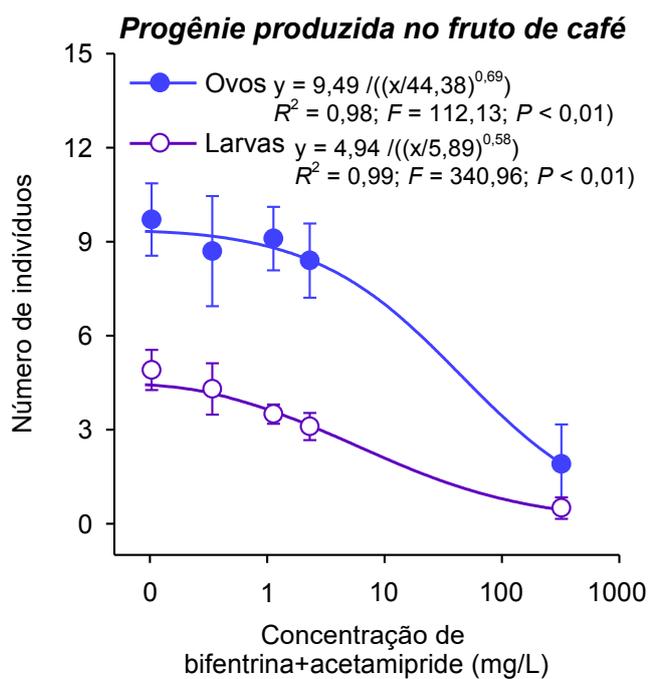


Figura 5 - Produção de progênie por fêmeas de *Hypothenemus hampei* em frutos previamente mergulhados em concentrações da mistura de bifentrina+acetamipride. As concentrações usadas correspondem às CL₅, CL₁₅, CL₂₅ e à dosagem recomendada pelo fabricante no rótulo do produto. Os dados são médias e erros padrões, $n = 10$.

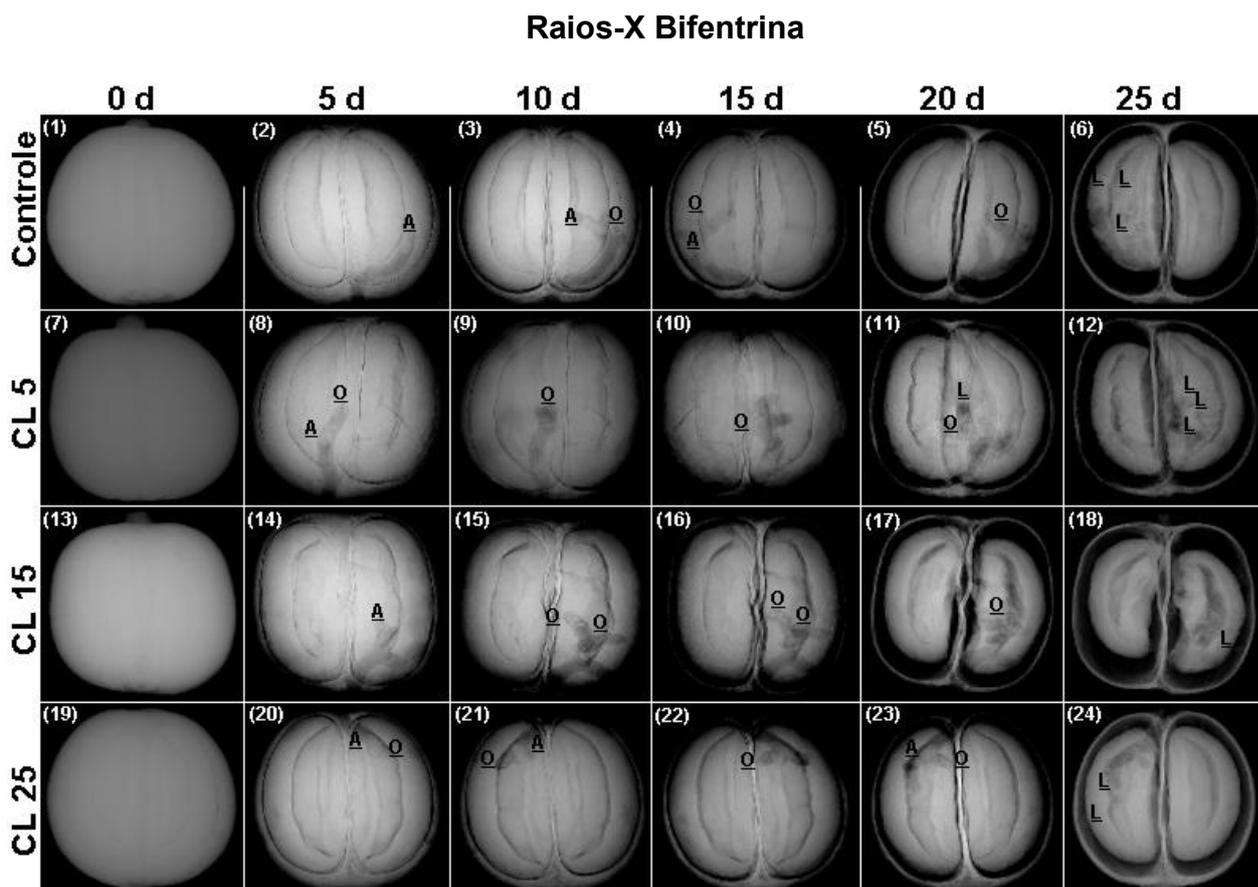


Figura 6 - Sequência de tempo de imagens de raios-X mostrando o número de indivíduos de *Hypothenemus hampei* presentes (ovos, larvas e adultos) em um único fruto de café colonizado após 30 dias de exposição aos diferentes tratamentos com o inseticida bifentrina e o tratamento controle. Cada letra dentro da imagem corresponde a larvas (L), adultos (A) e ovos (O).

REFERÊNCIAS

- Andrade, A. L. Eficácia de inseticidas para manejo da broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae). 2019. 20 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.
- Araya-Rojas, Leonel Adelson, 2020. 39 f. Tese Mestrado. Proteção de frutos de café contra *Hypothenemus hampei* por inseticidas: quanto mais velho, melhor? Federal University of Vicosa.
- Aristizábal, L. F., Bustillo, A. E., & Arthurs, S. P. (2016). Integrated pest management of coffee berry borer: Strategies from Latin America that could be useful for coffee farmers in Hawaii. *Insects*, Vol. 7. <https://doi.org/10.3390/insects7010006>.
- Bažok, Renata & Buketa, Marina & Lopatko, D. & Ljekar, K. (2012). Past and present sugar beet pest management practice. 12. 414-428.
- Brindley, W. A., and Selim, A. A. 1984. Synergism and antagonism in the analysis of insecticide resistance. *Environ. Entomol.* 13:348-353.
- Bustillo, A.E., 2006.- Una revisión sobre la broca del café *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) en Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*, 32 (2): 101-116.
- Chediak, M. (2009). Dinâmica e fatores-chave de mortalidade da broca do café (*Hypothenemus hampei*).
- Christopher Cutler, G., Guedes, R.N.C., 2017. Occurrence and significance of insecticide-induced hormesis in insects, in: ACS Symposium Series. American Chemical Society, pp. 101–119. <https://doi.org/10.1021/bk-2017-1249.ch008>
- Companhia nacional de abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de café - safra 2018 (primeiro levantamento). Brasília, DF, 2018. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/index.php/info-agro/safras/cafe>>. Acesso em: 15 abr. 2018.
- Damon, A., 2000. A review of the biology and control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). *Bull. Entomol. Res.* 90, 453–465. <https://doi.org/10.1017/s0007485300000584>.
- Davies, T. G. E., Field, L. M., Usherwood, P. N. R., & Williamson, M. S. (2007). DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB Life*. <https://doi.org/10.1080/15216540701352042>.
- De Souza, R.A., Pratisoli, D., de Araujo Junior, L.M., Pinheiro, J. de A., Souza, J.F.V., Madalon, F.Z., Deolindo, F.D., Damascena, A.P., 2020. *Hypothenemus hampei ferrari* (Coleoptera: Curculionidae) answer to visual and olfative stimuli in field. *Coffee Sci.* 15, 1–6. <https://doi.org/10.25186/v15i.1656>
- FAO. (2019). FAO Statistical Pocketbook 2019: World food and agriculture. In Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://doi.org/978-92-5-108802-9>
- Ffrench-Constant, R.H., Steichen, J.C., Brun, L.O., 1994. A molecular diagnostic for endosulfan insecticide resistance in the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). *Bull. Entomol. Res.* 84, 11–15. <https://doi.org/10.1017/S000748530003217X>

- Fishel, F.M., 2005. Pesticide Toxicity Profile: Synthetic Pyrethroid Pesticides 1, EDIS.
- Gonring, A. H. R., F. M. de A. Silva, E. da cruz M. Picelli, R. A. Plata-Rueda, J. E. R. Gorri, and F. L. Fernandes. 2019. Comparative bioassay methods to determine diamide susceptibility for two coffee pests. *Crop Prot.* 121: 34–38.
- ICO International Coffee Organization, International Coffee Organization. Available at: www.ico.org (Accessed: 5 December 2017).
- Infante, F., Pérez, J.; Vega, F.E. Redirect research to control coffee pest. *Nature*, v.489, p.502-502, 2012.
- Janssen, M.P.M., 2011. Endosulfan. A closer look at the arguments against a worldwide phase out. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu RIVM.
- Jaramillo, J., Borgemeister, C., & Baker, P. (2006). Coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae): Searching for sustainable control strategies. *Bulletin of Entomological Research*, 96(3), 223-233. doi:10.1079/BER2006434.
- Jaramillo, J.; Chabi-olaye, A.; Kamonjo, C.; Jaramillo, A.; Vega, F.E.; Poehlong, H.M.; Borgemeister, C. Thermal tolerance of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*: predications of climate change impact on a tropical insect pest. *Plos One*, v.4, n.8, p.1-11, 2009.
- Johnson, M.A., Ruiz-Diaz, C.P., Manoukis, N.C., Rodrigues, J.C.V., 2020. Coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*), a global pest of coffee: Perspectives from historical and recent invasions, and future priorities. *Insects* 11, 1–35. <https://doi.org/10.3390/insects11120882>
- MAPA, 2020. AGROFIT - Sistema de Agrotóxicos fitossanitários [Ministerio da Agric. Pecuária e Abastecimento]. Disponível em t: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons.
- Messing, R. H. (2012). The coffee berry borer (*hypothenemus hampei*) invades hawaii: Preliminary investigations on trap response and alternate hosts. *Insects*. <https://doi.org/10.3390/insects3030640>
- Metellus, D., Sampaio, M.V., Celoto, F.J., 2020. Activity of insecticides on coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae, scolytinae). *Biosci. J.* 36, 1099–1115. <https://doi.org/10.14393/BJ-v36n4a2020-46735>.
- Moratelli, RF. (2010). Eficiência de algunos insecticidas en el control del pulgón de maíz IN Congresso Brasileiro de Entomologia, Anais: Natal, Brasil. Sociedade Entomológica do Brasil (22, 2010, Brasil).
- Mota, L.H.C., Silva, W.D., Sermarini, R.A., Demétrio, C.G.B., Bento, J.M.S., Delalibera, I.JR. Autoinoculation trap for management of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) with *Beauveria bassiana* (Bals.) in coffee crops, *Biological Control*, v.111, p.32-39, 2017.
- Nauen, R., & Denholm, I. (2005). Resistance of insect pests to neonicotinoid insecticides: Current status and future prospects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. <https://doi.org/10.1002/arch.20043>
- Oliveira, C. N. de, Neves, P. M. O. J., & Kawazoe, L. S. (2003). Compatibility between the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and insecticides used in coffee plantations. *Scientia Agricola*. <https://doi.org/10.1590/s0103-90162003000400009>

- Oliveira, C.M.; Auad, A.M.; Mendes, S.M.; Frizzas, M.R. Economic impact of exotic insect pests in Brazilian agriculture. *Journal of Applied Entomology*, v.137, n.1-2, p.1-15, 2013.
- Plata-Rueda, A., Carlos Martínez, L., Karina Da Silva, B.R., Zanuncio, J.C., Elisa de Fernandes, M.S., Narciso Guedes, R.C., Fernandes, F.L., 2019a. Exposure to cyantraniliprole causes mortality and disturbs behavioral and respiratory responses in the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*). <https://doi.org/10.1002/ps.5358>
- Plata-Rueda, A., Martínez, L.C., Costa, N.C.R., Zanuncio, J.C., de Sena Fernandes, M.E., Serrão, J.E., Guedes, R.N.C., Fernandes, F.L., 2019b. Chlorantraniliprole-mediated effects on survival, walking abilities, and respiration in the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 172, 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.063>.
- Pulgarín Giraldo, Luis Felipe, 2016 Evaluación de la eficacia de los insecticidas acetamiprid, clorfenapir y metaflumizone para el manejo de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolitinae). (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia.
- Rehner, S.A., Posada, F., Buckley, E.P., Infante, F., Castillo, A., Vega, F.E., 2006. Phylogenetic origins of African and Neotropical *Beauveria bassiana* s.l. pathogens of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. *J. Invertebr. Pathol.* 93, 11–21.
- Silva, A. F. Campanha contra a broca-do-café. São Paulo, Histórias, Ciências, Saúde-Manguinhos. *Entomologistas do Brasil*. São Paulo, v. 13, n. 4, p.957-993, jan. 2011.
- Souza, J. C.; Reis, P. R.; Silva, R. A. Cigarras-do cafeeiro em Minas Gerais: histórico, reconhecimento, biologia, prejuízos e controle. Belo Horizonte: Epamig, 2007. 47p. (Epamig. Boletim Técnico, 80).
- Souza, J.C.; Reis, P.R.; Silva, R.A.; Carvalho, T.A.F.; Pereira, A.B. Controle químico da broca-do-café com cyantraniliprole. *Coffee Science*, v.8, n.4, p.404-410, 2013.
- Souza, M. S. Parasitismo na população da Broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (coleóptera: curtilionidae), pelo parasitoide *Cephalonomiastephanoderis betrem* (Hymenoptera; Bethyilidae). *Entomologistas do Brasil*, Rio de Janeiro, v. 7, n. 3, p. 179-181, mar. 2014.
- Vega, F.E., Simpkins, A., Bauchan, G., Infante, F., Kramer, M., Land, M.F., 2014. On the eyes of male coffee berry borers as rudimentary organs. *PLoS One* 9 e85860.