

FENÓIS TOTAIS RELACIONADOS A RESISTÊNCIA DO CAFEIEIRO (*Coffea arabica*) AO BICHO-MINEIRO E A FERRUGEM, DURANTE AS FASES DE FRUTIFICAÇÃO

Paula Rodrigues Salgado²; José Laércio Favarin³; José Djair Vendramim⁴; Guerreiro Oliveira Filho⁵; Tiago Tezotto⁶, Ana Paula Neto⁶ e Rafael Tadeu de Assis⁶

¹Trabalho financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP

²Aluna de doutorado do Departamento de Produção Vegetal, ESALQ/USP, prsalgad@hotmail.com

³Professor Associado do Departamento de Produção Vegetal, ESALQ/USP, jlfavari@esalq.usp.br

⁴Professor Titular do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALQ/USP, jdvendra@esalq.usp.br

⁵Pesquisador do Instituto Agronômico de Campinas, IAC, oliveiro@iac.sp.gov.br

⁶Aluno de mestrado do Departamento de Produção Vegetal, ESALQ/USP

RESUMO: As plantas apresentam diferentes e complexos mecanismos de defesa, que atuam em conjunto, em respostas a estresses bióticos e abióticos, cuja natureza e intensidade de resposta variam com a idade, o grau de adaptação e a fenologia (OLIVEIRA, 2003). Este trabalho foi realizado com o objetivo de quantificar os fenóis totais presentes nas folhas de cafeeiro cultivares Catuaí e Obatã, durante as fases de frutificação e relacionar com o ataque de bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*) e ferrugem (*Hemileia vastatrix*). Os fenóis totais nas folhas foram quantificados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência. A concentração de fenóis totais nas folhas de cafeeiro variou durante as fases de frutificação, em que os menores teores foram determinados na fase de granação. As folhas infestadas com bicho-mineiro (*L. coffeella*) apresentaram menores valores de fenóis totais em relação às não infestadas, enquanto que nas cultivares Catuaí e Obatã não houve diferença. As folhas inoculadas por esporos de *H. vastatrix* não diferiram estatisticamente com as não inoculadas, no entanto a cv. Catuaí sem produção (0%) apresentou o maior teor de fenóis totais. Há evidências de que os compostos fenólicos participam do mecanismo de resistência do cafeeiro ao bicho-mineiro e à ferrugem.

Palavra-chave: *Coffea arabica*, fenóis totais, *Leucoptera coffeella*, *Hemileia vastatrix*

TOTAL PHENOLS RELATED TO COFFEE LEAF MINER AND RUST RESISTANCE, DURING FRUCTIFICATION STAGES

ABSTRACT: The vegetables show complex defense mechanisms which act together against to biotic and abiotic stresses, whose nature and intensity of response varies with age, the degree of adaptation and phenology. This work was carried out to quantify the total phenols present in the coffee leaves to cultivars Catuaí and Obatã during the fructification phases and relate to the attack of leaf miner (*Leucoptera coffeella*) and rust (*Hemileia vastatrix*). The total phenols in leaves were quantified by high performance liquid chromatography. The concentrations of total phenols in coffee leaves varied during fructification in the lower levels were determined during the grain filling. Leaves infested with leaf miner (*L. coffeella*) showed lower values of total phenols in relation to non-infested, while in plants cv. Catuaí and Obatã no difference. Leaves inoculated by spores of *H. vastatrix* not differ statistically with the non-inoculated, but the cv. Catuaí without production (0%) showed the highest content of total phenols. There is evidence that phenolic compounds participate in the mechanism of resistance to coffee leaf miner and rust.

Key words: *Coffea arabica*, Total phenols, *Leucoptera coffeella*, *Hemileia vastatrix*

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento do cafeeiro pode ser dividido em duas fases: vegetativa e reprodutiva. A fase reprodutiva corresponde basicamente a cinco épocas de frutificação: florescimento, fruto “chumbinho”, expansão, granação e maturação.

Durante o desenvolvimento do cafeeiro, as fases vegetativas e reprodutivas ocorrem concomitantemente, havendo competição por fotoassimilados entre ambas. Esta é uma das causas da alternância de produção da cultura, pois os frutos são formados nos ramos e partes dos ramos que se desenvolveram no ano anterior. Pode-se admitir que em anos de altas produções, a grande demanda por carboidratos comprometerá a vegetação, com redução nas taxas de

crescimento da planta em altura, diâmetro do caule e comprimento de ramos plagiotrópicos em cafeeiros em produção, comparado à ausência de produção (SALGADO et al., 2008).

A redução da área foliar do cafeeiro, devido principalmente ao ataque de pragas e doenças, provoca grandes prejuízos na produção dependendo das fases de frutificação do cafeeiro. Segundo Parra (1975), a produção do cafeeiro cv. Mundo Novo apresentou redução da ordem de 9, 24 e 87% quando a área foliar diminuiu em 25, 50 e 75% respectivamente, na fase inicial de frutificação. Já na fase de granação essas mesmas reduções da área foliar resultaram em danos na produção de 39, 43 e 46%.

O nível de produção das plantas é um fator que determina maior ou menor grau de infecção do cafeeiro pela ferrugem (*Hemileia vastatrix*) (ESKES; SOUZA, 1981; MANSK; MATIELLO, 1984; MATIELLO et al., 1984; ZAMBOLIM et al., 1997). Em plantas com elevada carga de frutos pode ocorrer desequilíbrio nutricional, com aumento da suscetibilidade do cafeeiro à ferrugem. Em geral, na época de formação de frutos os desequilíbrios são mais intensos (MORAES, 1983; ZAMBOLIM et al., 1985).

O metabolismo da planta não pode ser estudado individualmente, uma vez que não há uma divisão exata entre o metabolismo primário e secundário. As variações que ocorrem no metabolismo primário afetam diretamente os processos secundários. Os lipídios, as proteínas, os carboidratos e os ácidos nucléicos, que são comuns aos seres vivos e essenciais para a manutenção das células, são originados do metabolismo primário. Já as substâncias originadas a partir de rotas biossintéticas diversas e que estão restritas a determinados grupos de organismos, são produtos do metabolismo secundário (VICKERY; VICKERY, 1981). Salgado et al. (2008) observaram em *C. arabica* (cv. Obatã) com produção e sem produção, durante as fases de frutificação, que as concentrações foliares de metabólitos secundários não diferiram entre as plantas, no entanto àquelas sem produção apresentaram taxas de crescimento em diâmetro, comprimento de ramo e em altura superiores àquelas com frutos. Nas fases de granação e expansão dos frutos, em que há uma grande demanda de carboidratos e as condições climáticas são favoráveis para o crescimento vegetativo, as plantas com e sem produção apresentaram menores teores de fenóis totais, sugerindo que o metabolismo primário e o secundário são interdependentes e devem ser entendidos conjuntamente.

Os compostos produzidos a partir do metabolismo secundário são utilizados pelas plantas para defesa contra insetos, microrganismos e outros herbívoros. Estas substâncias distribuem-se, especificamente, nos tecidos da planta e uma complexa rede enzimática participa da síntese dos mesmos, os quais são armazenados em estado reduzido dentro dos vacúolos. Assim, quando a planta é submetida a qualquer tipo de estresse biótico ou abiótico, estes compostos passam de uma forma atóxica, reduzida e compartimentalizada para uma forma tóxica, não reduzida e descompartimentalizada (BECKMAN, 2000).

Esta pesquisa foi feita com o objetivo de quantificar os fenóis totais presentes nas folhas de cafeeiro cultivares Catuaí e Obatã, durante as fases de frutificação e relacionar com o ataque de bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*) e ferrugem (*Hemileia vastatrix*).

MATERIAL E MÉTODOS

Neste experimento foram utilizadas plantas de *Coffea arabica* - cultivares Obatã (IAC 1669-20) e Catuaí Vermelho (IAC 99), em condições de campo, do Banco Ativo de Germoplasma do Instituto Agrônomo de Campinas, na Fazenda Santa Eliza, Campinas-SP, situada a 22°53'33,94'' de latitude Sul, 47°04'33,66'' de longitude Oeste e 646 m de altitude. O delineamento experimental foi constituído por dois tratamentos e 7 repetições (1 planta por repetição).

Paralelamente foi conduzido um experimento com a cultivar Catuaí Vermelho (IAC 99), constituído de três tratamentos e 7 repetições (1 planta por repetição): T1 - plantas com 100% de frutos, T2 - plantas com 50% de frutos e T3 - plantas sem frutos. Os tratamentos com produção (50% de frutos) e sem produção foram obtidos pela retirada dos frutos, no início da fase "chumbinho", de cada ramo da planta. Esse experimento foi realizado com a finalidade de relacionar a produção do cafeeiro com a incidência de ferrugem, tanto no campo como em laboratório.

A coleta das folhas destinadas às análises bioquímicas, das cultivares selecionados (Catuaí sem produção, Catuaí com 50% e 100% de produção e Obatã) foi efetuada em quatro épocas que corresponderam às fases de frutificação do cafeeiro: (i) florescimento (13/11/2007); (ii) fruto "chumbinho" (15/01/2008); (iii) granação (27/02/2008) e (iv) maturação (29/04/2008). Essas folhas foram congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente liofilizadas e maceradas.

As folhas para os testes, em laboratório, de resistência à infestação de bicho-mineiro e à infecção de ferrugem foram coletadas na fase de maturação do fruto. Para tanto, usou 15 pares de folhas sadias por planta, sendo 10 folhas para o teste com o bicho-mineiro, 10 folhas para o teste com a ferrugem e as 10 folhas restantes como testemunha, totalizando 105 folhas por tratamento. As folhas de cada cultivar foram organizadas em placas furadas de Isopor®, as quais foram colocadas dentro de caixas plásticas com solução de benziladenina na concentração de 10^{-7} M (REIS JUNIOR, 2000).

As caixas com as folhas em solução de benziladenina 10^{-7} M, destinadas aos testes de resistência ao bicho-mineiro foram colocadas individualmente dentro da gaiola de infestação para oviposição. Cada cultivar permaneceu no interior da gaiola por uma noite, sendo anotada a data para o acompanhamento das fases de desenvolvimento do inseto. As caixas foram armazenadas em prateleiras e cobertas com tecido de algodão (voil), em condições controladas até o surgimento das primeiras pupas.

A avaliação do nível de resistência ao bicho-mineiro foi feita mediante escala de 1 a 4 pontos, segundo metodologia descrita por Guerreiro-Filho (1999), que consiste na classificação das plantas quanto à resistência em função do tipo de lesão apresentada após infestação artificial em laboratório (Tabela 1) (Figura 1).

Tabela 1 - Escala de pontos para a classificação de plantas em função da análise do tipo de lesão desenvolvida em discos foliares pelo ataque de *Leucoptera coffeella*

Pontos	Classificação	Descrição
1	Resistente	Lesões pontuais
2	Moderadamente resistente	Lesões filiforme pequenas
3	Moderadamente suscetível	Lesões grandes irregulares
4	Suscetível	Lesões grandes arredondadas

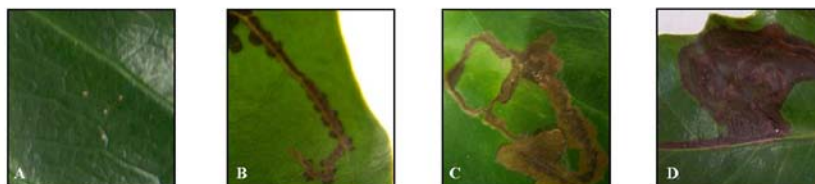


Figura 1 - Tipos de lesões produzidas por *Leucoptera coffeella* em folhas de cafeeiros com diferentes níveis de resistência. (A) lesão pontual; (B) lesão filiforme pequena; (C) lesão grande irregular; (D) lesão grande arredondada

Para a inoculação das folhas com *Hemileia vastatrix* foi aspergida a suspensão de uredíniosporos nas superfícies abaxiais das folhas coletadas no campo. As folhas inoculadas foram mantidas no escuro por meio da cobertura das caixas com um saco plástico preto por 48h e umidade relativa de $85\% \pm 3\%$ e temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. As caixas foram transferidas para câmara e mantidas em condições adequadas até o surgimento dos sintomas.

O surgimento dos primeiros sintomas ocorreu após 22 dias da inoculação. A intensidade da infecção nas folhas dos germoplasmas foi quantificada por meio do software para quantificação de doenças em plantas - Quant V. 1.0 (Vale et al., 2002) e os resultados expressos em porcentagem de área foliar lesionada.

Após a avaliação do nível de resistência ao bicho-mineiro e à ferrugem as folhas dos tratamentos foram congeladas, maceradas e preparadas para análise bioquímica.

Durante o processo de extração das amostras de folhas foi usado como solvente o metanol (MeOH) grau HPLC. Dois reagentes Carrez são também usados nesse processo, Carrez A (21,9 g de acetato de zinco em 100 ml de água) e Carrez B (10,6 g de ferrocianeto de potássio em 100 ml de água). As amostras foram extraídas em ultra-som e centrifugadas por 20min à 6000rpm.

Utilizou-se o cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu, modelo LC-20A) para as análises em CLAE-DAD, em sistema de gradiente constituído por duas bombas, um controlador de sistema e detector UV-VIS com arranjos de fotodiodo (Shimadzu, modelo SPD-M20A), ajustado para 210-600nm. Os espectros foram monitorados em três comprimentos de onda: 220 nm, 270 nm e 310 nm. Os dados obtidos foram analisados e integrados por meio do software Shimadzu LC-solution. Duas colunas monolíticas (OnyxTM 100 x 3,0 mm, C18 Phenomenex) em linhas e uma pré-coluna monolítica (OnyxTM 5 x 4,5 mm, C18 Phenomenex) foram utilizadas para as análises no cromatógrafo líquido. Os solventes utilizados na fase móvel foram acetonitrila e ácido acético. Para a quantificação dos compostos selecionados utilizou-se a área dos gráficos fornecidos pelo software Shimadzu LC-solution.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos experimentos em laboratório, de resistência ao bicho-mineiro e à ferrugem, foram os esperados, revelando uma variação entre as populações no nível de expressão de resistência à ferrugem, **enquanto** em relação ao ataque do bicho-mineiro não houve diferença estatística entre a cultivar Catuí e Obatã, que apresentaram lesões do tipo 4 (Tabela 2). A duração entre as fases de ovo à lagarta também não houve diferença entre as cultivares, **o que indica** que as mesmas são adequadas para o desenvolvimento do bicho-mineiro.

A cultivar Obatã, resistente à ferrugem, não apresentou lesões quando inoculadas com esporos de *H. vastatrix*. Já os tratamentos com cv. Catuí apresentaram variações na porcentagem de área lesionada, sendo que as plantas sem produção tiveram menores valores (Tabela 2).

O nível de produção do cafeeiro está intimamente relacionado com a incidência de ferrugem no campo, uma vez que altas cargas de frutos comprometem o estado nutricional com o aumento da suscetibilidade da planta à ferrugem (ESKES; SOUZA, 1981; MANSK; MATIELLO, 1984; MATIELLO et al., 1984; ZAMBOLIM et al., 1997). Neste contexto, as plantas selecionadas da cv. Catuí, suscetível à ferrugem, foram desbastadas em diferentes níveis de produção (0%, 50% e 100% de frutos), conforme descrito no item 3.1. Os resultados obtidos foram os esperados, em que as plantas sem frutos apresentaram menores valores de área foliar lesionada, no entanto não houve diferença entre as plantas com 50% dos frutos e as plantas com 100% (Tabela 3), uma vez que a produção de grãos (g) entre os dois

tratamentos foi semelhante (4.471g - Catuaí 0% e 4.314g – Catuaí 100%). Esta semelhança se deve, provavelmente, ao fato de que as plantas raleadas (50% dos frutos) favoreceram a granação, resultando em frutos maiores. Importante salientar que não foi feito o peso de 100 sementes.

Tabela 2 - Nível de resistência ao bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*) e à ferrugem (*Hemileia vastatrix*), das cultivares Catuaí sem produção e com 50% e 100% de produção e Obatã, avaliados em laboratório, mediante o uso de escala de pontos (1-4) e duração em dias das fases de ovo à lagarta e porcentagem de área lesionada, respectivamente

Germoplasma	<i>Leucoptera coffeella</i>				<i>Hemileia vastatrix</i>	
	Escala de dano		Duração (ovo-lagarta)		Área lesionada	
	Médias (pontos)	Desvio Padrão	Médias (dias)	Desvio Padrão	Médias (%)	Desvio Padrão
Catuaí 0%		6,0 b	0,38
Catuaí 50%		10,9 a	1,53
Catuaí 100%	3,9 a	0,08	18,0 a		8,6 a	2,17
Obatã	3,7 a	0,15	18,5 a		0,0 c	0,0

** Médias seguidas por uma mesma letra, nas colunas, não diferem pelo teste Tukey 5%
 (...) Dado numérico não disponível

Os teores de fenóis totais variaram durante os estágios de maturação do cafeeiro de forma semelhante entre as cultivares (Figura 2), com uma diminuição acentuada na síntese dos compostos fenólicos na fase de granação.

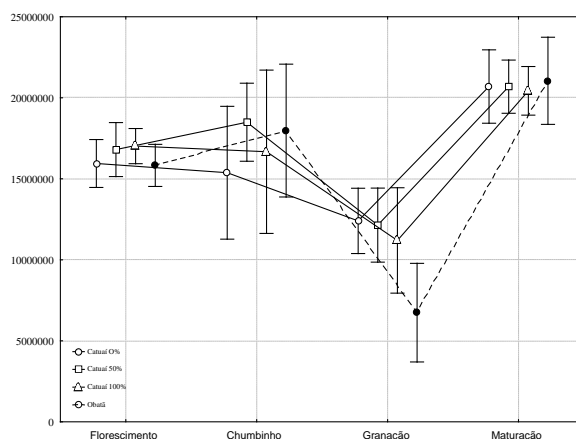


Figura 2 - Representação gráfica da variação dos teores de fenóis totais nas cultivares Catuaí sem (—○—) e com 50% (—□—) e 100% (—△—) de produção e Obatã (—●—), durante as fases de frutificação do cafeeiro - florescimento, fruto “chumbinho”, granação e maturação

Na fase de granação do fruto, **quando** há maior demanda por carboidrato para enchimento do grão, a planta prioriza o metabolismo primário em detrimento da síntese de fenóis totais. Esse mesmo comportamento foi observado por Salgado et. al (2008) em *C. arabica*, em que a concentração de fenóis totais na planta diminuiu nas fases de expansão e granação, época em que o acúmulo de matéria seca é da ordem de 44,6% e 27,2%, respectivamente (CHAVES E SARRUGE, 1984).

Nos meses de fevereiro e março, fase de granação do cafeeiro, observou-se na área experimental, na região de Campinas, um período de alta incidência de bicho-mineiro, sendo a cv. Obatã a mais atacada pelo inseto (Figura 3). Já o período de alta incidência de ferrugem ocorreu nos meses de abril e maio (fase de maturação), em que os tratamentos cv. Catuaí 100% e Catuaí 50% foram os mais infectados pelo patógeno (Figura 4).

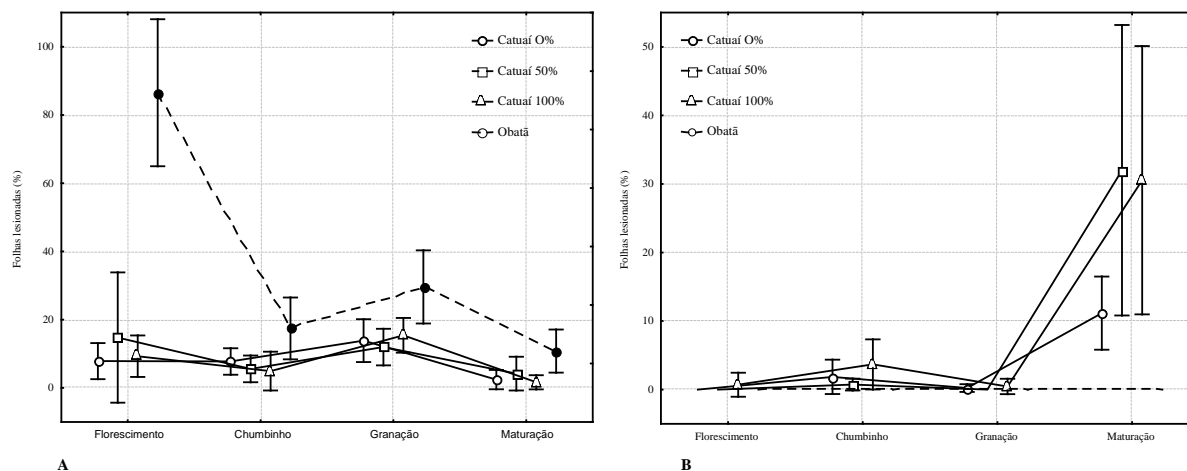


Figura 3 - Representação gráfica da variação de folhas lesionadas pelo ataque de bicho-mineiro (%) (A) e pela infecção de ferrugem (%) (B) nas cultivares Catuaí sem (○) e com 50% (□) e 100% (△) de produção e Obatã (●), durante as fases de frutificação do cafeeiro – florescimento, chumbinho, granação e maturação

A diferença de incidência de ferrugem no campo encontrada entre as cultivares foi semelhante àquela observada em laboratório (Tabela 2), em que a cv. Catuaí sem produção apresentou porcentagem de área lesionada inferior aos tratamentos Catuaí 50% e 100% de produção (Tabela 3).

Tabela 3 - Valores médios e desvio padrão das variáveis fenóis totais (área dos picos), folhas lesionadas por bicho-mineiro (%) e folhas lesionadas por ferrugem (%), nas cultivares Catuaí sem e com 50% e 100% de produção e Obatã

Variável	Catuaí 0%		Catuaí 50%		Catuaí 100%		Obatã								
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão							
Fenóis Totais	16105241	a	4060015		17031781	a	3810414		16329721	a	4645244		15397774	a	6048029
Bicho-mineiro (%)	7,9	b	6,4		9,1	b	11,5		7,8	b	7,3		36,0	a	32,7
Ferrugem (%)	3,3	ab	5,6		8,2	a	17,7		8,9	a	16,4		0,0	b	0,0

* Médias seguidas por uma mesma letra, nas linhas, não diferem pelo teste Tukey 5%

Os teores de fenóis totais nas folhas destinadas aos testes de resistência ao bicho-mineiro, não diferiram estatisticamente entre as cultivares Catuaí e Obatã (Tabela 4), no entanto observou uma maior concentração dos fenóis totais nas folhas não infestadas (testemunhas) quando comparadas com folhas infestadas pelo bicho-mineiro (Tabela 5).

Tabela 4 - Valores médios e desvio padrão dos fenóis totais (área dos picos) nas folhas, das cultivares Catuaí e Obatã, destinadas aos testes, em laboratório, de resistência ao bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*)

Variável	Catuaí		Obatã				
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão			
Fenóis Totais	16988282	a	2905808		16262503	a	1964996

* Médias seguidas por uma mesma letra, nas linhas, não diferem pelo teste Tukey 5%

Pode-se atribuir a semelhança na concentração de fenóis totais nas folhas das cultivares Catuaí e Obatã, à suscetibilidades destas plantas ao ataque do bicho-mineiro. No momento em que há lesões decorrentes do ataque do inseto a planta diminui os teores de fenóis totais, que foi utilizado de alguma forma neste complexo mecanismo de defesa da planta

Tabela 5 - Valores médios e desvio padrão dos fenóis totais (área dos picos) nas folhas infestadas, em laboratório, por bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*) e não infestadas (testemunha)

Variável	Não Infestada		Infestada				
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão			
Fenóis Totais	18368150	a	16729778		15173094	b	2024278

* Médias seguidas por uma mesma letra, nas linhas, não diferem pelo teste Tukey 5%

As folhas inoculadas com esporos de *H. vastatrix* apresentaram concentrações semelhantes de fenóis totais com a testemunha (folha não inoculada) (Tabela 6). Já os valores de fenóis totais quando comparados entre as cultivares diferiram estatisticamente (Tabela 7).

Tabela 6 - Valores médios e desvio padrão dos fenóis totais (área dos picos) nas folhas inoculadas, em laboratório, por ferrugem (*Hemileia vastatrix*) e não inoculadas (testemunha)

Variável	Inoculada		Não Inoculada	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Fenóis Totais	20490918 a	3208484	19681965 a	2879539

* Médias seguidas por uma mesma letra, nas linhas, não diferem pelo teste Tukey 5%

Ao contrário do que ocorreu nas folhas destinadas aos testes de resistência ao bicho-mineiro, as folhas inoculadas com *H. vastatrix* não apresentaram diferenças nas concentrações de fenóis totais em relação às não inoculadas, uma vez que há diferentes níveis de resistência à ferrugem entre as cultivares, sendo a cv. Obatã resistente a ferrugem.

Tabela 7 - Valores médios e desvio padrão dos fenóis totais (área dos picos) nas folhas, das cultivares Catuaí sem produção e com 50% e 100% de produção e Obatã, destinadas aos testes de resistência à ferrugem (*Hemileia vastatrix*) em laboratório

Variável	Catuaí 0%		Catuaí 50%		Catuaí 100%		Obatã	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Fenóis Totais	22550383 a	3301166	20537359 ab	3753025	19200726 b	1803351	18473950 b	1764961

* Médias seguidas por uma mesma letra, nas linhas, não diferem pelo teste Tukey 5%

O tratamento Catuaí sem produção (0%) apresentou maior valor de fenóis totais em relação aos outros tratamentos e menor incidência de ferrugem no campo entre os tratamentos da cv. Catuaí, observando um mecanismo de defesa mais eficiente. Já a cv. Obatã, resistente a ferrugem, não aumentou a síntese de fenóis totais.

Há evidências de que os compostos fenólicos participam da resistência do cafeeiro ao bicho-mineiro e à ferrugem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BECKMAN, C.H. Phenolics-Storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in disease resistance and in general defence responses in plants? **Physiological and molecular plant pathology**, London, v. 57, p. 101-110, 2000.
- CHAVES, J.C.D.; SARRUGE, J.R. Alterações nas concentrações de macronutrientes nos frutos e folhas do cafeeiro durante o ciclo produtivo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.19, n.4, p.427-432, 1984.
- ESKES, A.B.; SOUZA, E.Z. Ataque de ferrugem em ramos com e sem produção, de plantas da cultivar Catuaí. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 9, 1981, São Lourenço: **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC-GERCA, 1981. p. 186-188.
- GUERREIRO FILHO, O.; MAZZAFERA, P. Caffeine does not protect coffee against the leaf miner *Perileucoptera coffeella*. **Journal Chemical Ecology**, New York, v. 26, p. 1447-1464, 1999.
- MANSK, Z.; MATIELLO, J.B. Efeito da produção, nível de desfolha e inóculo residual sobre a evolução da ferrugem do cafeeiro no Estado do Espírito Santo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 11, 1984. Londrina: **Resumos...** Rio de Janeiro, IBC-GERCA, 1984. p.128-130
- MATIELLO, J.B.; ALVES, D.P.; PINHEIRO, M.R.; MANSK, Z. Efeito da carga pendente e do inóculo residual sobre a evolução da ferrugem do cafeeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 11, 1984. Londrina: **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC-GERCA, 1984. p. 304-306.
- MORAES, S.A. A ferrugem do cafeeiro: importância, condições pré-disponíveis, evolução e situação no Brasil. Campinas: IAC, 1983. 50p. (Circular Instituto Agrônomo, 119).
- OLIVEIRA, R.F. de. A planta sob estresse. **III Curso de Atualização em Café**, Campinas, 2003.
- PARRA, J.R.P. **Bioecologia de *Perileucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville, 1842) (Lepidoptera – Lyonetiidae) em condições de campo**. 1975. 114p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1975.
- REIS JUNIOR, R.; LIMA, E.R.; VILELA, E.F.; BARROS, R.S. Method of maintenance of Coffee Leaves *In Vitro* for Mass Rearing of *Leucoptera coffeellum* (Guérin-Mèneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 29, n. 4, p. 849-854, dez. 2000.
- SALGADO, P.R.; FAVARIN, J.L.; LEANDRO, R.A.; LIMA FILHO de, O.F. **Total phenol concentration in coffee tree leaves during fruit development**. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 65, n.4, p. 354-359, July/August 2008.
- ZAMBOLIM, L., ACUÑA, R.S.; VALE, F.X.R.; MACABEU, A.J.; CHAVES, G.M. Influência da carga pendente sobre o desenvolvimento da ferrugem do cafeeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 12, 1985 Caxambu: **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC-GERCA, 1985. p. 123-125.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R. do; PEREIRA, A.A.; CHAVES, G.M. Café (*Coffea arabica* L.): controle de doenças. In: VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, (Eds). Controle de doenças de plantas: grandes culturas. Viçosa: UFV, 1997. v. 1, p. 83-140.

VALE, F.X.R.; FERNANDES FILHO, E. I.; LIBERATO, J.R. *Software* para quantificação de doenças – Quant versão 1.0, Universidade Federal de Viçosa, 2002

VICKERY, M.L.; VICKERY, B. **Secondary plant metabolism**. London: The Macmillan press, 1981. 335p.