

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

METODOLOGIA DE CRIAÇÃO MASSAL DA BROCA-DO-CAFÉ COM NOVAS  
DIETAS ARTIFICIAIS, E POTENCIAL DE CONTROLE COM FUNGOS  
ENTOMOPATOGÊNICOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

JULIANA SILVA FERREIRA

UBERLÂNDIA  
MINAS GERAIS – BRASIL

2022

JULIANA SILVA FERREIRA

METODOLOGIA DE CRIAÇÃO MASSAL DA BROCA-DO-CAFÉ COM NOVAS  
DIETAS ARTIFICIAIS, E POTENCIAL DE CONTROLE COM FUNGOS  
ENTOMOPATOGÊNICOS

Dissertação apresentada a Universidade Federal de  
Uberlândia, como parte das exigências do Programa de  
Pós-graduação em Agronomia – Mestrado, área de  
concentração em Produção Vegetal, para obtenção do  
título de Mestre.

Orientadora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanessa Andaló Mendes de Carvalho

Coorientador

Dr. Carlos Marcelo Silveira Soares

UBERLÂNDIA

MINAS GERAIS – BRASIL

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

F383m  
2022      Ferreira, Juliana Silva, 1996-  
Metodologia de criação massal da broca-do-café com novas dietas artificiais, e potencial de controle com fungos entomopatogênicos [recurso eletrônico] / Juliana Silva Ferreira. - 2022.

Orientadora: Vanessa Andaló Mendes de Carvalho.

Coorientador: Carlos Marcelo Silveira Soares.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.5076>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

I. Agronomia. I. Carvalho, Vanessa Andaló Mendes de, 1977-, (Orient.).II. Soares, Carlos Marcelo Silveira, 1963-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

---

CDU: 631



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
 Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Agronomia  
 Rodovia BR 050, Km 78, Bloco 1CCG, Sala 206 - Bairro Glória, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
 Telefone: (34) 2512-6715/6716 - www.ppga.iciag.ufu.br - posagro@ufu.br



## ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Agronomia				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, 014/2022, PPGAGRO				
Data:	Doze de agosto de dois mil e vinte e dois	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	17:50
Matrícula do Discente:	12012AGR011				
Nome do Discente:	Juliana Silva Ferreira				
Título do Trabalho:	Metodologia de criação massal da broca-do-café com novas dietas artificiais, e potencial de controle com fungos entomopatogênicos				
Área de concentração:	Produção Vegetal				
Linha de pesquisa:	Produção Vegetal em Áreas de Cerrado				

Reuniu-se por videoconferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Agronomia, assim composta: Professores Doutores: Franscinely Aparecida de Assis - Unicerrado; José Eduardo Marcondes de Almeida - Instituto Biológico; André Luiz Firmino - UFU; Vanessa Andaló Mendes de Carvalho - UFU orientadora da candidata.

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dra. Vanessa Andaló Mendes de Carvalho, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Franscinely Aparecida de Assis, Usuário Externo**, em 12/08/2022, às 17:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vanessa Andalo Mendes de Carvalho, Professor(a) do Magistério Superior**, em 12/08/2022, às 17:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamentono art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de](#)

[outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **André Luiz Firmino, Professor(a) do Magistério Superior**, em 12/08/2022, às 18:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **José Eduardo Marcondes de Almeida, Usuário Externo**, em 16/08/2022, às 18:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro](#)

[de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3825156** e o código CRC **5A653DF6**.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, voz maior dentre todas as vozes.

À minha família que, como sempre, foi torcida garantida pelo meu sucesso.

À minha orientadora, Dr<sup>a</sup>. Vanessa Andaló, e ao meu coorientador, Dr. Marcelo Soares pela oportunidade, pelo suporte e pelas críticas atenciosas e diretas.

Aos meus queridos colegas de trabalho Carla, Thaigoru e equipe de pesquisa e desenvolvimento que, com tanto esforço e otimismo, me ajudaram e contribuíram com este trabalho. Obrigada aos demais colegas que auxiliaram de alguma forma e que estiveram dispostos a conhecer ou discutir os temas abordados nesta proposta.

À empresa Nooa Ciência e Tecnologia Agrícola Ltda. que abriu suas portas e cedeu o espaço e materiais para a realização desta pesquisa contribuindo imensamente para minha formação profissional.

Ao Dr. José Eduardo e ao Instituto biológico por gentilmente cederem parte dos isolados utilizados nesta pesquisa.

Ao programa de pós-graduação em Agronomia da UFU (Universidade Federal de Uberlândia) pela oportunidade concedida.

Aos professores, que foram suficientemente generosos quanto à transmissão do saber.

Aos meus amigos e aos colegas de mestrado pela forma companheira de ser e agir.

Finalmente, agradeço ao Cícero pela cumplicidade, pelo apreço e pela paciência. Muito obrigada por não medir esforços em ajudar em todo o desenvolvimento do trabalho, pela troca de conhecimento, pelas correções e revisões as quais foram completamente indispensáveis para garantir a qualidade deste trabalho. Meus mais sinceros agradecimentos.

Muito obrigada a todos.

“A grande novidade está na forma de enxergar, ainda que as mesmas coisas. Se o novo habita os olhos, os olhos podem ouvir e os ouvidos, enxergar”

(VICTOR CHAVES)

## RESUMO

FERREIRA, JULIANA SILVA. Metodologia de criação massal da broca-do-café com novas dietas artificiais, e potencial de controle com fungos entomopatogênicos. 83 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Produção Vegetal) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2022.

A cafeicultura é de grande importância econômica para o Brasil, e alguns problemas fitossanitários que acometem o cafeeiro exigem maior atenção em seu controle, considerando a frequência de incidência, as áreas de ocorrências e as injúrias/danos causados às plantas afetando a produtividade. Dentre as principais pragas do cafeeiro destaca-se a broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae). Nos métodos de controle biológico dessa praga, destaca-se a utilização de fungos entomopatogênicos devido à facilidade produtiva, aplicação e eficácia. Para realização de pesquisas com entomopatógenos faz-se necessário a criação massal de broca-do-café que permita a utilização de um número significativo de insetos para essa finalidade. Dessa forma objetivou-se neste trabalho estabelecer uma metodologia para criação massal e manutenção da broca-do-café em dietas artificiais em laboratório e verificar o potencial de controle com fungos entomopatogênicos. Foi realizada a criação massal da broca em dieta artificial com dois períodos de incubação e, posteriormente, avaliação da geração de indivíduos totais em diferentes dietas. A partir dos resultados verificou-se que as dietas de Villacorta e Barrera (1993) modificadas, propiciaram a geração de mais descendentes de *H. hampei* com total médio de 48,8 e 41,3 indivíduos/broca após 60 dias de incubação. Com período de 80 dias de incubação, foi gerado 64 e 66 indivíduos/broca. Posteriormente, foram realizados dois bioensaios com 27 isolados de fungos entomopatogênicos para avaliar mortalidade confirmada de *H. hampei* e a partir dos resultados foram selecionados os isolados com mortalidade acima de 85% e os comerciais IBCB 66 e IBCB 425 para realização de ensaios de concentração letal e tempo letal. Os isolados de *Metarhizium anisopliae* IBCB 353 e IBCB 364 e o isolado NCTB 04 de *Beauveria* sp. causaram mais de 85% de mortalidade confirmada da broca-do-café. Nas avaliações de concentração letal os isolados IBCB 364 e 353 apresentaram maior letalidade e em relação ao tempo de letalidade, o isolado IBCB 66 foi o mais virulento, matando em menor tempo. Os ensaios de concentração e dose letais em comparação com os isolados comerciais mostraram que esses isolados têm potencial de controle desse inseto-praga em condições de laboratório.

**Palavras-chave:** *Beauveria bassiana*, biocontrole, bioprodutos, manejo de pragas, *Metarhizium anisopliae*.



## ABSTRACT

FERREIRA, JULIANA SILVA. Methodology of mass rearing of the coffee berry borer with new artificial diets, and control potential with entomopathogenic fungi. 83 f. Dissertation (Master in Agronomy / Vegetables Production) – Federal University of Uberlândia, Uberlândia, 2022.

Coffee cultivation is of great economic importance for Brazil, and some phytosanitary problems that affect the coffee plants require greater attention in their control, a frequency of incidence, areas of occurrence and injuries/damage to plants affecting productivity. Among the main pests of coffee, the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae) stands out. In the biological control methods of this pest, the use of entomopathogenic fungi stands out due to their ease of use, application and efficiency. In order to carry out research on entomopathogens, it is necessary to create a coffee berry borer mass that allows the use of a significant number of insects for this purpose. Thus, the objective of this work is to establish a methodology for mass rearing and maintenance of the coffee berry borer in artificial diets in the laboratory and to verify the control potential with entomopathogenic fungi. Mass rearing was carried out on an artificial diet with two incubation periods and, later, evaluation of the generation of total individuals on different diets. From the results it was verified that the modified diets of Villacorta and Barrera (1993) allowed the generation of more descendants of *H. hampei* with a mean total of 48,8 and 41,3 individuals/coffee berry borer after 60 days of incubation. With an incubation period of 80 days, 64 and 66 individuals/coffee berry borer were generated. Subsequently, two bioassays were carried out with 27 isolates of entomopathogenic fungi to assess confirmed mortality of *H. hampei* and from the results, isolates with mortality above 85% and commercial IBCB66 and IBCB425 were selected for lethal concentration and lethal time assays. The isolates of *Metarhizium anisopliae* IBCB353 and IBCB364 and the isolate NCTB 04 of *Beauveria* sp. caused more than 85% of confirmed coffee berry borer mortality. In the lethal concentration evaluations, the IBCB364 and 353 isolates showed higher lethality and in relation to the lethality time, the IBCB66 isolate was the most virulent, killing in the shortest time. The lethal concentration and dose assays compared to commercial isolates showed that these isolates have the potential to control this insect pest under laboratory conditions.

**Key words:** *Beauveria bassiana*, biocontrol, bioproducts, *Metarhizium anisopliae*, pest management.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b>	Ciclo básico da relação patógeno-hospedeiro de fungos anamórficos.....	15
<b>Figura 1.</b>	Armadilha de coleta de broca-do-café. (A) Vista lateral da armadilha, (B) Tampa cortada com tecido <i>voil</i> , (C) Vista superior com o fundo encaixado e (D) Vista superior com fundo desencaixado.....	51
<b>Figura 2.</b>	(A) Dieta solidificada, (B) Pote plástico com cubos de dieta, (C) Brocas-do-café em dieta artificial após 60 dias de incubação.....	53
<b>Figura 3.</b>	Fases de desenvolvimento de <i>Hypothenemus hampei</i> em dieta artificial. (A) Massa de ovos externa à dieta, (B) Massa ovos, (C) Larvas, (D) Pupas e adultos.....	56
<b>Figura 1.</b>	Colônias de fungos entomopatogênicos em meio Batata Dextrose Ágar (BDA). (A e B) <i>Metarhizium anisopliae</i> , (C e D) <i>Beauveria</i> sp., (E) <i>Cordyceps</i> sp., (F) Trichocomaceae (G) <i>Paecilomyces</i> sp. e (H) <i>Fusarium</i> sp.....	69
<b>Figura 2.</b>	(A) Pote plástico com as brocas-do-café tratadas, dieta e papel filtro umedecido, (B) Brocas colonizadas por <i>Beauveria bassiana</i> após sete dias de incubação, (C) Câmara úmida com insetos mortos após quatro dias de incubação. (A) Recipiente plástico com as brocas-do-café tratadas, dieta e papel filtro umedecido, (B) Brocas colonizadas por <i>Beauveria bassiana</i> após sete dias de incubação, (C) Câmara úmida com insetos mortos após quatro dias de incubação.....	70
<b>Figura 3.</b>	Brocas-do-café colonizadas por isolados de fungos entomopatogênicos. (A) IBCB 66 ( <i>Beauveria bassiana</i> ), (B) NCTB 04 ( <i>Beauveria</i> sp.), (C) IBCB 353 ( <i>Metarhizium anisopliae</i> ), (D) IBCB 364 ( <i>M. anisopliae</i> ), (E) IBCB 425 ( <i>M. anisopliae</i> ) .....	76

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Insetos-praga listados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento como organismos-alvo de produtos biológicos registrados a base de conídios de <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> no Brasil.....	25
<b>Tabela 1.</b>	Composição de duas dietas artificiais propostas por outros autores e quatro dietas modificadas utilizadas nos bioensaios.....	52
<b>Tabela 2.</b>	Ingredientes, marca comercial e custo de cada dieta.....	54
<b>Tabela 3.</b>	Número de descendentes de broca-do-café submetidas a diferentes dietas artificiais, após 60 dias.....	57
<b>Tabela 4.</b>	Número de descendentes de broca-do-café submetidas a diferentes dietas artificiais, após 80 dias. ....	58
<b>Tabela 1.</b>	Isolados e origem dos fungos entomopatogênicos.....	68
<b>Tabela 2.</b>	Tratamentos utilizados nos dois bioensaios para avaliação de potencial patogênico e de virulência à broca-do-café.....	71
<b>Tabela 3.</b>	Efeito de diferentes isolados de fungos entomopatogênicos na mortalidade da broca-do-café.....	74
<b>Tabela 4.</b>	Análise de Probit e concentrações letais (CL <sub>50</sub> e CL <sub>90</sub> ) preditas com base nos dados de resposta de <i>H. hampei</i> à aplicação de diferentes isolados de fungos entomopatogênicos.....	77
<b>Tabela 5.</b>	Análise de Probit e tempos letais (TL <sub>50</sub> e TL <sub>90</sub> ) preditos com base nos dados de resposta de <i>H. hampei</i> à aplicação de diferentes isolados de fungos entomopatogênicos.....	78

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>14</b>
<b>1.1. Cultura do cafeeiro: origem, aspectos econômicos, manejo e problemas fitossanitários</b> .....	<b>14</b>
<b>1.2. Broca-do-café <i>Hypothenemus hampei</i></b> .....	<b>16</b>
<b>1.3. Injúrias, danos e controle</b> .....	<b>18</b>
<b>1.4. Controle microbiano de pragas</b> .....	<b>22</b>
<b>1.5. Fungos entomopatogênicos: <i>Beauveria bassiana</i>, <i>Metarhizium anisopliae</i>, <i>Cordyceps fumosorosea</i> e <i>Fusarium</i> spp.</b> .....	<b>24</b>
<b>1.6. Mecanismo de ação de fungos entomopatogênicos</b> .....	<b>29</b>
<b>1.7. Criação massal de <i>Hypothenemus hampei</i></b> .....	<b>31</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>34</b>
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>46</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>47</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>48</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>49</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>50</b>
<b>2.1. Estabelecimento da criação massal de <i>Hypothenemus hampei</i></b> .....	<b>50</b>
<b>2.1.1. Obtenção da população inicial</b> .....	<b>50</b>
<b>2.1.2. Criação da broca-do-café</b> .....	<b>51</b>
<b>2.2. Avaliação de dietas artificiais para criação da broca-do-café</b> .....	<b>53</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>55</b>
<b>3.1. Criação e manutenção de <i>H. hampei</i> em dieta artificial</b> .....	<b>55</b>
<b>3.2. Avaliação de dietas artificiais para criação de <i>H. hampei</i></b> .....	<b>57</b>
<b>4. CONCLUSÕES</b> .....	<b>60</b>
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>63</b>

<b>RESUMO .....</b>	<b>64</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>65</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>66</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>67</b>
<b>2.1. Bioensaios com fungos entomopatogênicos .....</b>	<b>67</b>
<b>2.1.1. Origem e obtenção dos isolados .....</b>	<b>67</b>
<b>2.1.2. Seleção dos isolados.....</b>	<b>68</b>
<b>2.2. Multiplicação dos isolados .....</b>	<b>72</b>
<b>2.3. Concentração letal média (CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>) e tempo letal médio (TL<sub>50</sub> e TL<sub>90</sub>) .....</b>	<b>72</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>73</b>
<b>3.1. Seleção de isolados de fungos entomopatogênicos à broca-do-café .....</b>	<b>73</b>
<b>3.2. Ensaio de concentração e tempo letal de fungos entomopatogênicos à broca-do-café .....</b>	<b>76</b>
<b>4. CONCLUSÕES .....</b>	<b>80</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1. Cultura do cafeeiro: origem, aspectos econômicos, manejo e problemas fitossanitários

A espécie *Coffea arabica* L. é originária de áreas tropicais da Etiópia e Sudão, localizadas entre 6° e 9° Norte de latitude, em altitudes que variam entre 1.600 e 2.000 m. A temperatura média anual nestas regiões é em torno de 18 a 20°C (mínima de 4 a 5°C, e máxima de 30 a 31°C), com precipitação anual de 1.500 a 1.800 mm. A estação chuvosa é concentrada no verão, de março a outubro, com ocorrência de inverno seco de novembro a fevereiro (CAMARGO; PEREIRA, 1994).

O ciclo fenológico do cafeeiro (Rubiaceae) é dividido em seis fases, e dura dois anos consecutivos. No primeiro ano fenológico, tem-se o período vegetativo. Este é formado por duas fases: fase inicial de vegetação e formação de gemas florais (inicia em setembro e termina em março), e fase de indução e maturação das gemas florais (inicia em abril e termina em agosto). No segundo ano fenológico, tem-se o período reprodutivo iniciado pelo estágio da florada. Após a queda das flores, um período de aparente dormência, mas com intensa atividade celular, denominada chumbinho, tem duração de seis a oito semanas. O estágio de expansão dos frutos, caracterizado por rápido aumento em volume e massa seca, com alta demanda hídrica, formará o tamanho da semente e tem duração até a 16<sup>a</sup> ou 17<sup>a</sup> semanas após a florada. Aproximadamente, 200 dias após o florescimento, ou em torno da 32<sup>a</sup> semana, inicia-se o processo de maturação dos frutos, primeiramente, tornando-se verde amarelo (verde cana) e atingindo a maturidade fisiológica ou estágio cereja, em torno de 240 dias depois do florescimento (CAMARGO; CAMARGO, 2001).

*Coffea arabica* representa 79,25% do total de café produzido no Brasil, e o Estado de Minas Gerais tem a maior contribuição, com 69,56% desse total, são cerca de 1.334,3 mil hectares entre áreas em produção e áreas em formação, registrou um aumento de 2,8% em relação à safra 2021, sendo responsável por aproximadamente 60% de toda a área cultivada no país (CONAB, 2022). Dessa forma, a cafeicultura para o estado mineiro exerce um papel importante, tanto do ponto de vista econômico quanto social. No entanto, apesar do Brasil ser o maior produtor mundial de café, a produtividade dessa cultura é baixa, considerando o seu potencial. As principais causas dessa baixa produtividade são: lavouras antigas e depauperadas, deficiências nutricionais, bienalidade de produção, estresses abiótico e biótico e manejo inadequado da cultura (CAIXETA; GUIMARÃES; ROMANIELLO, 2008).

Em Minas Gerais, a temperatura média de 18°C a 23°C, altitude de 800 a 1.300 metros, índice pluviométrico médio de 1600 milímetros por ano e baixa umidade relativa do ar durante a época de colheita são características somadas ao relevo do cerrado mineiro que contribuem com a cafeicultura dessa região que é constituída por 55 municípios no oeste do estado (PEROSA, 2017). Os cafezais mineiros conquistaram regiões, tais como: o Triângulo Mineiro, Alto Paranaíba e Alto Jequitinhonha regiões essas de solos sob Cerrado, com relevo menos acidentado, que exigem (ou permitem) o emprego de tecnologias apropriadas, especialmente, no que diz respeito à mecanização. O sucesso do agronegócio do café está condicionado à utilização racional dos diversos fatores de produção, dentre ao quais se encontra o controle das plantas daninhas, que deve ser considerado não só visando obter índices de produtividade que remunerem o cafeicultor, mas também objetivando preservar o solo, e prolongar a vida útil dos cafeeiros (ALCÂNTARA; FERREIRA, 2000).

A produção de café envolve cerca de 1.700 municípios, abrangendo, aproximadamente, 300 mil unidades produtivas. A atividade gera sete milhões de empregos relacionados diretamente e indiretamente com a produção do café, favorecendo e promovendo a fixação do homem no campo. O café é um dos poucos produtos agrícolas no Brasil, que tem seu preço associado a parâmetros qualitativos. Com isso, para que seja remunerado adequadamente, deve-se fornecer um produto de qualidade. A influência de fatores como a composição química dos grãos (determinada por fatores genéticos, ambientais e culturais), os métodos de colheita, processamento e armazenamento, são importantes, pois afetam diretamente a qualidade da bebida (SOUZA, 1996; LOPES *et al.*, 2000).

Apesar da qualidade de bebida que o sistema de sombreamento propicia, no Brasil, a grande maioria de cafeicultores não opta pelo cultivo sombreado porque esse sistema pode ocasionar perda de produtividade, além de que esse cultivo demanda mais mão-de-obra e dificulta a passagem de máquinas. Somando-se a isso, a alta produtividade está relacionada não só com a exposição ao sol, mas também ao uso intensivo de insumos, conduzidas em monocultivo, de composição homogênea. Estima-se que, mais de 90% das lavouras existentes são expostas diretamente ao sol (RICCI; ARAÚJO; FRANCH, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2018). Aliado a isso, apesar de, originalmente, ser uma planta de sub-bosque, o cafeeiro vem sendo melhorado por décadas, resultando em plantas mais produtivas quando desenvolvidas sob o sol (café solteiro) e, por isso, esta é a principal modalidade de cultivo no país (DAMATTA *et al.*, 2007).

É válido ressaltar que esse tipo de exploração proporcionou a seleção de cultivares resistentes a essa modalidade, que apresenta maior produtividade desde que atendido os requisitos nutricionais da planta. No entanto, esse sistema pode apresentar problemas como a baixa produtividade, devido ao alto custo de produção, e em função de condições climáticas extremas, como ocorrência de geadas e secas prolongadas (PEZZOPANE; PEDRO JR; GALLO, 2007). Além dessas dificuldades ocasionadas pelos fatores abióticos, os cafeicultores enfrentam diversos problemas ocasionados por pragas e doenças.

Alguns problemas fitossanitários que acometem o cafeeiro exigem maior atenção em seu controle, considerando a frequência com que ocorrem, as áreas de incidência e as injúrias causados às plantas. Para conseguir alcançar o máximo rendimento da cultura, o cafeicultor, além de cuidar de fatores importantes da produção, como manejo correto do solo e da nutrição, precisa dar atenção ao controle de pragas que podem provocar perdas significativas da produção, se não forem devidamente controladas. Dentre os principais problemas fitossanitários do cafeeiro, destacam-se e os insetos *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) (broca-do-café) e *Leucoptera coffeella* (Guérin-Ménéville) (Lepidoptera: Lyonetiidae) (bicho-mineiro) além dos fungos *Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke (cercospora), *Hemileia vastatrix* Berk and Broome (ferrugem), (PATRÍCIO, 2013; MOLINA *et al.* 2022; DE JESUS *et al.*, 2022, RAMOS *et al.*, 2022, RODRIGUES *et al.*, 2022).

A broca-do-café contribui direta e indiretamente com a baixa rentabilidade da cultura, já que pode reduzir a quantidade de frutos colhidos em mais 50%, além de diminuir qualidade física e organoléptica dos grãos e a segurança da bebida devido à possível presença de micotoxinas (CAMILO; OLIVARES; HERNÁNDEZ, 2003). Em função das injúrias e danos provocados por *H. hampei* em frutos de café, torna-se necessário o entendimento dos aspectos biológicos e ecológicos da praga, bem como sua interação com a planta hospedeira, no sentido de traçar estratégias de manejo.

## **1.2. Broca-do-café *Hypothenemus hampei***

A broca-do-café é um inseto-praga de origem africana e foi mencionada pela primeira vez no Brasil em Campinas, São Paulo, em 1913. As tentativas de conter o avanço dessa praga para novas áreas fracassaram e hoje encontra-se presente em todas as regiões de cultivo do país. Embora a broca ataque todas as espécies de café, *Coffea canephora* Pierre Ex Froehner é mais suscetível que *C. arabica*, já que possui menor umidade nos grãos, maior



desuniformidade de maturação dos frutos, além do cultivo em regiões de baixas altitudes e temperaturas mais altas. Tais características favorecem o maior número de gerações da broca-do-café durante a safra (BENASSI, 2000a). A broca-do-café é um inseto holometábolo, de ciclo de vida curto de aproximadamente 30 dias e grande capacidade reprodutiva em condições climáticas favoráveis.

Em condições de laboratório, a espécie *H. hampei* se desenvolve entre 18 a 32°C, sendo o intervalo de 22 a 28°C mais adequado para o ciclo evolutivo desse inseto. Conforme Benassi (2000a), a duração do período de ovo a adulto foi de 23 a 24 dias, quando os insetos foram criados em laboratório em frutos de café *C. canephora*. A média de descendentes foi de 22,5 indivíduos por fêmea 28 dias após a infestação e a razão sexual de um macho para cada nove fêmeas. A perfuração, construção da galeria e início da postura ocorreu quatro dias após a infestação. As larvas foram observadas a partir do 12º dia, as pupas do 25º dia e a emergência dos adultos iniciou após o 29º dia (JARAMILLO, 2016).

No primeiro ínstar as larvas têm, em média, 1,3 mm de comprimento e 0,4 mm de largura. A larva é branca e sua cabeça é marrom e, à medida que cresce, a cor da cápsula cefálica torna-se mais hialina, indicando a proximidade da muda. A largura da cápsula cefálica de brocas criadas em dieta é 0,26 mm. A duração média para eclosão varia de 7 a 8,9 dias, de acordo com a dieta utilizada. O segundo ínstar possui maior índice de atividade e o tamanho médio de 1,70 mm de comprimento e 0,58 mm de largura. Os segmentos torácicos ficam mais espessos e as larvas perdem mobilidade para entrar na pré-pupa. O tempo médio para alcançar o segundo ínstar foi 5,1 a 6,7 dias, dependendo da dieta. No final do segundo ínstar, a muda ocorre com a largura da cápsula cefálica variando de 0,27 a 0,31 mm e 0,27 mm, dependendo da dieta (RUIZ, 1996).

À medida que o desenvolvimento da larva avança, sua coloração passa de branca para vários tons de amarelo até adquirir cor caramelo. O tamanho da pupa é de 1,86 mm de comprimento e 0,67 mm de largura. Este tamanho é preservado até a diferenciação em adulto. A primeira diferenciação da broca ocorre ao nível das asas membranosas. Inicialmente, possuem coloração parda e de depois tornam-se pretas, após três dias de seu desenvolvimento. A duração média desse estágio de pupa a adulto foi de 6,7 a 4,8 dias de acordo com a dieta. A duração média total do ovo ao adulto na dieta A foi de 23,3 dias e na dieta B de 24,1 dias. A dieta A de Villacorta e Barrera (1993) com levedo de torula e sem adição de Vitaminas e a dieta B com alterações feita pelo autor com germen de trigo no lugar do levedo e adição de Vitaminas e substituição ou adição de conservantes (RUIZ, 1996).

Fatores abióticos como temperatura e umidade relativa do ar influenciam tanto no desenvolvimento dos frutos do cafeeiro, quanto na dinâmica populacional da broca. Portanto, o amadurecimento dos frutos de café e a duração do ciclo de vida da broca dependerão diretamente das condições ambientais (CAMILO; OLIVARES; HERNÁNDEZ, 2003). O número de frutos de café em uma lavoura não é um recurso limitante, e essa abundância de alimento explica o baixo índice de infestações múltiplas dentro do mesmo fruto. No entanto, se o recurso limitante para uma fêmea e sua progênie é a semente dentro do fruto, é vantajoso para uma fêmea (para aumentar a sobrevivência de sua prole) ser a única fêmea colonizadora desse fruto (VEGA; KRAMER; JARAMILLO, 2011).

Na mesma planta de café a broca ataca indistintamente tanto os frutos maduros e em maturação, quanto os verdes, desde que haja teor de matéria seca que propicie a oviposição. Na fase de maturação dos frutos, a dispersão da broca-do-café ocorre em curta distância, preferencialmente para frutos próximos da mesma roseta ou rosetas vizinhas no mesmo ramo. A presença de ovos até o final do período avaliado, de julho a novembro, indica que, pelo menos, algumas fêmeas não entram em diapausa reprodutiva na entressafra (FANTON, 2001).

Nos frutos de quatro a cinco meses de idade, a broca abre galerias atingindo o pergaminho (endocarpo) para se alimentar e posteriormente, quando a semente endurece, alarga a galeria para ovipositar, na chamada câmara de postura. Já nos frutos secos, as fêmeas perfuram qualquer ponto, formando galerias na semente para oviposição (LAURENTINO; COSTA, 2004). As larvas empupam dentro da semente e após o surgimento dos adultos há o acasalamento entre os irmãos dentro da semente, na proporção de 10 fêmeas para cada macho (VEGA; KRAMER; JARAMILLO, 2011). Nos frutos remanescentes nas plantas de café e nos frutos caídos no solo, após a colheita, observa-se o acúmulo de adultos da broca-do-café e redução progressiva dos demais estágios da praga. Sendo assim, há diminuição do número de posturas devido à mudança na qualidade e disponibilidade do alimento, dentre outros fatores (FANTON, 2001).

### **1.3. Injúrias, danos e controle**

As fêmeas acasaladas de *H. hampei* deixam os frutos de café remanescentes na planta ou no chão na entressafra para colonizar os frutos da nova safra. As posturas são realizadas em frutos verdes, com as sementes já formadas e umidade adequada. Também,

ocorrem posturas em frutos maduros e nos secos. As fêmeas chegam a perfurar frutos verdes mais aquosos, no entanto, abandonam esses frutos por falta de condição para ovipositar e deixando-os comprometidos (LAURENTINO; COSTA, 2004).

A broca-do-café é considerada de difícil controle, já que passa todo o ciclo de vida dentro da semente. Os ovos são colocados dentro do endosperma da semente e somente quando a fêmea adulta deixa o grão, normalmente no final do período da entressafra, para encontrar e colonizar outro grão, é que o inseto pode ser exposto ao controle químico de contato. No entanto, os inseticidas químicos que agem por contato tendem a não penetrar no corpo da broca. Os produtos que agem por ingestão, que poderiam ser aplicados apenas quando as fêmeas estão perfurando os grãos, no início da temporada, não são eficientes, já que a fêmea se recusa comer o exocarpo removido durante a perfuração (DAMON, 2000).

O ataque da broca aos frutos de café impacta diretamente na qualidade dos grãos, fazendo com que a classificação seja prejudicada já que há redução no peso das sementes danificadas pela larva do inseto e perda de qualidade dos grãos brocados (aspecto, o tipo e a bebida), isso interfere no preço do produto e conseqüentemente na renda do produtor (MARCOMINI, 2015). De acordo com Wegbe *et al.* (2003) as perdas de peso de café beneficiado são proporcionais ao nível de infestação da broca-do-café, em dois anos de avaliação sendo os níveis de infestação 5,64% no primeiro ano e 6,36% no segundo ano causaram perdas de produtividade de 2,60 e 3,18%, respectivamente.

Um importante ponto a ser estudado é o comportamento reprodutivo da broca-do-café no período da entressafra, já que o tamanho dessa população trará dados de infestação e perdas na produtividade na safra seguinte (FANTON, 2001). Costa *et al.* (2000) avaliaram os níveis de infestação da broca-do-café em lavouras sem aplicação de inseticidas químicos em três municípios dos estados de Rondônia. De acordo com esses autores, a partir do mês de março as infestações atingiram o nível de controle e em maio, período de colheita, os níveis de infestação foram maiores que 30% nos três municípios, o que compromete a produtividade e qualidade do café.

A adoção de maior espaçamento entre as plantas de café e o uso e registro do inseticida químico endosulfam 350 CE a partir de 1970 tornou o controle da broca mais eficiente. No entanto, a alta toxicidade desse produto fitossanitário de classe toxicológica I, impediu seu uso na cafeicultura brasileira a partir de julho 2013 devido ao risco de intoxicação na mão-de-obra envolvida. Dessa forma, o controle cultural com colheita bem-feita com repasse e varredura se tornou ainda mais importante e tem reduzido os níveis de

infestação da broca-do-café (SOUZA *et al.*, 2013). O controle de *H. hampei* nos frutos remanescentes no solo ainda é um grande desafio, sendo que duas alternativas podem ser estudadas para essa finalidade, que é a utilização da irrigação para estimular a putrefação desses frutos e a liberação de nematoides patogênicos à broca-do-café (FANTON, 2001).

O monitoramento para verificação do nível de infestação da broca-do-café nas lavouras de café é fundamental para o controle dessa praga. O monitoramento deve acontecer no momento de trânsito do inseto que varia entre os meses de outubro a fevereiro e as aplicações de inseticida devem acontecer quando o nível de controle de 3% de infestação for atingido (EPAMIG, 2016). Armadilhas feitas de garrafas Pet pintadas de vermelho contendo compostos voláteis alcoólicos atrativos são utilizadas para monitoramento do nível de dano econômico dessa praga para adoção de tratamento químico (FERNANDES *et al.*, 2011) além disso, podem reduzir o número de frutos brocados (FERNANDES *et al.*, 2014).

Atualmente existem 30 inseticidas químicos registrados no Brasil para controle de *H. hampei*, distribuídos entre os ingredientes ativos (grupos químicos): abamectina (avermectina) + clorantniliprole (antranilamida), acetamiprido (neonicotinóide) + bifentrina (piretróide), acetamiprido (neonicotinóide) + fenpropatrina (piretróide), azadiractina (tetranortriterpenóide), ciantraniliprole (antranilamida), clorpirifós (organofosforado), espinosade (espinosinas), etofenproxi (éter difenílico), etiprole (fenilpirazol), indoxacarbe (oxadiazina) + novalurom (benzoiluréia) e metaflumizone (semicarbazone) (AGROFIT, 2022).

A aplicação frequente de inseticidas químicos pode acarretar contaminação ambiental, residual em frutos e no solo, além de prejudicar a população da fauna benéfica, contribuir para o surgimento de novas pragas e selecionar populações resistentes. Dessa forma, o uso de extratos vegetais é um método promissor para o controle pragas, já que reduz o impacto econômico e ecológico produzido pelo o uso de inseticidas químicos, tendo-se em vista a existência de vasta flora com propriedades inseticidas a serem exploradas (GIRALDO, 2009; CELESTINO, 2014).

De acordo com o trabalho de Celestino *et al.* (2016) o óleo de mamona na concentração de 3,0% (v/v) causou 53,7% de mortalidade da broca-do-café, provavelmente devido ao bloqueio dos espiráculos, impedindo a respiração do inseto. Conforme os experimentos de Celestino *et al.* (2018), isolados de *B. bassiana* germinaram em todas as concentrações avaliadas de óleo de mamona, 0,5 a 3,0% (v/v) em teste *in vitro*. Já em teste *in vivo*, a mortalidade confirmada da broca-do-café diminuiu de acordo com o aumento da

concentração do óleo de mamona, dessa forma, o manejo dessa praga pode ser realizado utilizando-se o óleo de mamona associado ao fungo *B. bassiana*, desde que se observe a viabilidade econômica e a compatibilidade de ambos (CELESTINO *et al.*, 2020).

O conhecimento da variação do clima natural e dos impactos das mudanças climáticas sobre insetos-pragas e insetos benéficos é de suma importância tanto para a prevenção de problemas fitossanitários, quanto para o desenvolvimento de estratégias de adaptação às mudanças esperadas. É importante que se faça o controle da broca-do-café durante o trânsito das fêmeas adultas para colonização de novos grãos que vai de 80 a 90 dias após a primeira grande florada, pois, uma vez que a broca-do-café atinge o endosperma só é possível realizar o controle por meio da colheita de todos os cafés ou da liberação de parasitoides que podem entrar e parasitar as brocas dentro do fruto (EPAMIG, 2016; PARDEY, 2006).

A liberação de mais de uma espécie de parasitoide da broca-do-café, produzidos massalmente, no mesmo local para controle biológico dessa praga, vem sendo estudada e esse controle pode ser eficiente desde que haja produção constante desses agentes entomófagos. Os ectoparasitoides *Cephalonomia stephanoderis* Betrem (Hymenoptera: Bethyilidae) e *Prorops nasuta* (Waterston) (Hymenoptera: Bethyilidae) se alimentam de larvas em instares iniciais e ovipositam em larvas maduras e pupas jovens (RINCÓN, 2001). Conformes os estudos de Botti *et al.* (2022) larvas do crisopídeo *Chrysoperla externa* (Hagen) podem se alimentar de ovos e larvas da broca. A larva do crisopídeo remove a larva da broca de dentro do fruto de café, além disso, as larvas maiores podem preda os adultos da broca-do-café.

A broca-do-café permanece alojada na coroa dos frutos de café por cerca de seis dias, aguardando maturação para perfurar os grãos até a semente e ovipositar. Esse período deve ser verificado em cada região para realização de manejo, já que é um momento de exposição do inseto a produtos químicos e biológicos e a parasitoides como *Phymastichus coffea* LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae), *C. stephanoderis*, *Cephalonomia hyalinipennis* Ashmead (Hymenoptera: Bethyilidae), *Phymastichus coffea* La Salle (Hymenoptera: Eulophidae) e *Heterospilus coffeicola* Schmiedeknecht (Hymenoptera: Braconidae). Dessa forma, a liberação das vespas parasitoides, quando comercializadas, pode ser uma importante ferramenta de controle de *H. hampei* após a colheita dos frutos, para que esses parasitoides ataquem a broca-do-café e seus estágios imaturos nos frutos remanescentes nas plantas, reduzindo a população infestante da safra seguinte (FANTON, 2001; BENASSI 2007; PÉREZ-LACHAUD; HARDY, 1999; RODRIGUÉZ *et al.*, 2017).

Ainda sobre o controle da broca-do-café é importante mencionar os fungos entomopatogênicos, Camilo, Olivares e Hernández (2003) observaram que em 4,5% do total dos frutos de café brocados, os insetos se encontravam naturalmente infestados por fungos, principalmente por *B. bassiana*, ainda antes de causar danos às sementes. Rincón (2001) verificou que quando o número de brocas-do-café colonizadas por *B. bassiana* foi maior, houve diminuição no número de brocas-do-café parasitadas por *P. coffea* e essa constatação pode ser devida a competição entre esses agentes de controle por adultos da praga.

#### **1.4. Controle microbiano de pragas**

O uso de produtos fitossanitários químicos para o controle de pragas pode causar modificações no ambiente, como seleção de populações de pragas-alvo resistentes, o surto de pragas secundárias, a diminuição dos inimigos naturais (predadores, parasitoides e patógenos) que são benéficos, além de deixar resíduos tóxicos no ambiente, contaminando solo, água e alimentos. Esses efeitos têm estimulado o emprego de métodos naturais menos agressivos ao meio ambiente e as espécies nele presentes. Sendo assim para incentivar o manejo sustentável na agricultura do Brasil é relevante que os produtores realizem práticas agroecológicas em conjunto do Manejo Integrado de Pragas para contribuir com a qualidade do meio ambiente e obtenção alimentos mais saudáveis (JUNIOR; SANTOS; AUER, 2000; PARRA, 2019; BOTELHO *et al.*, 2020).

Além disso, tem se tornado crescente a procura da sociedade por alimentos mais saudáveis. Sendo assim, torna-se necessário a compreensão dos agricultores quanto aos problemas ocasionados pelo uso excessivo de defensivos químicos e a implementação do controle biológico no manejo de pragas e doenças. Dessa forma, a tendência é aumentar a demanda por produtos orgânicos e de cultivo protegido e a validação de leis que restrinjam o uso exacerbado de produtos químicos, A utilização dos bioformulados deve ser valorizada devido seu potencial de eficiência e importância em diversas culturas de importância econômica, além de contribuir com a preservação ambiental, é importante mencionar que o controle biológico no Brasil vem aumentando (MACHADO, 2012; PARRA, 2019).

O uso de fungos entomopatogênicos e bioacaricidas é uma alternativa aos riscos de intoxicação de produtores e consumidores e aos desequilíbrios ecológicos que podem ser causados pelos defensivos químicos (OLIVEIRA; ALVES; NEVES, 2002). Dessa forma, o controle biológico é um método para reduzir a utilização de inseticidas químicos, podendo

tanto ser utilizadas estratégias que favoreçam o controle biológico natural quanto ser realizada a inserção de agentes de biocontrole (controle biológico aplicado) (MORANDI; BETTIOL, 2009; POMELLA; RIBEIRO, 2009).

A utilização de fungos entomopatogênicos é uma alternativa viável, devido à facilidade na produção, aplicação e eficácia (PORTELA; BARRETO, 2020; ROCHA, 2021). Os fungos podem ser aplicados isoladamente ou integrados com outros métodos, como os inseticidas naturais de origem vegetal, feromônios, variedades de plantas resistentes a insetos (LOURENÇÃO *et al.*, 1993), além de químicos, desde que haja compatibilidade. Portanto, esses organismos exercem a função de controlar insetos em ambientes naturais e em ecossistemas agrícolas, ocupando lugar relevante na manutenção do equilíbrio ecológico (ALVES *et al.*, 1998). O uso de fungos entomopatogênicos no controle biológico de insetos-praga no Brasil é feito, principalmente, com espécies de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Hypocreales: Cordycipitaceae, Clavicipitaceae) e *Beauveria bassiana* Bals. Vuill. (Hypocreales: Cordycipitaceae), outras espécies registradas são *Cordyceps fumosorosea* Wize (Hypocreales: Cordycipitaceae) (= *Isaria fumosorosea*, *Paecilomyces fumosoroseus*) e *C. javanica* (Friedrichs & Bally) Samson & Hywel-Jones (Hypocreales: Cordycipitaceae) (*Isaria javanica*) (NUNES *et al.*, 2002; AGROFIT, 2022). Estas espécies são utilizadas devido à ampla distribuição geográfica, variedade de hospedeiros e ocorrências de ambas em condições naturais, enzoóticas ou epizoóticas, bem como, à alta virulência contra uma gama ampla de insetos hospedeiros (CRUZ, 1995).

De acordo com Alves e Faria (2003), os primeiros testes com fungos entomopatogênicos foram realizados pelo russo Metschnikoff no final do século XIX, quando avaliou o potencial de *M. anisopliae* para controle de uma espécie de besouro. Um século depois os primeiros resultados práticos começaram a surgir, havendo atualmente vários inseticidas biológicos a base de fungos (micoinseticidas) em comercialização em diferentes países. No Brasil, os estudos começaram em 1923, quando foram identificadas duas espécies de cigarrinhas infectadas pelo fungo *M. anisopliae*. Esse fungo foi utilizado para combater a cigarrinha *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae), no primeiro trabalho de pulverização realizado no país. Somando-se a isso, no Brasil, a produção massal de fungos entomopatogênicos é tradicionalmente realizada para se constituir no ingrediente ativo dos micoinseticidas (FARIA; MAGALHÃES, 2001).

O controle integrado, com a utilização de produtos fitossanitários seletivos em conjunto com fungos entomopatogênicos ou outros agentes de controle biológico, pode ser

uma estratégia segura e eficiente. Contudo, é válido ressaltar que alguns produtos fitossanitários podem afetar o crescimento vegetativo, a viabilidade e a conidiogênese dos fungos entomopatogênicos, ou alterar sua composição genética. Dessa forma, previamente ao uso deve tomar-se conhecimento da compatibilidade entre os produtos químicos e os produtos biológicos (ALVES *et al.*, 1998; PESSOA; SOUZA; LOUREIRO, 2020).

Dentre os fungos entomopatogênicos comumente utilizados no controle de pragas que foram utilizados no presente trabalho para controle da broca-do-café em laboratório, estão *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *C. fumosorosea*, outra espécie testada é do gênero *Fusarium*.

### **1.5. Fungos entomopatogênicos: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Cordyceps fumosorosea* e *Fusarium* spp.**

Os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* são os entomopatógenos mais estudados e utilizados no controle microbiano de pragas devido sua especificidade, seletividade, compatibilidade com outros métodos e segurança ambiental (ALMEIDA; ROCHA; BATISTA FILHO, 2007). Os gêneros *Beauveria*, *Cordyceps* e *Metarhizium* são reconhecidamente entomopatogênicos pela sua capacidade de infectar ampla variedade de insetos (JACCOUD; HUGHES; JACKSON, 1999). Atualmente existem bioprodutos desenvolvidos com isolados destes três agentes de controle biológico para controle de diversas pragas (AGROFIT, 2022).

A espécie *B. bassiana* é um fungo disperso pelo ar por produzir conídios pequenos, leves e secos e as consequências da produção, manipulação e exposição do ser humano a certa concentração de conídios requer análises aprofundadas. As linhagens de fungos selecionadas para controle biológico não são infectantes para os mamíferos. Todavia, existem relatos de infecções causadas por esta espécie, especialmente, em pessoas imunocomprometidas. Neste contexto, apesar de ser eficaz no controle biológico de insetos, ressalta-se que para cada nova formulação de bioinseticida, com a seleção de uma linhagem eficiente para uma determinada praga, devem ser conduzidos estudos com objetivo de evitar problemas de saúde aos seres humanos ou desequilíbrios nos ecossistemas, evitando que o microrganismo possa afetar insetos benéficos (GÜRCAN *et al.*, 2006).

O fungo entomopatogênico *B. bassiana* está entre os biocontroladores com maior potencial de uso em culturas hortícolas no Brasil (TAMAI *et al.*, 2002). Em presença de umidade, *B. bassiana* emerge do corpo do inseto colonizado e produz uma camada de



conídios na superfície dos cadáveres hospedeiros causando muscardine branca (FENG; POPRAWSKI; KHACHATOURIANS, 1994). Alves *et al.* (2005) registraram a ocorrência natural de *B. bassiana* sobre larvas e adultos do cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) e comprovaram sua ação patogênica e elevada virulência sobre o besouro. No Brasil, *B. bassiana* é comercializada para controle de 13 organismos-alvo e ainda existem 14 produtos que associam *B. bassiana* e *M. anisopliae* (Tabela 1) (AGROFIT, 2022).

**Tabela 1.** Insetos-praga listados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento como organismos-alvo de produtos biológicos registrados a base de conídios de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* no Brasil.

Fungo	Inseto-praga	
	Nome científico	Nome comum
<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Bemisia tabaci</i> (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae)	mosca-branca
	<i>Coccus viridis</i> Green) (Hemiptera: Coccidae)	cochonilha-verde
	<i>Cosmopolites sordidus</i> (Germar) (Coleoptera: Cuculionidae)	moleque-da-bananeira
	<i>Dalbulus maidis</i> (DeLong e Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae)	cigarrinha-do-milho
	<i>Diabrotica speciosa</i> (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae)	vaquinha- verde-amarela
	<i>Diaphorina citri</i> Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae)	psilídeo
	<i>Euschistus heros</i> (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae)	percevejo-marrom
	<i>Gonipterus scutellatus</i> Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae)	gorgulho-do-eucalipto
	<i>Hedypathes betulinus</i> (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae)	broca-da-erva-mate
	<i>Hypothenemus hampei</i> (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae)	broca-do-café
	<i>Sphenophorus levis</i> Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae)	bicudo-da-cana-de-açúcar
	<i>Tetranychus urticae</i> Koch (Acari: Tetranychidae)	ácaro-rajado
	<i>Thrips tabaci</i> Lindeman (Thysanoptera: Thripidae)	tripes-do-fumo
<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Aphis gossypii</i> Glover (Hemiptera: Aphididae)	pulgão-do-algodoeiro
	<i>Chrysodeixis includens</i> (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae)	falsa-medideira
	<i>Deois flavopicta</i> Stal, 1854) (Homoptera: Cercopidae)	cigarrinha-das-pastagens
	<i>Euschistos heros</i>	percevejo-marrom
	<i>Frankliniella occidentalis</i> Pergande (Thysanoptera: Thripidae)	tripes

	<i>Mahanarva fimbriolata</i> (Stal) (Hemiptera: Cercopidae)	cigarrinha-da-raiz
(Continua)		
	<i>Mahanarva posticata</i> (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae)	cigarrinha-das-folhas
	<i>Scaptocoris castânea</i> Perty, 1830 (Hemiptera: Cydnidae)	percevejo-castanho
<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Spodoptera eridania</i> (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae)	lagarta-das-vagens
	<i>Spodoptera frugiperda</i> (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)	lagarta-militar
	<i>Tetranychus urticae</i>	ácaro-rajado
	<i>Tuta absoluta</i> (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)	traça-do-tomateiro
	<i>Zulia entreriana</i> (Berg) (Hemiptera: Cercopidae)	cigarrinha-das-pastagens
	<i>Bemisia tabaci</i>	mosca-branca
	<i>Deois flavopicta</i>	cigarrinha-das-pastagens
<i>B. bassiana</i>	<i>Euschistus heros</i>	percevejo-marrom
+	<i>Frankliniella occidentalis</i>	tripes
<i>M. anisopliae</i>	<i>Hypothenemus hampei</i>	broca-do-café
	<i>Sphenophorus levis</i>	bicudo-da-cana-de-açúcar
	<i>Tetranychus urticae</i>	ácaro-rajado

Fonte: Agrofit (2022).

Já a espécie *M. anisopliae* pertencente à família Clavicipitaceae, coloniza ampla gama de insetos e é amplamente encontrado na natureza em insetos doentes, causando a muscardine verde. No Brasil, após 1964, com aplicação em massa de *M. anisopliae* para controle de cigarrinha da cana-de-açúcar *M. posticata*, o uso de entomopatógenos intensificou-se (ALMEIDA; BATISTA FILHO; LEITE, 2017). Esse fungo entomopatogênico é um deuteromiceto amplamente distribuído na natureza. É encontrado facilmente nos solos, onde sobrevive por longos períodos. Considerado patogênico para um número considerável de artrópodes. Foi o primeiro microrganismo a ser reconhecido devido a sua importância no controle de pestes presentes na agricultura (FRAZZON *et al.*, 2000). Uma das vantagens desse fungo é a facilidade de produção e aplicação, baixo custo e redução do impacto ambiental (ORLANDELLI; PAMPHILE, 2011). No Brasil é comercializado para controle de 13 insetos-praga (Tabela 1) (AGROFIT, 2022).

Conforme Alves (1998), os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* possuem potencial de controle da broca-da-cana, *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae). O autor realizou experimento em condições de campo e após aplicações de  $10^{13}$  conídios  $ha^{-1}$

constatou a infecção de 58% de lagartas de *D. saccharalis* por *M. anisopliae* e 44% por *B. bassiana*. Esses entomopatógenos causam patogenicidade em todos os estágios de desenvolvimento da broca-da-cana além de serem eficientes para ovos de até dois dias (OLIVEIRA, 2009).

Grande parte das pesquisas conduzidas para controle da broca-do-café é concentrada nos gêneros *Metarhizium* e *Beauveria* devido a facilidade e baixo valor econômico de produção massal dos conídios para aplicações em campo. No entanto, a produção convencional de fungos entomopatogênicos pode prejudicar a patogenicidade desses fungos aos organismos-alvo, já que os conídios podem ser prejudicados pelos fatores físicos de extração e ambientais de armazenamento e transporte (PAVA-RIPOLL, 2008) Dessa forma, é necessário a busca por isolados mais virulentos e resistentes as condições de produção e formulações que ajudem na proteção dos conídios.

De La Rosa *et al.* (2000) avaliaram o efeito de três isolados de *B. bassiana* e dois de *M. anisopliae* no controle de broca-do-café em campo em três fazendas de café em diferentes altitudes, no México, sendo os isolados de *B. bassiana* os mais virulentos à praga. Conforme os autores, esses fungos devem ser incorporados ao manejo integrado de *H. hampei*. Bustillo *et al.* (1999) analisaram o efeito de pulverizações no solo desses entomopatógenos sobre os adultos da broca-do-café emergindo de frutos caídos ao longo do tempo. Os resultados mostraram que os níveis de infecção de ambos os fungos em brocas-do-café foram mais altos durante os primeiros cinco dias após a aplicação, chegando a quase 30% para *B. bassiana* e 11% para *M. anisopliae*.

*Cordyceps fumosorosea* é outra espécie de fungo entomopatogênico que cresce rapidamente e colonizam com micélios de cor branca que quando mais maduro pode se tornar de cor rosa ou púrpura. Suas fiálides tem forma de balão e seus conídios são cilíndricos a fusiforme. O crescimento e patogenicidade das espécies são influenciadas por vários fatores bióticos e abióticos. Dentre os fatores abióticos que mais ocasionam problemas se destacam a temperatura, umidade relativa e radiação ultravioleta (ZIMMERMAN, 2008). O fungo *C. fumosorosea* é comumente encontrado no solo e facilmente cultivado *in vitro* (JAMES; BUCKNER; FREEMAN, 2003). Infecta mais de 40 espécies de insetos, e produz blastósporos em meio líquido e conídios em meio sólido (VEGA; JACKSON; MCGUIRE, 1999). É isolado a partir de uma diversidade de insetos em todo o mundo.

Por causa da sua capacidade de promover epizootias em diferentes regiões do mundo, *C. fumosorosea* vem sendo estudado como agente biocontrolador, já sendo produzido

para controlar mosca-branca, *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Hemiptera: Aleyrodidae) (JACKSON; PAYNE; ODELSON, 2004) e estudada para controle do psilídeo cítrico asiático, *D. citri* em laboratório e em campo (HOY; SINGH; ROGERS, 2010). Samsudin *et al.* (2020) relataram a patogenicidade de blastósporos de *C. fumosorosea* à broca-do-café em laboratório. Atualmente existem bioprodutos a base deste fungo para controle de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), *D. citri*, *D. maidis* e *B. tabaci* (AGROFIT, 2022).

O gênero *Fusarium* é pouco relatado para controle de insetos, alguns estudos demonstram o potencial entomopatogênico de algumas espécies. Abrar *et al.* (2021) verificaram que os isolados *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc., 1886 (Hypocreles: Nectriaceae) e *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg (Hypocreles: Nectriaceae) apresentaram atividade larvicida em *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). Os isolados *F. proliferatum*, *F. equiseti* e *Fusarium tricinctum* (Corda) Sacc. (Hypocreles: Nectriaceae) causam patogenicidade ao percevejo bronzeado *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero e Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) (VELOZO, 2015).

A muda frequente de alguns insetos, como os pulgões, exige uma germinação de esporos mais rápida do que o normal. Os blastósporos são propágulos fúngicos vegetativos e hidrofílicos, que são o modo preferido de crescimento para muitos fungos entomopatogênicos dentro da hemocele de insetos infectados (PENDLAND, BOUCIAS, 1997; HUMBER, 2008). O crescimento dos blastósporos semelhante ao leveduriforme, permite ao fungo melhor acesso aos nutrientes dentro do inseto e é considerado fator de virulência já que essas estruturas podem possuir a capacidade de enganar o sistema imunológico do inseto (HUMBER, 2008; BOOMSMA *et al.*, 2014). Os blastósporos possuem rápida taxa de germinação, como por exemplo, blastósporos de *C. fumosorosea* com mais de 90% de germinação em 6h e conídios em 16h, o que os torna úteis como inseticida de contato (VEGA *et al.*, 1999).

Na natureza os principais propágulos infecciosos típicos dos ascomicetos entomopatogênicos são os conídios aéreos. Outros podem ser explorados como blastósporos, conídios submersos (microciclo), micélios e microescleródios. A escolha do propágulo apropriado inclui o alvo, a virulência e tolerância à dessecação, a tolerância térmica, a viabilidade (velocidade de germinação e infecção), a reprodução, a tolerância à radiação UV, bem como a capacidade do fungo escolhido para produzir esses propágulos (JACKSON; DUNLAP; JARONSKI *et al.*, 2010; FERNANDES *et al.*, 2015).

O objetivo da seleção de fungos entomopatogênicos é encontrar um isolado que produza propágulos estáveis e que controle insetos em condições de campo variadas. Como na maior parte das vezes os fungos são aplicados em pulverização, o ideal é utilizar um método produtivo que resulte em grande número de propágulos infectivos. Por isso, a maioria das biofábricas utiliza a fermentação semissólida para produção massal de conídios aéreos (JARONSKI, 2014).

As estruturas fúngicas já mencionadas (esporos, conídios submersos e aéreos, blastósporos e microescleródios) quando entram em contato com a cutícula dos insetos germinam e causam processo de patogenicidade e morte do hospedeiro. O mecanismo de ação dos fungos entomopatogênicos é abordado no próximo tópico.

## **1.6. Mecanismo de ação de fungos entomopatogênicos**

De forma geral os fungos entomopatogênicos são reconhecidos pela sua virulência e tem como hospedeiros primários os afídeos, tripses, ácaros, moscas-brancas, gafanhotos, besouros e lagartas. Estes fungos possuem largo espectro de ação, sendo eles capazes de colonizar vários insetos e ácaros e causam com frequência epizootias. Outra característica interessante para utilização destes entomopatógenos é a capacidade de colonizar todos os estádios de desenvolvimento do hospedeiro (ALVES *et al.*, 2008).

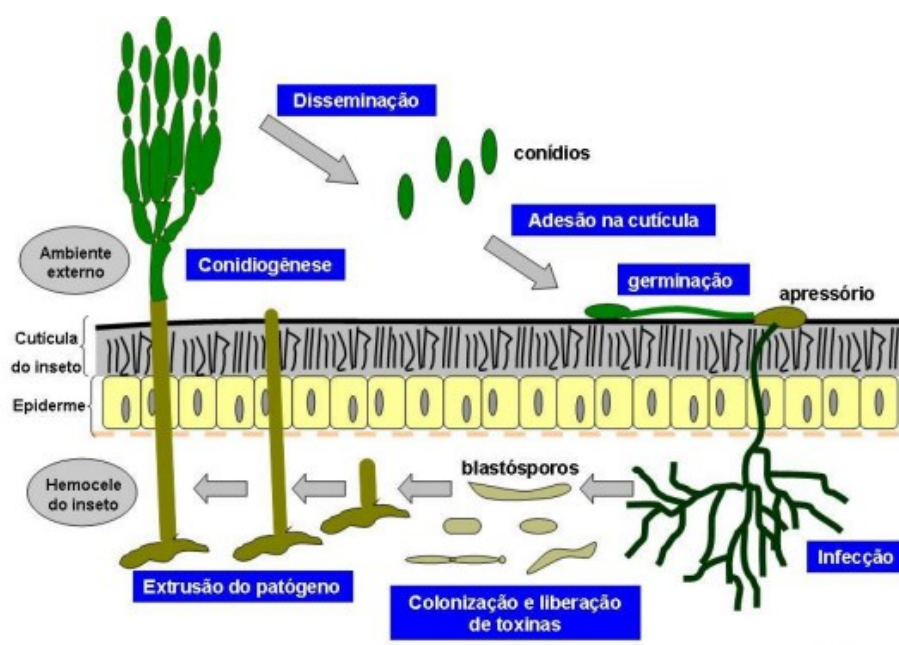
Os fungos entomopatógenos podem invadir os insetos de diversas formas, principalmente via cutícula, e uma vez dentro do inseto, ele se multiplica rapidamente sob todos os tecidos ocasionando a morte pela destruição dos tecidos, que é ocasionada pelas toxinas e metabólitos secundários produzidas pelos fungos (ALVES *et al.*, 2008; CANALI, 2017). Após os fungos colonizarem todo corpo do inseto, emergem das articulações e produzem conídios que geralmente são espalhados pelo vento, chuva ou contato com outros insetos, podendo causar epizootia (VALICENTE, 2009).

Para que este processo ocorra o primeiro passo para infecção é a adesão do fungo ao inseto (Figura 1). Nesta fase possuem mecanismos que ainda não são totalmente conhecidos, mas sabe-se que existe ação de forças eletrostáticas e relações de umidade e temperatura. O próximo passo é a germinação, que é quando o fungo encontra as condições favoráveis de umidade (em torno de 90%), temperatura (entre 23 a 30°C), pH entre 5,5 a 7,0 e também boa disponibilidade de oxigênio e nutrientes. Assim que iniciada a germinação é ocorre a formação do tubo germinativo. Na ponta do tubo germinativo ocorre a dilatação das

hifas formando o apressório. Esta dilatação quando migra o conteúdo citoplasmático torna-se uma área de intensa atividade metabólica que tem a função de facilitar a entrada do grampo de penetração, que por sua vez tem a função de “perfuração” da cutícula do inseto (ALVES, 1998).

No processo de penetração ocorre a liberação de enzimas como quitinases, lipases e proteinases que atuam na degradação da cutícula protetora do inseto facilitando a entrada do fungo. Após a penetração inicia-se o processo de crescimento da hifa que se desenvolve e coloniza o interior do inseto, começando pelos corpos gordurosos e passando para o tubo digestivo, ocasionando paralisação da alimentação do inseto (Figura 1) (ALVES, 1998).

**Figura 1.** Ciclo básico da relação patógeno-hospedeiro de fungos anamórficos.



Fonte: Mascarin e Pauli (2017).

Os insetos infectados param de se alimentar e tomam-se mais lentos. Estes morrem relativamente rápido, às vezes em posição ereta, mas ainda presos na folha ou no ramo. Isto pode ser observado em locais mais elevados ou concentrados na borda das culturas. O corpo do inseto morto pode ser firme e de consistência emborrachada ou de aparência oca. Várias vezes observam-se insetos mortos de cor creme, verde, avermelhada ou marrom, em consequência do crescimento do fungo, quer seja envolvendo o corpo do hospedeiro, quer seja saindo das juntas dos segmentos do corpo (VALICENTE, 2009).

No processo de infecção dos fungos nos insetos, o crescimento da biomassa do microrganismo sobre o cadáver do inseto resulta na produção de número significativo de conídios que serão dispersos no ambiente para repetir o processo de infecção. Todavia, a maioria destes conídios se perde rapidamente no ambiente, e apenas uma proporção mínima vai alcançar sucesso, infectando outros insetos. Em períodos de elevação da densidade de pragas é comum o aparecimento de doenças em populações de insetos no campo, denominadas epizootias. O desenvolvimento de epizootias está relacionado com a dinâmica da população de insetos, o número de conídios fúngicos e sua viabilidade, a eficiência de infecção e desenvolvimento do microrganismo (MEYLING; EILENBERG, 2007).

Para pesquisas em laboratório com fungos entomopatogênicos em insetos, é necessário a multiplicação em massa afim de se obter uma quantidade de insetos suficientes para elaboração do experimento com condições e idade semelhantes. No caso deste trabalho, fez-se necessário a criação massal da broca-do-café.

### **1.7. Criação massal de *Hypothenemus hampei***

A criação massal da broca-do-café é muito importante para pesquisas de manejo integrado dessa praga, como para a criação de parasitoides, avaliação de microrganismos entomopatogênicos, como o fungo *B. bassiana*, além de ser usada para estudos de herança genética, de resistência a inseticidas químicos, dentre outras pesquisas (BRUN; GAUDICHON; WIGLEY, 1993).

Alguns autores realizam a criação massal da broca-do-café por meio de técnicas de infestação de frutos, que exigem desinfestação eficiente dos grãos e armazenamento dos frutos durante a entressafra (HIROSE; NEVES, 2002; PÉREZ; INFANTE; VEJA, 2005). Conforme os dados de Benassi e Benassi (2000) é possível utilizar sementes beneficiadas de *C. arabica*, armazenadas em condições de resfriamento por um ano, para criação da broca-do-café, no entanto, a umidade das sementes infestadas deve ser mantida por intermédio de câmara de nevoeiro (para pulverização de água) durante o ciclo de vida da broca. Esses autores infestaram sementes beneficiadas com fêmeas de *H. hampei* e dentre o total de sementes que foram perfuradas, 21,4% foram abandonadas, 12,6% estavam contaminadas por fungos, 11,2% havia presença do inseto sem formas imaturas e 54,8% apresentavam descendentes. A média de descendentes por fêmea foi de 10,6 indivíduos após 30 dias de infestação. Benassi (2000b) verificou a ocorrência da broca-do-café em outros hospedeiros,

como em frutos de açai *Euterpe oleraceae* Mart., em laboratório. A média de descendentes foi de 2 a 11 indivíduos por fêmea. O período decorrido para início das posturas foi maior em relação à criação em frutos de café, possivelmente por maior dificuldade para construção de galerias no fruto de açai.

No entanto, a criação massal da broca-do-café em frutos e sementes apresenta aspectos negativos, como elevada contaminação dos frutos por fungos saprófitos, difícil manutenção da turgescência e umidade dos frutos e alta mortalidade dos insetos quando retirados dos frutos. Portilla (1999) relatou a presença de *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. contaminando pergaminhos de café utilizados para criação de *H. hampei*.

Dessa forma, faz-se necessário o desenvolvimento de técnicas de criação massal da broca-do-café em dieta artificial para manter gerações sucessivas do inseto em laboratório (VILLACORTA, 1985). A criação de insetos em dietas artificiais possui vantagens como, ocupar menor espaço físico e produzir maior número de insetos o que requer cuidado sanitário especial para evitar que contaminações proliferem na dieta, exigindo assim, mão-de-obra especializada e laboratório com infraestrutura. A desvantagem pode estar relacionada com o custo dos insumos para preparo da dieta e conforme Hirose e Neves (2002) outra desvantagem é a construção de galerias na dieta, o que pode ocasionar resíduos de dieta sobre a cutícula dos insetos e, devido aos conservantes, pode interferir na germinação dos conídios, quando o objetivo é a testagem de produtos à base de fungos.

Na criação da broca-do-café em dieta artificial contendo como ingredientes principais germen de trigo, caseína, café moído, conservantes e vitaminas, Brun, Gaudichon e Wigley (1993) verificaram que os primeiros ovos foram observados aos 12 dias, larvas eclodiram de 3 a 5 dias e empuparam após cerca de três semanas. As fases de pré-pupa e pupa tiveram duração de 2-3 dias e 3-5 dias, respectivamente. Após 70 dias, apenas metade da prole atingiu a idade adulta, em parte devido ao prolongado período de oviposição. A média de descendentes foi 16 indivíduos por fêmea. A longevidade média das fêmeas foi de 382 dias e um total de 10 gerações foram obtidas. Os resultados indicam que a dieta testada pelos autores manteve todos os estágios de crescimento da broca-do-café e possui como vantagem a fácil obtenção de ingredientes.

A fertilidade, fecundidade, longevidade e duração do ciclo de vida dos insetos são fatores diretamente relacionados às suas atividades, podendo sofrer alterações ao longo das gerações. Essas alterações podem ser ocasionadas por fatores físicos e químicos, aos quais os insetos são submetidos em produções sucessivas. Exemplificando, o tempo de voo da broca-



do-café diminui ao longo das gerações obtidas em criação massal, no entanto esse parâmetro não afeta as taxas de crescimento do inseto. Sendo assim, a criação massal pode ser mantida, desde que sejam selecionadas fêmeas ativas para dar continuidade às próximas gerações (VEGA; KRAMER; JARAMILLO, 2011). Os mesmos autores avaliaram a taxa de fecundidade da broca-do-café em dieta artificial modificada (VILLACORTA; BARRERA, 1993) em razão do adensamento populacional. Os autores relataram que a partir de 40 dias de crescimento a taxa de fecundidade das fêmeas adultas é maior quando é colocada apenas uma fêmea por pote de dieta.

## REFERÊNCIAS

- ABRAR, A. *et al.* Identification of locally isolated entomopathogenic *Fusarium* species from the soil of Changa Manga Forest, Pakistan and evaluation of their larvicidal efficacy against *Aedes aegypti*. **Brazilian Journal of Biology**, [s. l.], v. 83, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.246230>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjb/a/Zn3dfS6ZckG4SkJYymQwPgQ/abstract/?format=html&lang=p>. Acesso em: 13 out. 2022.
- AGROFIT. Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários - **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil**. 2022. Disponível em: [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso em: 28/03/2022.
- ALCÂNTARA, E. N.; FERREIRA, M. M. Efeitos de métodos de controle de plantas daninhas na cultura do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) sobre a qualidade física do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 24, n. 4, p. 711-721, dez. 2000. DOI 10.1590/s0100-06832000000400003. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbcs/a/NBgSQHbFcDNTnCXtjdTbwYF/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 21 jul. 2022.
- ALMEIDA, J. E. M.; BATISTA FILHO, A.; LEITE, L. G. **Controle microbiano de insetos – Fungos entomopatogênicos**. Campinas - São Paulo: Instituto Biológico, 2017. 2 p. Apostila.
- ALMEIDA, J. E. M.; ROCHA, T. C.; BATISTA FILHO, A. Desenvolvimento de método para extração física de conídios de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* para formulação pó seco e molhável de bioinseticidas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 4, p. 369-371, out. 2007. DOI 10.1590/1808-1657v74p3692007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aib/a/7Ntf76zfJf8NFPQCQS78SVx/?lang=pt>. Acesso em: 21 jul. 2022.
- ALVES, L. F.A. *et al.* Ocorrência natural de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuilleman (Moniliales: Moniliaceae) sobre o cascudinho, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae), em aviário comercial de Cascavel, PR. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 3, p. 507-510, jun. 2005. DOI 10.1590/s1519-566x2005000300021. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ne/a/hkWyxT5NSXZgR59VkDCn57z/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 21 jul. 2022.
- ALVES, R.T.; FARIA, M. R. **Situação atual do uso de fungos entomopatogênicos no Brasil** (Parte I - 10/11/ 2003).
- ALVES, S. B. (ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. 2. ed. Piracicaba: Fealq, 1998.
- ALVES, S. B. *et al.* **Produtos fitossanitários e entomopatogênicos**, p. 217238. In: Alves, S.B. (ed.), **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba, FEALQ, 1163p. 1998.

ALVES, S. B. *et al.* **Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina.** In: o (Ed). Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios. Piracicaba: FEALQ, p.69-110, 2008.

BENASSI, V. L. R. M. Aspectos biológicos da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae) em *Coffea canephora*. In: **Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, 1., 2000, Poços de caldas, MG. Resumos expandidos. Brasília: Embrapa Café: Minasplan. v. 2. p. 1181-1184, 2000a. Disponível em: <http://www.sbicafe.ufv.br/handle/123456789/643>. Acesso em: 21 jul. 2022.

BENASSI, V. L. R. M. Aspectos biológicos da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (F., 1867) (Coleoptera: Scolytidae), em frutos de açaí, *Euterpe oleraceae*. In: **Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, 1., 2000, Poços de caldas, MG. Resumos expandidos. Brasília: Embrapa Café: Minasplan. v. 2, p. 1178-1180, 2000b. Disponível em: [http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/123456789/633/155537\\_Art306f.pdf?sequence=1](http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/123456789/633/155537_Art306f.pdf?sequence=1). Acesso em: 21 jul. 2022.

BENASSI, V. L. R. M. **Biologia em diferentes temperaturas e ocorrência de *Prorops nasuta* Wat. e *Cephalonomia stephanoderis* Betr. (Hymenoptera: Bethyridae) parasitando *Hypothenemus hampei* (Ferr.) (Coleoptera: Scolytidae).** 2007. 90 p. Tese (Doutorado em entomologia) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007. Disponível em: <https://www.fcav.unesp.br/Home/download/pgtrabs/ea/d/2556.pdf>. Acesso em: 11 out. 2022.

BENASSI, V. L. R. M.; BENASSI, A. C. Criação da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera, Scolytidae) em câmara de nevoeiro. In: **Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, I, 2000, Poços de Caldas, MG. Resumos expandidos. Brasília: Embrapa Café: Minasplan, v. 2, p. 1201-1203, 2000. Disponível em: [http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/123456789/681/155537\\_Art312f.pdf?sequence=1](http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/123456789/681/155537_Art312f.pdf?sequence=1). Acesso em: 21 jul. 2022.

BOOMSMA, J. J. *et al.* Evolutionary interaction networks of insect pathogenic fungi. **Annual Review Of Entomology**, [s.l.], v. 59, n. 1, p. 467-485, 7 jan. 2014. DOI 10.1146/annurev-ento-011613-162054. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-ento-011613-162054>. Acesso em: 21 jul. 2022.

BOTELHO, M. G. L. *et al.* Agrotóxicos na agricultura: agentes de danos ambientais e a busca por uma agricultura sustentável. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, [s. l.], v. 9, n. 8, 2020. DOI: 10.33448/rsd-v9i8.5806. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/5806>. Acesso em: 11 out. 2022.

BOTTI, J. M. C. *et al.* Predation of coffee berry borer by a green lacewing. **Neotropical Entomology**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 160-163, 2022. DOI: 10.1007/s13744-021-00884-0. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13744-021-00884-0>. Acesso em: 11 out. 2022.

BRUN, L. O.; GAUDICHON, V.; WIGLEY, P. J. An artificial diet for continuous rearing of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). **International Journal Of Tropical Insect Science**, Nouméa, v. 14, n. 5-6, p. 585-587, dez. 1993. DOI 10.1017/s1742758400017963. Disponível em:

[https://www.researchgate.net/publication/32976625\\_An\\_artificial\\_diet\\_for\\_continuous\\_rearing\\_of\\_the\\_coffee\\_berry\\_borer\\_Hypothenemus\\_hampeii\\_Ferrari\\_Coleoptera\\_Scolytidae](https://www.researchgate.net/publication/32976625_An_artificial_diet_for_continuous_rearing_of_the_coffee_berry_borer_Hypothenemus_hampeii_Ferrari_Coleoptera_Scolytidae). Acesso em: 21 jul. 2022.

BUSTILLO, A. E. *et al.* Dynamics of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* Infecting *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) Populations Emerging from Fallen Coffee Berries. **The Florida Entomologist**, Gainesville, v. 82, n. 4, p. 491, dez. 1999. DOI 10.2307/3496468. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/3496468>. Acesso em: 21 jul. 2022.

CAIXETA, G. Z. T.; GUIMARÃES, P. T. G.; ROMANIELLO, M. M. Gerenciamento como forma de garantir a competitividade da cafeicultura. **Informe Agropecuário: Planejamento e gerenciamento da cafeicultura**, Belo Horizonte, v. 29, n. 247, p. 14-23, dez. 2008. Disponível em:

[http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/informe\\_agropecuário/Planejamento\\_e\\_gerenciamento\\_da\\_cafeicultura.pdf](http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/informe_agropecuário/Planejamento_e_gerenciamento_da_cafeicultura.pdf). Acesso em: 21 jul. 2022.

CAMARGO, A P. de; CAMARGO, M. B. P. de. Definição e esquematização das fases fenológicas do cafeeiro arábica nas condições tropicais do Brasil. **Bragantia**, Campinas, v. 60, n. 1, p. 65-68, mar. 2001. DOI 10.1590/s0006-87052001000100008. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/brag/a/DHJFXMkTxK5wJX5q74xhw3p/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 21 jul. 2022.

CAMARGO, A. P.; PEREIRA, A. R. **Agro meteorology of the coffee crop**. 58. ed. Geneva, Switzerland: World Meteorological Organization, 1994.

CAMILO, J. E.; OLIVARES, F. F.; HERNÁNDEZ, H. A. Fenología y reproducción de la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari) durante el desarrollo del fruto. **Agronomía Mesoamericana**, Alajuela, v. 14, n. 1, p. 59-63, 25 set. 2003. DOI 10.15517/am.v14i1.11989. Disponível em: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43714108>. Acesso em: 25 jul. 2022.

CANALI, M. C. **Prospecção de fungos entomopatogênicos para o controle biológico de formigas cortadeiras**. 2017. 117f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Área de Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2017. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/150198?show=full>. Acesso em: 25 jul. 2022.

CELESTINO, F. N. **Técnica de criação e associação de métodos de controle da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari)**. 2014. Tese (Doutorado em produção vegetal) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2014. Disponível em: <https://repositorio.ufes.br/handle/10/4882>. Acesso em: 25 jul. 2022.

CELESTINO, F. N. *et al.* Control of coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) with botanical insecticides and mineral oils. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, PR, v. 38, n. 1, p. 1-8, 2016. DOI: 10.4025/actasciagron.v38i1.27430. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/asagr/a/MsVP5srVyHfgXFvvCMbGwWh/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 10 out. 2022

CELESTINO, F. N. *et al.* Compatibilidade in vitro entre *Beauveria bassiana* e o óleo de mamona. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, PE, v. 13, n. 4, 2018. DOI: 10.5039/agraria.v13i4a5595. Disponível em: <http://www.agraria.pro.br/ojs32/index.php/RBCA/article/view/v13i4a5595/293>. Acesso em: 10 out 2022.

CELESTINO, F. N. *et al.* In vivo compatibility between *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin and castor oil on *Hypothenemus hampei* (Ferrari). **Coffee Science**, [s. l.], v. 15, 2020. DOI: 10.25186/v15i.1771. Disponível em: <http://www.coffeescience.ufla.br/index.php/Coffeescience/article/view/1771>. Acesso em: 11 out. 2022.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (2022). **Acompanhamento da safra brasileira**. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cafe>. Acesso em: 07 de out de 2022.

COSTA, J. N. M. *et al.* D. Infestação da broca-do-café (*Hypothenemus hampei*, Ferrari) no estado de Rondônia. In: **Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, 1., 2000, Poços de caldas, MG. Resumos expandidos. Brasília: Embrapa Café: Minasplan. v. 2, p. 1213-1215, 2000. Disponível em: <http://www.sbicafe.ufv.br/handle/123456789/689>

CRUZ, I. **A lagarta-do-cartucho na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, 1995. 45p. (Circular técnica, 21).

DAMATTA, F. M. *et al.* Ecophysiology of coffee growth and production. **Brazilian Journal Of Plant Physiology**, Campos dos Goytacazes, v. 19, n. 4, p. 485-510, dez. 2007. DOI 10.1590/s1677-04202007000400014. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjpp/a/xSBXnvrDDczyDbBtzspGs3v/?lang=en>. Acesso em: 25 jul. 2022.

DAMON, A. A review of the biology and control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). **Bulletin of Entomological Research**, Cambridge, v. 90, n. 6, p. 453-465, dez. 2000. DOI 10.1017/s0007485300000584. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/12221364\\_A\\_review\\_of\\_the\\_biology\\_and\\_control\\_of\\_the\\_coffee\\_berry\\_borer\\_Hypothenemus\\_hampeii\\_Coleoptera\\_Scolytidae](https://www.researchgate.net/publication/12221364_A_review_of_the_biology_and_control_of_the_coffee_berry_borer_Hypothenemus_hampeii_Coleoptera_Scolytidae). Acesso em: 25 jul. 2022.

DE JESUS, J. C. *et al.* Ocorrência de bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*) em cafeeiros cultivados em sistemas agroflorestal e convencional. **Revista Brasileira de Agroecologia**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 90-100, 2022. DOI <https://doi.org/10.33240/rba.v17i2.23560>. Disponível em: <https://revistas.aba-agroecologia.org.br/rbagroecologia/article/view/23560>. Acesso em: 07 out. 2022.

DE LA ROSA, W. *et al.* Effect of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) upon the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae) Under Field Conditions. **Journal of Economic Entomology**, [s.l.], v. 93, n. 5, p. 1409-1414, 1 out. 2000. DOI 10.1603/0022-0493-93.5.1409. Disponível em: <https://academic.oup.com/jee/article/93/5/1409/2217295>. Acesso em: 25 jul. 2022.

EPAMIG. Circular Técnica, n.234, **Monitoramento e controle da broca-do-café com eficiência e racionalidade** jan. 2016. EMATER MG- Série Tecnológica Cafeicultura: Controle Alternativo da Broca do Cafeeiro. 2016. Disponível em: <http://www.epamig.br/download/circular-tecnica-234/?wpdmdl=2336&refresh=6345530448cba1665487620>. Acesso em: 11 out 2022.

FANTON, C. J. **Ecologia da broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae) na zona da mata de Minas Gerais**. 2001. Tese (Doutorado em entomologia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/10901>. Acesso em: 25 jul. 2022.

FARIA, M. R.; MAGALHÃES, B. P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. **Biociência**, v. 22, n. 1, p. 18-21, 2001. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Marcos-Faria-4/publication/284267729\\_O\\_uso\\_de\\_fungos\\_entomopatogenicos\\_no\\_Brasil/links/57f6515908ae8da3ce5769d8/O-uso-de-fungos-entomopatogenicos-no-Brasil.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Marcos-Faria-4/publication/284267729_O_uso_de_fungos_entomopatogenicos_no_Brasil/links/57f6515908ae8da3ce5769d8/O-uso-de-fungos-entomopatogenicos-no-Brasil.pdf). Acesso em: 31 jul. 2022.

FENG, M. G.; POPRAWski, T. J.; KHACHATOURIANS, G. G. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. **Biocontrol Science and Technology**, Tucson, v. 4, n. 1, p. 3-34, jan. 1994. DOI 10.1080/09583159409355309. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/248963348\\_Production\\_formulation\\_and\\_application\\_of\\_the\\_entomopathogenic\\_fungus\\_Beauveria\\_bassiana\\_for\\_insect\\_control\\_current\\_status](https://www.researchgate.net/publication/248963348_Production_formulation_and_application_of_the_entomopathogenic_fungus_Beauveria_bassiana_for_insect_control_current_status). Acesso em: 25 jul. 2022.

FERNANDES, É. K. K. *et al.* Tolerance of entomopathogenic fungi to ultraviolet radiation: a review on screening of strains and their formulation. **Current Genetics**, [s.l.], v. 61, n. 3, p. 427-440, 2015. DOI 10.1007/s00294-015-0492-z. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00294-015-0492-z>. Acesso em: 25 jul. 2022.

FERNANDES, F. L. *et al.* Economic injury level for the coffee berry borer (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) using attractive traps in Brazilian coffee fields. **Journal of Economic Entomology**, [s. l.], v.104, p.1909-1917, 2011. DOI: 10.1603/EC11032. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22299352/>. Acesso em: 23 out. 2022.

FERNANDES, F. L. *et al.* Controle massal da broca-do-café com armadilhas de garrafa Pet vermelha em cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 49, p. 587-594, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2014000800002>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pab/a/RHbzGvYyYKVVVGQRGCNsfgsp/?format=html>. Acesso em: 23 out. 2022.

FRAZZON, A. P. G. *et al.* In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, [s.l.], v. 94, n. 1-2, p. 117-125, dez. 2000. DOI 10.1016/S0304-4017(00)00368-x. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S030440170000368X>. Acesso em: 25 jul. 2022.

GIRALDO, A. M. L. **Normalización de la dieta artificial y evaluación de actividad insecticida contra la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari) de extractos**

**vegetales de plantas recolectadas em la ecorregión cafetera.** 2009. Tese (Doutorado em Química) Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, 2009. Disponível em: <https://repositorio.utp.edu.co/items/df1d2f65-9dcf-4045-880b-0c047488a153>. Acesso em: 25 jul. 2022.

GURCAN, S. *et al.* First case report of empyema caused by *Beauveria bassiana*. **Mycoses**, Edirne, v. 49, n. 3, p. 246-248, maio 2006. DOI 10.1111/j.1439-0507.2006.01232.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16681819/>. Acesso em: 25 jul. 2022.

HIROSE, E.; NEVES, P. M. O. J. Técnica para criação e manutenção da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae), em laboratório. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 161-164, mar. 2002. DOI 10.1590/s1519-566x2002000100023. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ne/a/PJSVpLZT7nhhZQYvPxcmq7c/abstract/?lang=en&format=htm>. Acesso em: 25 jul. 2022.

HOY, M. A.; SINGH, R.; ROGERS, M. E. Evaluations of a novel isolate of *Isaria fumosorosea* for control of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 93, n. 1, p. 24-32, mar. 2010. DOI 10.1653/024.093.0103. Disponível em: <https://bioone.org/journals/florida-entomologist/volume-93/issue-1/024.093.0103/Evaluations-of-a-Novel-Isolate-of-Isaria-fumosorosea-for-Control/10.1653/024.093.0103.full>. Acesso em: 25 jul. 2022.

HUMBER, R. A. Evolution of entomopathogenicity in fungi. **Journal of Invertebrate Pathology**, [s.l.], v. 98, n. 3, p. 262-266, jul. 2008. DOI 10.1016/j.jip.2008.02.017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022201108000591>. Acesso em: 25 jul. 2022.

JACCOUD, D. B.; HUGHES, W. O. H.; JACKSON, C. W. The epizootiology of a *Metarhizium* infection in mini-nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, [s.l.], v. 93, n. 1, p. 51-61, out. 1999. DOI 10.1046/j.1570-7458.1999.00561.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1570-7458.1999.00561.x>. Acesso em: 25 jul. 2022.

JACKSON, M. A.; DUNLAP, C. A.; JARONSKI, S. T. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. **Biocontrol**, [s.l.], v. 55, n. 1, p. 129-145, fev. 2010. DOI 10.1007/s10526-009-9240-y. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/226650132\\_The\\_Ecology\\_of\\_Fungal\\_Entomopathogens](https://www.researchgate.net/publication/226650132_The_Ecology_of_Fungal_Entomopathogens). Acesso em: 25 jul. 2022.

JACKSON, M. A.; PAYNE, A. R.; ODELSON, D. A. liquid-culture production of blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus* using portable fermentation equipment. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 31, n. 4, p. 149-154, 8 abr. 2004. DOI 10.1007/s10295-004-0127-8. Disponível em: <https://academic.oup.com/jimb/article/31/4/149/5992264>. Acesso em: 25 jul. 2022.

JAMES, R. R.; BUCKNER, J. S.; FREEMAN, T. P. Cuticular lipids and silverleaf whitefly stage affect conidial germination of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, [s.l.], v. 84, n. 2, p. 67-74, out. 2003. DOI

10.1016/j.jip.2003.08.006. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S002220110300140X>. Acesso em: 25 jul. 2022.

JARAMILLO, M. G. **Zoneamento de *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) e *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville, 1842), pragas do cafeeiro no Brasil e na Colômbia, com base nas exigências térmicas**. 2016. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2016. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11146/tde-30112016-173124/pt-br.php>. Acesso em: 25 jul. 2022.

JARONSKI, S. T. Mass production of entomopathogenic fungi: state of the art. **Mass Production of Beneficial Organisms**, [s.l.], p. 357-413, 2014. DOI 10.1016/b978-0-12-391453-8.00011-x. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012391453800011X>. Acesso em: 25 jul. 2022.

JÚNIOR, A. G.; SANTOS, Á. F.; AUER, C. G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. **Floresta**, [s.l.], v. 30, n. 12, p. 155-165, 31 dez. 2000. DOI 10.5380/rf.v30i12.2362. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/floresta/article/view/2362>. Acesso em: 29 jul. 2022.

LAURENTINO, E.; COSTA, J. N. M. **Descrição e caracterização biológica da broca-do-café (*Hypothenemus hampei*, Ferrari 1867) no Estado de Rondônia**. Porto Velho: Embrapa Rondônia. 2004, 21 p. (Embrapa Rondônia. Documentos, 90).

LOPES, L. M. V. *et al.* Avaliação da qualidade de grãos de diferentes cultivares de cafeeiro *Coffea arabica* L. In: **Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, I**, 2000, Poços de Caldas, MG. Resumos expandidos. Brasília, DF: Embrapa Café; Minasplan, v. 2, p. 465-468, 2000. Disponível em: <http://www.sbicafe.ufv.br/handle/123456789/903>. Acesso em: 29 jul. 2022.

LOURENÇÃO, A. L. *et al.* Controle de *Sitophilus zeamais* em milho com *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e Pirimifos Metil. **Ecossistema**, Pinhal, v.18, p.69-74, 1993.

MACHADO, D. F. M. *et al.* *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, [s.l.], v. 1, n. 35, p. 274-288, 23 dez. 2012. DOI 10.19084/RCA.16182. Disponível em: <https://revistas.rcaap.pt/rca/article/view/16182>. Acesso em: 29 jul. 2022.

MASCARIN, G. M; PAULI, G. Bioprodutos à base de fungos entomopatogênicos. **Controle Alternativo de pragas e doenças na agricultura orgânica**, Viçosa, MG, v. 1, p. 169-195, 2010. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Gabriel-Moura-Mascarin/publication/274374886\\_Bioprodutos\\_a\\_base\\_de\\_fungos\\_entomopatogenticos\\_Fungal\\_biopesticides\\_in\\_portuguese/links/551c6f220cf2909047bc92ef/Bioprodutos-a-base-de-fungos-entomopatogenticos-Fungal-biopesticides-in-portuguese.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Gabriel-Moura-Mascarin/publication/274374886_Bioprodutos_a_base_de_fungos_entomopatogenticos_Fungal_biopesticides_in_portuguese/links/551c6f220cf2909047bc92ef/Bioprodutos-a-base-de-fungos-entomopatogenticos-Fungal-biopesticides-in-portuguese.pdf). Acesso em: 11 out. 2022.

MARCOMINI, G. R. Análise técnica e econômica da utilização de inseticida biológico *Beauveria bassiana* para o controle da broca-do-café (*Hypothenemus hampei*). **Revista Hipótese**, Itapetininga, SP, v. 1, n. 3, p. 92-109, 2015. Disponível em: <https://revistahipoteses.emnuvens.com.br/revista/article/view/83>. Acesso em: 11 out. 2022.



MEYLING, N. V.; EILENBERG, J. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. **Biological Control**, [s.l.], v. 43, n. 2, p. 145-155, nov. 2007. DOI 10.1016/j.biocontrol.2007.07.007. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1049964407001806>. Acesso em: 29 jul. 2022.

MOLINA, D. *et al.* Searching for a coffee variety with antibiosis effect to *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Curculionidae). **Euphytica**, [s. l.], v. 218, n. 7, pág. 1-22, 2022. DOI <https://doi.org/10.1007/s10681-022-03047-3>. Disponível em:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s10681-022-03047-3>. Acesso em: 07 out. 2022.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, p. 7-14, 2009.

NUNES, M. de S. *et al.* Avaliação in vitro dos fungos *Aspergillus flavus* e *Penicillium corylophilum* em larvas de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). **Parasitologia Latinoamericana**, Santiago, v. 57, n. 3-4, p. 134-140, jul. 2002. DOI 10.4067/s0717-77122002000300009. Disponível em:

[https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-77122002000300009](https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-77122002000300009). Acesso em: 29 jul. 2022.

OLIVEIRA, D. G. P. de. **Proposta de um protocolo para avaliação da viabilidade de conídios de fungos entomopatogênicos e determinação da proteção ao calor conferida a *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* pela formulação em óleo emulsionável**. 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2009.

OLIVEIRA, J. S. *et al.* Comparação entre café sombreado produzido no maciço de baturité e café ao sol comercial. In: Congresso internacional das ciências agrárias, 3., 2018, João Pessoa. **Anais [...]**. João Pessoa: Cointer, 2018. p. 1-4. Disponível em: <https://cointer-pdvagro.com.br/wp-content/uploads/2019/02/COMPARA%C3%87%C3%83O-ENTRE-CAF%C3%89-SOMBREADO-PRODUZIDO-NO-MACI%C3%87O-DE-BATURIT%C3%89-E-CAF%C3%89-AO-SOL-COMERCIAL.pdf>. Acesso em: 30 jul. 2022.

OLIVEIRA, R. C.; ALVES, L. F. A.; NEVES, P. M. O. J. Suscetibilidade de *Oligonychus yothersi* (Acari: Tetranychidae) ao fungo *Beauveria bassiana*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59, n. 1, p. 187-189, mar. 2002. DOI 10.1590/s0103-90162002000100027. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sa/a/bFQVJpCxktRsyX3YfRnRn9t/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 29 jul. 2022.

ORLANDELLI, R. C.; PAMPHILE, J. A. Fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* como agente de controle biológico de insetos pragas. **Revista de Saúde e Biologia**, [s.l.], v. 6, n. 2, p. 79-82, jul. 2011. Disponível em:

<https://revista2.grupointegrado.br/revista/index.php/sabios/article/view/757>. Acesso em: 29 jul. 2022.

PARRA, J. R. P. Controle biológico na agricultura brasileira. **Entomological Communications**, [s. l.], v. 1, 2019. DOI: <https://doi.org/10.37486/2675-1305.ec01002>.

Disponível em:

<https://www.entomologicalcommunications.org/index.php/entcom/article/view/ec01002>.

Acesso em: 11 out. 2022.

PARDEY, A. E.B. Una revisión sobre la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), em Colombia. **Revista Colombiana de Entomologia**, v. 32, n. 2, p. 101-116, 2006.

PATRÍCIO, F. R. A.; OLIVEIRA, E. G. Desafios do manejo no controle de doenças do café. **Visão Agrícola**, Piracicaba, v. 12, p. 51-54, 2013.

PAVA-RIPOLL, M. *et al.* Increased pathogenicity against coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) by *Metarhizium anisopliae* expressing the scorpion toxin (AaIT) gene. **Journal of Invertebrate Pathology**, [s.l.], v. 99, n. 2, p. 220-226, out. 2008. DOI 10.1016/j.jip.2008.05.004. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022201108001201>. Acesso em: 29 jul. 2022.

PENDLAND, J. C.; BOUCIAS, D. G. In vitro growth of the entomopathogenic hyphomycete *Nomuraea rileyi*. **Mycologia**, [s.l.], v. 89, n. 1, p. 66-71, jan. 1997. DOI 10.1080/00275514.1997.12026755. Disponível em:

[https://www.researchgate.net/publication/272593777\\_In\\_Vitro\\_Growth\\_of\\_the\\_Entomopathogenic\\_Hyphomycete\\_Nomuraea\\_rileyi](https://www.researchgate.net/publication/272593777_In_Vitro_Growth_of_the_Entomopathogenic_Hyphomycete_Nomuraea_rileyi). Acesso em: 29 jul. 2022.

PÉREZ, J.; INFANTE, F.; VEGA, F. E. Does the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae) have mutualistic fungi? **Annals of the Entomological Society of America**, [s.l.], v. 98, n. 4, p. 483-490, 1 jul. 2005. DOI 10.1603/0013-8746(2005)098[0483:dtcbbc]2.0.co;2. Disponível em: <https://academic.oup.com/aesa/article/98/4/483/22056>. Acesso em: 29 jul. 2022.

PÉREZ-LACHAUD, G.; HARDY, I. C. W. Reproductive biology of *Cephalonomia hyalinipennis* (Hymenoptera: Bethyilidae), a native parasitoid of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae), in Chiapas, Mexico. **Biological Control**, [s.l.], v. 14, n. 3, p. 152-158, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1006/bcon.1998.0685>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1049964498906855>. Acesso em: 11 out. 2022)

PEROSA, B. B.; DE JESUS, C. M.; ORTEGA, A. C. Associativismo e Certificação na Cafeicultura Mineira: um estudo do Café do Cerrado e do Café da Mantiqueira de Minas. **Revista Economia Ensaios**, Uberlândia, MG, v. 32, n. 1, p. 29-63, 2017. DOI: <https://doi.org/10.14393/REE-v32n1a2017-2>. Disponível em: <https://seer.ufu.br/index.php/revistaeconomiaensaios/article/view/36605>. Acesso em: 06 de out de 2022.

PESSOA, L. G. A.; SOUZA, T. M. N.; LOUREIRO, E. de S. Compatibilidade de alguns inseticidas utilizados no manejo de pragas em eucalipto com *Beauveria bassiana* (Cordycipitaceae). **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, [s. l.], v. 9, n. 8, 2020. DOI: 10.33448/rsd-v9i8.5148. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/5148>. Acesso em: 11 out. 2022.

PEZZOPANE, J. R. M.; PEDRO JUNIOR, M. J.; GALLO, P. B. Caracterização microclimática em cultivo consorciado café/banana. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, [s.l.], v. 11, n. 3, p. 256-264, jun. 2007. DOI 10.1590/s1415-43662007000300003. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbeaa/a/X6Yqs9tqJyRzPJTXX4rYybKD/?lang=pt>. Acesso em: 30 jul. 2022.

POMELLA, A. W. V.; RIBEIRO, R. T. S. Controle biológico com *Trichoderma* em grandes culturas – uma visão empresarial. **Biocontrole de Doenças de Plantas**, Jaguariúna, SP, v. 1, p. 239-244, 2009. Disponível em: [https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/43234412/Supressividade\\_a\\_fitopatgenos\\_habitantes20160301-16893-1eip4kd-with-cover-page-v2.pdf?Expires=1659299101&Signature=KJW4cqB0JzLiLWvzBuCXVmB61qO8ymHvi3vrD6i~KH5guUN-LxW3WkJ~nPOCvzr8srt8Qa6lzWcXs0m7rF7gHPbzmj4Gt~bZMXgWh8qs-ZNxp118fBPNOy2ZcBPdCNOqBb9h0JQfbUC94Wlg0uL8hsWXmBq37Nf7PGXg4poV-q6ar~stY6LZD7d-6SpqLAYv7Hzb8Uh3iObSDt5Qd2MR89R1hs~xy4QvsurCshxG0hNE-5n2D2lDg9eGoV0KcLZx0~wJtL9SSz~38h6Zny3WzoxSYBic39B8avW4LrPyHaJT7Bb1Mpywko-ijqYtfeywdqobL1wbNN9iNqcmzM0dQ\\_\\_&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA#page=235](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/43234412/Supressividade_a_fitopatgenos_habitantes20160301-16893-1eip4kd-with-cover-page-v2.pdf?Expires=1659299101&Signature=KJW4cqB0JzLiLWvzBuCXVmB61qO8ymHvi3vrD6i~KH5guUN-LxW3WkJ~nPOCvzr8srt8Qa6lzWcXs0m7rF7gHPbzmj4Gt~bZMXgWh8qs-ZNxp118fBPNOy2ZcBPdCNOqBb9h0JQfbUC94Wlg0uL8hsWXmBq37Nf7PGXg4poV-q6ar~stY6LZD7d-6SpqLAYv7Hzb8Uh3iObSDt5Qd2MR89R1hs~xy4QvsurCshxG0hNE-5n2D2lDg9eGoV0KcLZx0~wJtL9SSz~38h6Zny3WzoxSYBic39B8avW4LrPyHaJT7Bb1Mpywko-ijqYtfeywdqobL1wbNN9iNqcmzM0dQ__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA#page=235). Acesso em: 31 jul. 2022.

PORTELA, A. P. P.; BARRETO, L. Construção de material didático sobre controle biológico: um olhar para o ensino de ciências. **Revista Prática Docente**, Confresa, v. 5, n. 3, p. 1944-1963, 30 dez. 2020. DOI 10.23926/rpd.2526-2149.2020.v5.n3.p1944-1963.id872. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/348289358\\_CONSTRUCAO\\_DE\\_MATERIAL\\_DIDATICO\\_SOBRE\\_CONTROLE\\_BIOLOGICO\\_UM\\_OLHAR\\_PARA\\_O\\_ENSINO\\_DE\\_CIENCIAS](https://www.researchgate.net/publication/348289358_CONSTRUCAO_DE_MATERIAL_DIDATICO_SOBRE_CONTROLE_BIOLOGICO_UM_OLHAR_PARA_O_ENSINO_DE_CIENCIAS). Acesso em: 29 jul. 2022.

PORTILLA, M. Desarrollo y evaluación de una dieta artificial para la cría masiva de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). **Revista Cenicafé**, Chinchiná, v.50, p.24–38, 1999. Disponível em: <https://biblioteca.cenicafe.org/handle/10778/4166>. Acesso em: 31 jul. 2022.

RAMOS, J. B. *et al.* Quantification of cercosporin from coffee leaves infected by *Cercospora coffeicola*. **Australasian Plant Pathology**, [s. l.], v. 51, n. 4, p. 429-432, 2022. DOI <https://doi.org/10.1007/s13313-022-00868-7>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13313-022-00868-7>. Acesso em: 07 out. 2022.

RICCI, M. S. F.; ARAÚJO, M. C. F.; FRANCH, C. M. C. **Cultivo orgânico do café: recomendações técnicas. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica**, 2002. 101p. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/622689>. Acesso em: 31 jul. 2022.

RINCÓN, F. C. **Fatores que afetam a eficiência de parasitoides: o caso dos parasitoides da broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera, Scolytidae)**. 2001. Tese (Doutorado em Entomologia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001. Disponível em: <http://www.sbicafe.ufv.br/handle/123456789/400>. Acesso em: 29 jul. 2022.

ROCHA, E. S. *et al.* Influência de diferentes concentrações de pectina e polpa cítrica no crescimento de fungos entomopatogênicos. In: 27 Congresso de Iniciação Científica e 12

Congresso de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação da UFSCar, 2021, Araras. **Anais do 27 Congresso de Iniciação Científica e 12 Congresso de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação da UFSCar**, 2021. p. 1p. Disponível em: <http://www.copicevento.ufscar.br/index.php/ictufscar2020/ict2020/paper/view/8965>. Acesso em: 31 jul. 2022.

RODRIGUES, A. S. B. *et al.* Worldwide population structure of the coffee rust fungus *Hemileia vastatrix* is strongly shaped by local adaptation and breeding history. **Phytopathology**, [s. l.], v. 112, n. 9, p. 1998-2011, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-21-0376-R>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PHYTO-09-21-0376-R>. Acesso em: 07 out. 2022.

RODRÍGUEZ, D. *et al.* A coffee agroecosystem model: III. Parasitoids of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*). **Ecological Modelling**, [s. l.], v. 363, p. 96-110, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2017.08.008>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304380017300200>. Acesso em: 11 out. 2022.

RUIZ, L. *et al.*, Ciclo de vida de *Hypothenemus hampei* en dos dikfas melúcidas. **Cenicafé**, v. 47, n. 2, pág. 77-84, 1996. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Alex-Bustillo/publication/274835746\\_CICLO\\_DE\\_VIDA\\_DE\\_Hypotbenemus\\_hampe\\_i\\_EN\\_DOS\\_DIETAS\\_MERIDICAS/links/552acaee0cf2e089a3aa1047/CICLO-DE-VIDA-DE-Hypotbenemus-hampe-i-EN-DOS-DIETAS-MERIDICAS.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Alex-Bustillo/publication/274835746_CICLO_DE_VIDA_DE_Hypotbenemus_hampe_i_EN_DOS_DIETAS_MERIDICAS/links/552acaee0cf2e089a3aa1047/CICLO-DE-VIDA-DE-Hypotbenemus-hampe-i-EN-DOS-DIETAS-MERIDICAS.pdf). Acesso em: 31 jul. 2022.

SAMSUDIN, S. *et al.* Kemampuan blastospora *Paecilomyces fumosoroseus*, *Metarhizium anisopliae* dan *Lecanicillium decanii* dalam menginfeksi kumbang *Hypothenemus hampei*. **Jurnal Tanaman Industri Dan Penyegar**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 179-188, 2020. DOI: [dx.doi.org/10.21082/jtidp.v7n3.2020.p179-188](https://doi.org/10.21082/jtidp.v7n3.2020.p179-188). Disponível em: <http://repository.pertanian.go.id/handle/123456789/13664>. Acesso em: 13 out. 2022.

SOUZA, J. C. *et al.* **Cafeicultor: saiba como monitorar e controlar a broca-do-café com eficiência**. Belo Horizonte: **Epamig**, 2013. 3p. (Epamig. Circular técnica,178).

SOUZA, S. M. C. **O café (*Coffea arabica* L.) na região Sul de Minas Gerais: relação da qualidade com fatores ambientais, estruturais e tecnológicos**. 1996. Tese (Doutorado em Fitotecnia), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1996. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/handle/1/35931>. Acesso em: 29 jul. 2022.

TAMAI, M. A. *et al.* Toxicidade de produtos fitossanitários para *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 3, p. 89-96, set. 2002. Disponível em: [http://www.biologico.agricultura.sp.gov.br/uploads/docs/arq/V69\\_3/Tamai1.pdf](http://www.biologico.agricultura.sp.gov.br/uploads/docs/arq/V69_3/Tamai1.pdf). Acesso em: 29 jul. 2022.

VALICENTE, F. H. Controle biológico de pragas com entomopatógenos. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 30, n. 251, p. 48-55, jul./ago. 2009. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/574316>.

VEGA, F. E.; JACKSON, M. A.; MCGUIRE, M. R. Germination of conidia and blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* on the cuticle of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*.

**Mycopathologia**, [s.l.], v. 147, n. 1, p. 33-35, 1999. DOI 10.1023/a:1007011801491. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16308757/>. Acesso em: 29 jul. 2022.

VEGA, F. E.; KRAMER, M.; JARAMILLO, J. Increasing coffee berry borer (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) female density in artificial diet decreases fecundity. **Journal of Economic Entomology**, [s.l.], v. 104, n. 1, p. 87-93, 1 fev. 2011. DOI 10.1603/ec10353. Disponível em: <https://academic.oup.com/jee/article/104/1/87/2199558>. Acesso em: 29 jul. 2022.

VELOZO, S. G. M. **Identificação, caracterização e avaliação da patogenicidade de diferentes isolados de *Fusarium* spp. para o controle de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae)**. 2015. 59 f. Dissertação (mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2015. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/123241>. Acesso em: 13 out. 2022.

VILLACORTA, A. Dieta merídica para criação de sucessivas gerações de *Hypothenemus hampei* Ferrari 1867 (Coleoptera: Scolytidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 14, p. 315-319, 1985. Disponível em: [http://www.seb.org.br/admin/files/anais2/ANO%201985%20VOLUME%2014-N%2002/1985\\_V14\\_N2\\_A16.pdf](http://www.seb.org.br/admin/files/anais2/ANO%201985%20VOLUME%2014-N%2002/1985_V14_N2_A16.pdf). Acesso em: 31 jul. 2022.

VILLACORTA, A.; BARRERA, J. F. Nova dieta merídica para criação de *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 22, n. 2, p. 405-409, 31 ago. 1993. Disponível em: <https://anais.seb.org.br/index.php/aseb/article/view/867/863>. Acesso em: 31 jul. 2022.

WEGBE, K. *et al.* 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**, [s. l.], v. 96, n. 5, pág. 1473-1478, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1093/jee/96.5.1473>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jee/article/96/5/1473/2217859>. Acesso em: 23 out. 2022).

ZIMMERMANN, G. The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. **Biocontrol Science And Technology**, [s.l.], v. 18, n. 9, p. 865-901, dez. 2008. DOI 10.1080/09583150802471812. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09583150802471812>. Acesso em: 29 jul. 2022.

## **CAPÍTULO 1**

### **MANUTENÇÃO E CRIAÇÃO MASSAL DA BROCA-DO-CAFÉ EM NOVAS DIETAS ARTIFICIAIS**

## RESUMO

FERREIRA, JULIANA SILVA. Manutenção e criação massal da broca-do-café em novas dietas artificiais. 2022. 83 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Produção Vegetal) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2022.

Para estudos da biologia e de possíveis métodos de controle da broca-do-café, faz-se necessário um método de criação massal em laboratório que permita obtenção de insetos em quantidade suficiente e em qualquer época do ano. Para isso, é importante que se conheçam técnicas de criação que permitam a produção de insetos de qualidade e de baixo custo. Dessa forma, objetivou-se neste trabalho estabelecer uma metodologia para criação massal e manutenção da broca-do-café em dietas artificiais em laboratório. Para iniciar a criação, frutos brocados da cultivar Catuaí 144 foram coletados no campo e colocados em recipiente para coleta dos insetos. Após isso, as brocas-do-café foram transferidas para dieta artificial de Portilla (1999) com modificações em ambiente climatizado. Quando atingido um número suficiente de fêmeas adultas avaliou-se o desempenho de quatro dietas artificiais, duas de Portilla (1999) com modificações (dietas 1 e 2) e duas de Villacorta e Barrera (1993) com modificações (dietas 3 e 4). Essas alterações nas dietas foram realizadas com objetivo de simplificá-las, retirando ou substituindo alguns de seus componentes. Em cada parcela, 10 fêmeas adultas foram colocadas em potes plásticos contendo cada dieta e incubados em ambiente climatizado, totalizando quatro tratamentos com oito repetições em delineamento inteiramente casualizado. Após 60 e 80 dias foram quantificados os indivíduos obtidos. Obtendo-se uma média de 246 e 376; 237 e 293; 488 e 622; 413 e 644 indivíduos totais nas dietas 1, 2, 3 e 4, respectivamente. As dietas 3 e 4 de Villacorta e Barrera (1993) modificada foram superiores estatisticamente no número de indivíduos de *H. hampei*. Assim, conclui-se que é possível a criação massal e manutenção de *H. hampei* tanto nas dietas artificiais modificadas de Portilla (1999) quanto de Villacorta e Barrera (1993), sendo que nesta última é obtido maior número de indivíduos.

**Palavras-chave:** bioensaio, *Coffea arabica*, criação de insetos, *Hypothenemus hampei*.

## ABSTRACT

FERREIRA, JULIANA SILVA. Maintenance and mass rearing of the coffee berry borer in new artificial diets. 2022. 83 f. Dissertation (Master in Agronomy / Vegetables Production) – Federal University of Uberlandia, Uberlândia, 2022.

In order to study the biology and possible methods of controlling the coffee berry borer, it is necessary to have a mass rearing method in the laboratory that allows obtaining insects in sufficient quantity and at any time of the year. For this, knowledge of rearing techniques that allow the production of insects in quantity and quality is necessary. Thus, the objective was to establish mass rearing on an artificial diet and to compare diets that allow the rearing of a greater number of individuals. To start rearing, coffee berries bored of the Catuaí 144 cultivar were collected in the field and placed in traps to collect insects. After that, the coffee berry borer was transferred to the artificial diet of Portilla (1999) with modifications in an air-conditioned environment. When a sufficient number of adult females was obtained, the performance of four artificial diets was evaluated, two by Portilla (1999) with modifications (diets 1 and 2) and two by Villacorta and Barrera (1993) with modifications (diets 3 and 4). Modifications in the diets were carried out with the aim of simplifying them, removing or replacing their components. In each plot, 10 adult females were placed in plastic pots containing each diet and incubated in an air-conditioned environment, totaling four treatments with eight replications in a completely randomized design. After 60 and 80 days, the individuals obtained were quantified. After 60 and 80 days of incubation, an average of 246 and 376; 237 and 293; 413 was obtained of total individuals in diets 1, 2, 3 and 4, respectively. The modified Villacorta and Barrera (1993) diets 3 and 4 were statistically superior in the number of *H. hampei* individuals. In this way, it was possible to carry out the mass rearing of the coffee borer in the modified diets.

**Key words:** bioassay, *Coffea arabica*, *Hypothenemus hampei*, insect rearing



## 1. INTRODUÇÃO

Para estudos da biologia e de possíveis métodos de controle da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae), é necessário que seja desenvolvido um método de criação massal desse inseto que permita obtenção de indivíduos em quantidade suficiente para testes, em qualquer época do ano (GIRALDO, 2009). Além disso, é fundamental o domínio de técnicas de criação que permitam a produção de insetos com qualidade. Apesar da importância dessa praga, as técnicas de criação atuais apresentam falhas que dificultam a produção massal da broca-do-café (CELESTINO *et al.*, 2016).

A criação da broca-do-café em frutos ou grãos é dificultada por não serem disponíveis durante todo o ano, já que a colheita é anual. Os frutos e grãos beneficiados podem ser armazenados resfriados, no entanto, quando utilizados podem perder rapidamente a umidade prejudicando o desenvolvimento dos estádios imaturos da broca. Além disso, a criação massal de *H. hampei* em frutos ou pergaminhos de café é dificultada pelo aparecimento de fungos saprófitas como *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. e o difícil manuseio dos insetos que permanecem dentro dos pergaminhos café.

Hirose e Neves (2002) desenvolveram um método de criação massal em frutos de café em que a sanidade dos frutos recém-infestados deve ser verificada periodicamente, além do controle manual para manutenção da umidade borrifando-se água. De acordo com os estudos de Celestino *et al.* (2016), a criação da broca-do-café pode ser realizada em café robusta (*C. canephora*) em coco, sem a necessidade de qualquer processo de assepsia, podendo ser armazenado em freezer a -20°C para ser utilizado durante a entressafra. No entanto, quando utilizados podem perder rapidamente a umidade prejudicando o desenvolvimento dos estádios imaturos da broca (BENASSI; BENASSI, 2000).

Diante das dificuldades enfrentadas é importante realizar a criação em dietas artificiais em laboratório de fácil preparo e com ingredientes acessíveis. Jaramillo e Parra (2018) testaram o desenvolvimento de *H. hampei* na dieta de Portilla (1999) modificada, verificando que a dieta modificada não alterou o desenvolvimento da broca em relação à dieta natural. O tempo médio de ovo-adulto de *H. hampei* foi de 24,1 dias e a razão sexual 0,82. De acordo com os autores a dieta é comparável à dieta natural, além de ser de baixo custo e fácil preparo.

A criação da broca-do-café em dieta artificial é importante para realização de testes em laboratório, para que se obtenha um número de insetos suficientes para todos os tratamentos e para que a idade dos insetos seja mais próxima. Nas metodologias encontradas não são descritos alguns detalhes importantes para a criação da broca-do-café neste tipo de dieta, como manutenção da umidade relativa externa, umidade relativa da dieta, descanso da dieta para dissipação inicial dos conservantes, além do uso de um recipiente adequado que facilite a manipulação dos insetos. Portanto, objetivou-se neste trabalho estabelecer uma metodologia para criação massal e manutenção da broca-do-café em dietas artificiais em laboratório.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Estabelecimento da criação massal de *Hypothenemus hampei***

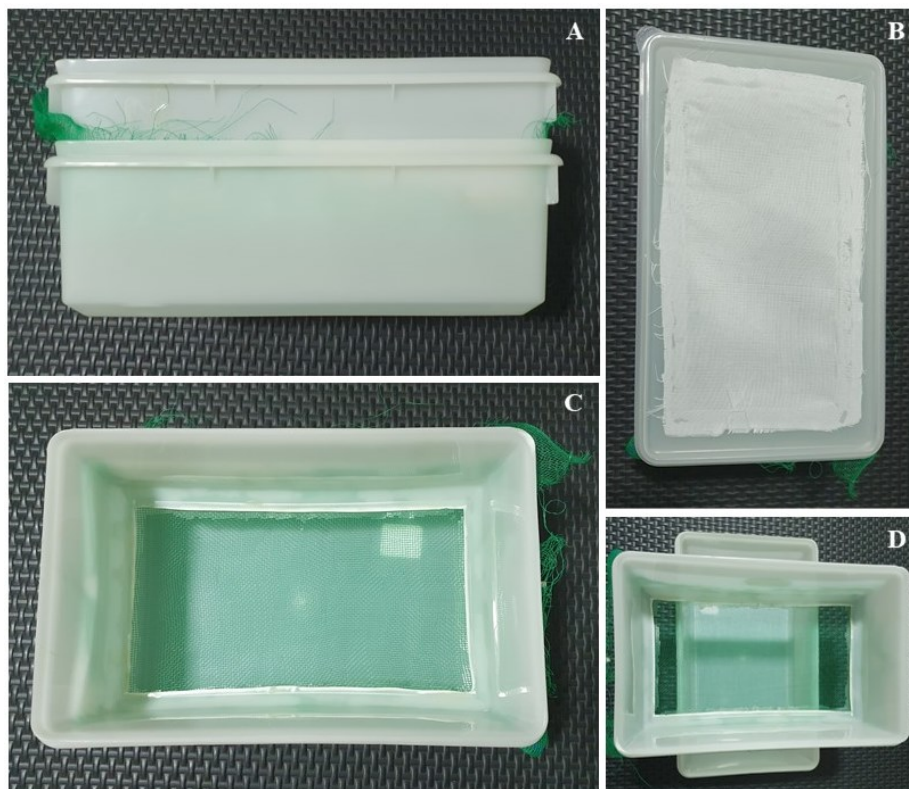
O experimento foi conduzido na empresa Nooa Ciência e Tecnologia Agrícola LTDA, localizada na zona rural do município de Patos de Minas, MG, no período de março de 2021 a julho de 2022.

#### **2.1.1. Obtenção da população inicial**

Frutos brocados de café arábica cultivar Catuaí 144 foram coletados em lavoura comercial sem histórico de aplicação recente de inseticidas (seis meses). Para minimizar contaminações, os frutos foram desinfestados superficialmente por meio da imersão em álcool 70° INPM por um minuto, depois em hipoclorito de sódio (NaClO) 5% por três minutos e por último lavados em água corrente. Finalmente, para eliminar o excesso de umidade eles foram secos com papel toalha e deixados na sombra por 24 h.

Decorrido esse tempo, os frutos foram transferidos para recipientes de coleta com o objetivo de facilitar a coleta da broca-do-café. Os coletores foram confeccionados cortando-se o fundo de um recipiente plástico retangular de 3,5 L (27,5 x 17,0 x 9,5 cm) e substituindo-o por tela mosquiteiro fixada com cola de contato. Outro recipiente de mesma dimensão foi colocado por baixo para recolher os insetos e parte da tampa foi cortada e substituída por tecido *voil* fixado com cola de contato para facilitar trocas gasosas (Figura 1).

**Figura 1.** Recipiente de coleta de broca-do-café. (A) Vista lateral da armadilha, (B) Tampa cortada com tecido *voil*, (C) Vista superior com o fundo encaixado e (D) Vista superior com fundo desencaixado.



O volume de frutos colocados foi de 1,75 L, que correspondeu a metade da capacidade do recipiente. A cada três dias, as brocas retidas no fundo foram transferidas para dieta artificial, com auxílio de pincel nº 00. Os recipientes coletores foram mantidos em sala com temperatura de  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  regulada por aquecedor e resfriador de ar e umidade de  $70 \pm 15\%$  regulada pelo acionamento periódico de um umidificador de ar e fotofase de 12 horas.

### 2.1.2. Criação da broca-do-café

Para criação da broca-do-café foi utilizada a dieta de Portilla (1999) modificada, denominada como “Dieta 1” (Tabela 1). Os grãos de café beneficiados foram moídos em moinho Centrífugo Simples (Modelo Vieira MCS 280 - 05 cv) com peneira de 0,2 mm. Para o preparo da dieta, primeiramente, o café cru e o ágar misturado à água foram esterilizados em recipientes separados, por 30 minutos. Quando morno, antes da solidificação do ágar, os ingredientes esterilizados e os demais ingredientes sólidos foram homogeneizados em

liquidificador por um minuto, e os ingredientes líquidos foram então acrescentados por último e a dieta homogeneizada por mais um minuto no liquidificador. A dieta foi vertida em recipiente plástico (16 cm de diâmetro x 8,8 cm altura), previamente exposta à luz UV por 20 minutos, e seca em estufa à 55°C por cerca de 8 horas (Figura 2 A).

**Tabela 1.** Composição de duas dietas artificiais propostas por Portilla (1999) e Villacorta e Barrera (1993) e quatro dietas modificadas utilizadas nos bioensaios.

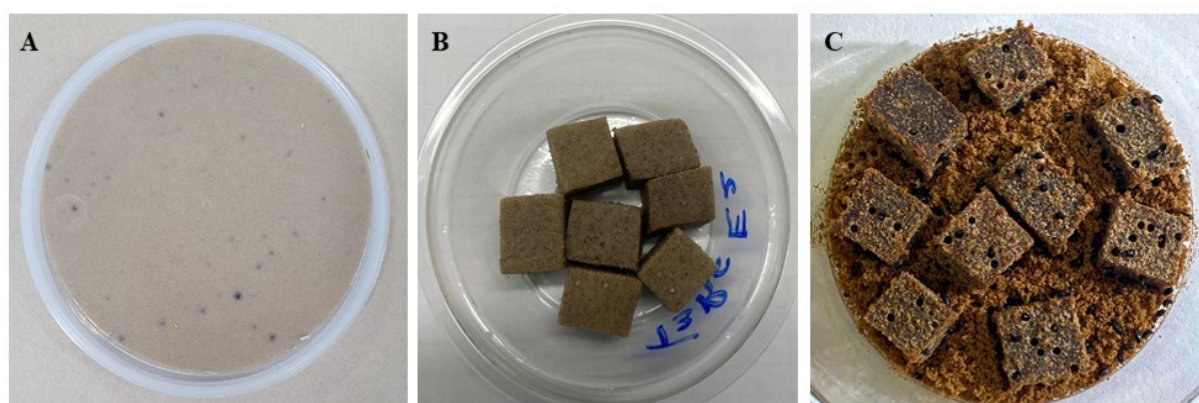
Ingredientes (peso/volume)	Quantidade					
	Portilla (1999)	Dieta 1	Dieta 2	Villacorta e Barrera (1993)	Dieta 3	Dieta 4
Água (L)	1	1	1	0,7	1	1
Ágar (g)	10	13	13	27	18	18
Café cru moído (g)	150	180	100	100	154	154
Café torrado moído (g)	-	-	80	-	-	-
Sacarose (g)	10	10	10	14	9	9
Caseína (g)	15	15	15	20	15	15
Levedo <i>Candida utilis</i> (g)	15	-	-	-	-	-
Levedo de torula (g)	-	-	-	20	-	-
Levedo de cerveja (g)	-	15	15	-	15	15
Etanol (mL)	10	10	10	10	16	16
Ácido benzoico (g)	1	1	1	-	-	1
Vitaminas de Vanderzant (g)	0,5	0,5	0,5	-	-	0,5
Sais de Wesson (g)	0,8	0,8	0,8	2	-	0,8
Formaldeído 37% (mL)	1	3,2	3,2	2	3,2	3,2
Benomil (g)	1,5	-	-	-	-	-
Nipagim (g)	-	1,6	1,6	1	1,6	1,6
Benzoato de Na (g)	-	-	-	0,8	-	-
Sorbato de Potássio (g)	-	-	-	-	1,6	1,6

Os grãos de café beneficiados foram moídos em moinho Centrífugo Simples (Modelo Vieira MCS 280 - 05 cv) com peneira de 0,2 mm. Para o preparo da dieta, primeiramente, o café cru e o ágar misturado à água foram esterilizados em recipientes separados, por 30 minutos. Quando morno, antes da solidificação do ágar, os ingredientes esterilizados e os demais ingredientes sólidos foram homogeneizados em liquidificador por um minuto, e os ingredientes líquidos foram então acrescentados por último e a dieta homogeneizada por mais um minuto no liquidificador. A dieta foi vertida em recipiente plástico (16 cm de diâmetro x 8,8 cm altura), previamente exposta à luz UV por 20 minutos, e seca em estufa à 55°C por cerca de 8 horas (Figura 2 A).

Durante esse período, a umidade da dieta foi verificada periodicamente em analisador de umidade Gehaka IV3100 até atingir cerca de 63 a 68% de umidade, dando fim ao processo de secagem. Posteriormente, a dieta foi cortada em cubos com cerca de 1 cm<sup>3</sup> (ou um centímetro de aresta) e a umidade foi verificada novamente. Quando os cubos do meio da dieta não atingiram a umidade adequada eles foram colocados na estufa à 55 °C por mais 30 minutos. Posteriormente os cubos de dieta foram expostos a luz UV em câmara de fluxo laminar por 20 minutos e acondicionadas no mesmo recipiente plástico com tampa em temperatura ambiente. Após, no mínimo, cinco dias de descanso, para dissipação prévia dos conservantes, 7 a 10 cubos de dieta (aprox. 10 g) foram colocados em potes plásticos com 30 mL de capacidade com tampa (Figura 2 B). Não houve reposição de dieta durante o período de criação da broca-do-café.

Em cada pote plástico com dieta foram colocadas 20 fêmeas adultas, e depois incubados em sala com temperatura de 25 ± 3 °C e umidade de 70 ± 15% no escuro. Após 60 dias os insetos obtidos nesse processo foram repicados colocando-se 20 fêmeas adultas para potes contendo dieta para manutenção da criação (Figura 2 C).

**Figura 2.** (A) Dieta solidificada, (B) Pote plástico com cubos de dieta, (C) Brocas-do-café em dieta artificial após 60 dias de incubação.



## 2.2. Avaliação de dietas artificiais para criação da broca-do-café

Foram preparadas quatro dietas artificiais com composições distintas (Tabela 1), conforme descrito no item 2.1.2. O ingrediente levedo de torula foi substituído em todas as dietas por levedo de cerveja por ter maior disponibilidade comercial. Já as quantidades de ágar e café das dietas 1 e 2, Portilla (1999) modificada, foram alteradas conforme a textura final da dieta. a umidade final também foi alterada de ambas as dietas. As dietas 1 e 2, Portilla

(1999) modificada, são dietas originalmente enriquecidas nutricionalmente por possuírem sais e vitaminas, já a dieta 3, Villacorta e Barrera (1993) modificada, é uma dieta mais simples sem acréscimo desses ingredientes, e a dieta 4 é a mesma dieta de Villacorta e Barrera (1993) modificada acrescida de sais e vitaminas. A marca comercial dos ingredientes e custo de cada dieta foram especificados na Tabela 2, sendo a dieta 3 com menor valor (R\$).

**Tabela 2.** Ingredientes, marca comercial e custo de cada dieta.

Ingredientes	Marca comercial	Custo (R\$/L)			
		Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4
Ágar	Dinâmica	6,02	6,02	8,53	8,53
Café cru moído	Catuaí 144	3,99	2,22	3,41	3,41
Café torrado moído	Bençavó	-	3,18	-	-
Sacarose	Delta	0,04	0,04	0,04	0,04
Caseína	Synth	6,66	6,66	6,84	6,84
Levedo de cerveja	Quimicenter	0,30	0,30	0,31	0,31
Etanol	Dinâmica	0,20	0,20	0,31	0,31
Ácido benzoico	Synth	0,10	0,10	-	0,10
Vitaminas de Vanderzant	Sigma-Aldrich	2,28	2,28	-	2,28
Sais de Wesson	Scharlau	2,30	2,30	-	2,30
Formaldeído 37%	Dinâmica	0,04	0,04	0,04	0,04
Nipagin	Dinâmica	0,25	0,25	0,25	0,25
Sorbato de Potássio	Synth	-	-	0,10	0,10
<b>Total (R\$):</b>		<b>22,18</b>	<b>23,59</b>	<b>19,83</b>	<b>24,51</b>

Para avaliação do número de descendentes da broca-do-café. Posteriormente, 10 g de dieta em cubos e 10 brocas-do-café adultas foram colocadas em potes plásticos de 30 mL com tampa. As fêmeas adultas foram coletadas depois de 30 dias de incubação e misturadas antes de sua distribuição em cada experimento. Decorridos 60 e 80 dias de incubação em ambiente climatizado com temperatura de  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  e umidade relativa de ar  $70 \pm 15\%$  no escuro, procedeu-se a quantificação dos indivíduos obtidos, separando-os por estádios ovos, larvas, pupas e adultos, sendo os últimos quantificados pelo sexo, machos ou fêmeas, além do total de indivíduos (fêmeas, machos, ovos, larvas e pupas). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e seis repetições. Cada pote plástico com 10 brocas adultas constituiu uma parcela.

Os valores atípicos (*outliers*) foram identificados com a plotagem dos resíduos estudantizados externamente (RStudent) versus valores preditos (variável Y). A partir do RStudent, valores que se encontravam fora do intervalo -2 a 2 foram considerados *outliers* e

suas observações correspondentes foram removidas do banco de dados. Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk; a homocedasticidade pelo teste de Hartley; e a independência dos resíduos por análise gráfica. Posteriormente, sendo atendidos os pressupostos, os dados foram submetidos à análise de variância por meio do teste F ( $p \leq 0,05$ ). Constatando-se significância estatística ao nível de 5%, os efeitos dos tratamentos de todas as amostras foram comparados entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). A análise estatística foi realizada com auxílio do software Statistica 7.0 (STATSOFT, 2007).

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

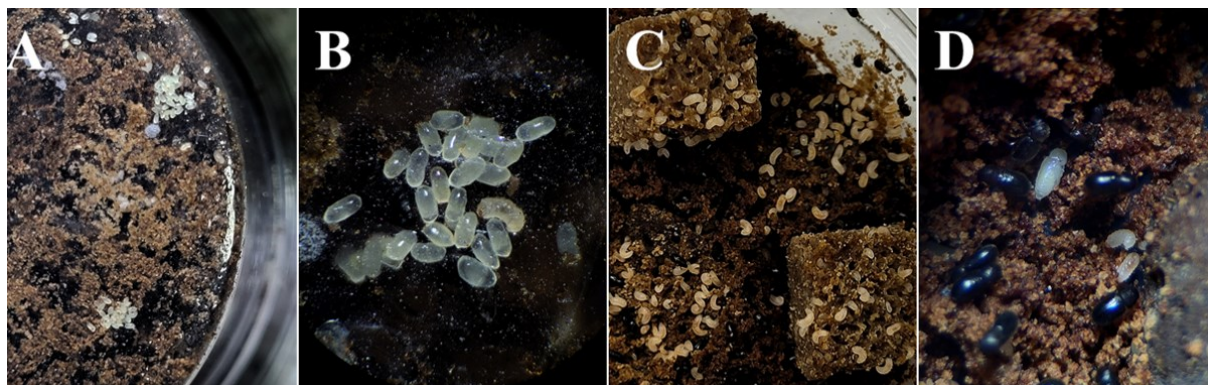
#### **3.1. Criação e manutenção de *H. hampei* em dieta artificial**

Na dieta 1 (Portilla 1999 modificada) e nas condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) e umidade ( $70 \pm 15\%$ ) utilizadas para estabelecimento da criação de *H. hampei* o tempo médio de cada estágio de vida foi: 12 dias para eclosão das larvas (Figura 3 C), 16 dias para formação de pupa e 8 dias para surgimento do adulto (Figura 3 D), totalizando cerca de 36 dias. A longevidade das fêmeas na dieta utilizada para manutenção da criação chegou a 190 dias e dos machos 45 dias. No entanto, um outro trabalho deve ser realizado para avaliação desses parâmetros.

Tanto para as brocas-do-café coletadas no campo que foram submetidas à dieta artificial, quanto para as provenientes dessa dieta, foi observado um tempo mínimo de sete dias para oviposição, podendo estender-se até cerca de 20 dias, dependendo da umidade da dieta. A oviposição aconteceu externamente à dieta, mais próxima à parede dos potes plásticos, sendo separadas ou agrupadas (Figura 3 A, B). Portilla (1999), relatou que o período de pré-oviposição na dieta Cenibroca foi de 3-10 dias e a oviposição realizada na superfície da dieta. Portilla e Streett (2006) mantiveram a criação da broca-do-café na dieta Cenibroca modificada por 70 gerações contínuas, sem afetar a atividade, fecundidade, peso e tamanho dos insetos.



**Figura 3.** Fases de desenvolvimento de *Hypothenemus hampei* em dieta artificial. (A) Massa de ovos externa à dieta, (B) Massa de ovos, (C) Larvas, (D) Pupas e adultos.



Uma das dificuldades encontradas para a criação massal da broca-do-café foi selecionar recipientes adequados, já que os insetos perfuram plástico com facilidade. Sendo assim, optou-se por recipientes de plástico mais reforçados como o utilizado no trabalho (Figura 2 B). Tubos de ensaio de vidro dificultam o manuseio dos insetos, no entanto, pequenos potes de vidro com tampa podem ser utilizados para criação e manutenção desses insetos em dieta artificial. Pedacos grandes de dieta também atrapalham no manuseio dos insetos, pois ao adentrarem a dieta, tornam-se difíceis de recuperar. Assim, blocos pequenos, com cerca de um centímetro de aresta, além de auxiliarem no manejo do inseto, ajudaram na uniformização da umidade.

Villacorta (1985) manteve mais de 15 gerações de *H. hampei* em uma dieta artificial à base de semente de algodão e relata a dificuldade da criação em tubos de ensaio. De acordo com Brun, Gaudichon e Wigley (1993), o número de descendentes de broca-do-café obtidos em seu trabalho de criação em dieta artificial provavelmente foi limitado pelo tamanho dos recipientes plásticos utilizados (fechados com rolhas), que restringiram o deslocamento das fêmeas para novos locais para ovipositar, durante os 70 dias de avaliação.

Outro ponto chave para a criação de *H. hampei* foi a umidade da dieta artificial. Dietas com umidade acima de 70% ou abaixo de 60% praticamente inviabilizam a multiplicação dos insetos. Cabe destacar que a umidade do ambiente de criação também é muito importante para evitar ressecamento rápido e, conseqüentemente, reposições ou trocas mais frequentes. Outro aspecto importante reside na necessidade de se deixar a dieta após o preparo em repouso para dissipação de parte dos conservantes, pois parte das brocas provenientes do campo morreram cerca de 24 horas após o contato com a dieta recém preparada.



A dieta de Portilla (1999) (Cenibroca), de acordo com a autora, é de fácil preparo por conter poucos ingredientes, possui boas características nutricionais e físicas, mantém a umidade por mais tempo e apresenta baixo índice de contaminação. Jaramillo (2016) testou criação e manutenção da broca-do-café na dieta de Portilla (1999) e de acordo com os resultados obtidos essa dieta é comparável a dieta natural, café com pergaminho, no que diz respeito a duração média das fases de ovo, larva, pré-pupa, ciclo total (ovo-adulto) e razão sexual.

### 3.2. Avaliação de dietas artificiais para criação de *H. hampei*

No experimento com 60 dias de incubação de *H. hampei* em diferentes dietas artificiais, houve efeito significativo para as variáveis número de fêmeas, machos, ovos, pupas e total de indivíduos (Tabela 3). As dietas 3 e 4 obtiveram 126 e 84 fêmeas, respectivamente, a mais em relação a dieta 1 e 125 e 83 fêmeas em relação a dieta 2. Na variável número de machos as dietas 3 e 4 obtiveram 10 e 11 machos a mais que a dieta 1 e 8 e 9 machos a mais que a dieta 2. A dieta 3, obteve 13 pupas a mais que a dieta 1 e 2. Em relação ao número de ovos, as dietas 3 e 4 obtiveram 85 e 55 ovos a mais que a dieta 1 e 101 e 71 ovos a mais que a dieta 2. Por outro lado, não houve diferença significativa entre as dietas para número de larvas. Na variável número total de indivíduos, a dieta 3 apresentou incremento de 242, 251 e 75 indivíduos em relação as dietas 1, 2 e 4, respectivamente, valores equivalentes a 99, 107 e 18% (Tabela 3). Nesse ensaio, o número total de descendentes por broca após 60 dias de incubação nas dietas 1, 2, 3 e 4 foi de 24,6; 23,7; 48,8 e 41,3 indivíduos, respectivamente.

**Tabela 3.** Número de descendentes de broca-do-café submetidas a diferentes dietas artificiais, após 60 dias.

Tratamento	Adulto		Pupas	Larvas	Ovos	Total
	Fêmea	Macho				
1 Dieta 1	51 b <sup>1</sup>	7 b	30 b	96 ns	62 b	246 c
2 Dieta 2	52 b	9 b	30 b	100	46 b	237c
3 Dieta 3	177 a	17 a	43 a	104	147 a	488 a
4 Dieta 4	135 a	18 a	40 ab	103	117 a	413 b
CV (%)	12,5	36,9	23,8	19,4	9,3	5,6

<sup>1</sup> médias seguidas de letras iguais na coluna, não diferem entre si, através do teste de Tukey a 5% de probabilidade. ns: não significativo ao teste de F.

No outro experimento, com 80 dias de incubação foi observado efeito semelhante ao ensaio com 60 dias. Novamente, as dietas 3 e 4 se sobressaíram na maior parte dos parâmetros avaliados. Além disso, houve efeito significativo para todas as variáveis analisadas como número de fêmeas, machos, ovos, larvas, pupas e total de indivíduos (Tabela 4).

A dieta 4 obteve 129 e 131 fêmeas, respectivamente, a mais em relação a dieta 1 e 2. Quanto ao número de machos, as dietas 3 e 4 obtiveram 12 e 13 machos a mais que a dieta 2. A dieta 4 obteve 29 pupas a mais que a dieta 1 e 38 pupas a mais que as dietas 2 e 3. Quanto ao número de larvas, a dieta 4 obteve 83 e 106 larvas a mais que as dietas 2 e 3. Em relação ao número de ovos, a dieta 3 obteve 268 e 182 ovos a mais que as dietas 2 e 4. E por fim, na variável número total de indivíduos, as dietas 3 e 4 apresentaram incremento de 246 e 268 indivíduos em relação a dieta 1 valores equivalentes a 65 e 71% de incremento e 329 e 351 indivíduos em relação a dieta 2 valores equivalentes a 112 e 120% de incremento. Nesse experimento, o número total de descendentes por broca após 80 dias de incubação nas dietas 1, 2, 3 e 4 foi de 38; 29; 64 e 66 indivíduos, respectivamente. Durante a avaliação do experimento foi notado que as dietas 3 e 4 retêm mais umidade em relação às dietas 1 e 2 o que pode ter contribuído com o resultado.

**Tabela 4.** Número de descendentes de broca-do-café submetidas a diferentes dietas artificiais, após 80 dias.

Tratamento	Adulto		Pupas	Larvas	Ovos	Total
	Fêmea	Macho				
1 Dieta 1	148 b <sup>1</sup>	16 ab	31 b	110 ab	71 bc	376 b
2 Dieta 2	146 b	9 b	22 b	81 b	35 c	293 b
3 Dieta 3	218 ab	21 a	22 b	58 b	303 a	622 a
4 Dieta 4	277 a	22 a	60 a	164 a	121 b	644 a
CV (%)	37,0	35,7	46,7	45,9	18,5	20,7

<sup>1</sup> médias seguidas de letras iguais, não diferem entre si, através do teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na literatura são encontrados diversos trabalhos com diferentes técnicas de criação em dieta natural e artificial. Celestino *et al.* (2016) testou a criação da broca-do-café em dieta natural, onde os tratamentos foram café arábica em coco, arábica com pergaminho e robusta em coco submetidos ou não à assepsia e armazenamento. A melhor técnica avaliada foi café robusta em coco, sem assepsia, podendo ser armazenado em freezer a -20°C para ser utilizado durante a entressafra. Nesse tratamento o número de descendentes totais foi de 464 e

387 indivíduos com e sem armazenamento, respectivamente. Nesta pesquisa o número máximo de descendentes foi de cerca de 11 indivíduos por broca após 70 dias de infestação. Por outro lado, de acordo com os estudos realizados por Benassi (2000), a média de descendentes de *H. hampei* foi de 22 indivíduos, com número variando de 17 a 36 indivíduos/fêmea em frutos de *C. canephora* após 28 dias após de infestação.

Comparando-se os resultados obtidos em trabalhos citados de criação de *H. hampei* em dieta natural, o número de indivíduos gerados nas dietas artificiais foi maior. As gerações de *H. hampei* em dieta artificial são superpostas já que as fêmeas que nascem são fecundadas e logo iniciam a oviposição. Dessa forma, em todos os momentos encontraram-se indivíduos em diferentes estágios de desenvolvimento (ovos, larvas, pré-pupas, pupas e adultos), enquanto a dieta apresentar condições nutricionais e de umidade necessárias para o desenvolvimento da broca-do-café (VILLACORTA; PRELA; POSSAGNOLO, 2000).

Esses autores testaram a criação de *H. hampei* na dieta de Villacorta e Barrera (1993) modificando-se o ágar bacteriológico para ágar industrial a fim de se obter menor custo (redução de R\$ 2,95). Os autores obtiveram uma média de 153 indivíduos totais na dieta testada após 66 dias de incubação. De acordo com os autores, o experimento foi realizado com brocas-do-café coletadas em campo e se for realizado com brocas provenientes de dieta artificial o número de adultos obtidos provavelmente será maior, pelo fato de que diferentemente da população natural coletada em campo, a população coletada em dieta possui idade e as condições climáticas e de alimento mais semelhantes.

Brun, Gaudichon e Wigley (1993) obtiveram média de 16 descendentes totais de broca-do-café após 70 dias de criação em dieta artificial (composta por: água, ágar, gérmen de trigo, sacarose, café moído, ácido ascórbico, benzoato methyl-p-hydroxy, propionato de sódio, penicilina, estreptomicina e vitaminas de Vanderzant) em condições de temperatura e umidade semelhantes as utilizadas no presente trabalho (25°C e 85%). Villacorta e Barrera (1993), em sua dieta original, obtiveram população de até 79 indivíduos de *H. hampei*. Portilla e Streeett (2006) avaliaram a fecundidade de brocas-do-café na dieta Cenibroca modificada e obtiveram o resultado de até 84,2 indivíduos por broca após 70 dias de infestação. Os dados obtidos no presente trabalho corroboram os daqueles autores, já que foram obtidos até 66 indivíduos após 80 dias de infestação da dieta.

Os dados obtidos demonstram que as dietas 3 e 4 constituíram-se nas melhores fontes nutricionais, já que se sobressaíram nos parâmetros avaliados em relação as dietas 1 e 2, sendo as mais eficientes na criação da broca-do-café. Novos estudos devem ser realizados

com essas dietas avaliando-se a longevidade dos adultos de *H. hampei* em cada uma delas, além do número de gerações obtidas ao longo do tempo.

#### **4. CONCLUSÕES**

A criação e manutenção massal de *H. hampei* nas dietas avaliadas foram realizadas com sucesso, onde as dietas de Villacorta e Barrera (1993) modificadas (1 e 2) foram as que obtiveram maior número de indivíduos.

## REFERÊNCIAS

BENASSI, V. L. R. M. Aspectos biológicos da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae) em *Coffea canephora*. In: **Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, 1., 2000, Poços de caldas, MG. Resumos expandidos. Brasília: Embrapa Café: Minasplan. v. 2. p. 1181-1184, 2000. Disponível em: <https://biblioteca.incaper.es.gov.br/digital/bitstream/item/945/1/arpectosbiologicosemcoffeacanephora.pdf>. Acesso em: 21 jul. 2022.

BENASSI, V. L. R. M.; BENASSI, A. C. Criação da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera, Scolytidae) em câmara de nevoeiro. In: **Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, I, 2000, Poços de Caldas, MG. Resumos expandidos. Brasília, DF: Embrapa Café; Minasplan, v. 2, p. 1201-1203, 2000. Disponível em: [http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/123456789/681/155537\\_Art312f.pdf?sequence=1](http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/123456789/681/155537_Art312f.pdf?sequence=1). Acesso em: 21 jul. 2022

BRUN, L. O.; GAUDICHON, V.; WIGLEY, P. J. An artificial diet for continuous rearing of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). **International Journal Of Tropical Insect Science**, Nouméa, v. 14, n. 5-6, p. 585-587, dez. 1993. DOI 10.1017/s1742758400017963. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/32976625\\_An\\_artificial\\_diet\\_for\\_continuous\\_rearing\\_of\\_the\\_coffee\\_berry\\_borer\\_Hypothenemus\\_hampe\\_i\\_Ferrari\\_Coleoptera\\_Scolytidae](https://www.researchgate.net/publication/32976625_An_artificial_diet_for_continuous_rearing_of_the_coffee_berry_borer_Hypothenemus_hampe_i_Ferrari_Coleoptera_Scolytidae). Acesso em: 21 jul. 2022.

CELESTINO, F. N. *et al.* Adaptação de técnicas de criação da broca-do-café [*Hypothenemus hampei* (Ferrari)]. **Coffee Science**, Lavras, v. 11, n. 2, p. 161 - 168, abr./jun. 2016. Disponível em: <http://www.sbicafe.ufv.br/handle/123456789/8062>. Acesso em: 23 set. 2022.

GIRALDO, A. M. L. **Normalización de la dieta artificial y evaluación de actividad insecticida contra la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari) de extractos vegetales de plantas recolectadas em la ecorregión cafetera**. 2009. Tese (Doutorado em Química) Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, 2009. Disponível em: <https://repositorio.utp.edu.co/items/df1d2f65-9dcf-4045-880b-0c047488a153>. Acesso em: 25 jul. 2022

HIROSE, E.; NEVES, P. M. O. J. Técnica para criação e manutenção da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae), em laboratório. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 161-164, mar. 2002. DOI 10.1590/s1519-566x2002000100023. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ne/a/PJSVpLZT7nhhZQYvPxcmq7c/abstract/?lang=en&format=htm>. Acesso em: 25 jul. 2022.

JARAMILLO, M. G. **Zoneamento de *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) e *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville, 1842), pragas do cafeeiro no Brasil e na Colômbia, com base nas exigências térmicas**. 2016. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2016. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11146/tde-30112016-173124/pt-br.php>. Acesso em: 25 jul. 2022.

JARAMILLO, M. G.; PARRA, J. P. Artificial diet adjustments for brazilian strain of *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Curculionidae). **Coffee Science**, [s.l.], v. 13, n. 1, p. 132-135, 15 maio 2018. DOI 10.25186/cs.v13i1.1404. Disponível em: <http://www.sbicafe.ufv.br/handle/123456789/10662>. Acesso em: 30 jul. 2022.

PORTILLA, M. Desarrollo y evaluación de una dieta artificial para la cría masiva de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). **Revista Cenicafé**, Chinchiná, v.50, p.24–38, 1999. Disponível em: <https://biblioteca.cenicafe.org/handle/10778/4166>. Acesso em: 31 jul. 2022.

PORTILLA, R. M.; STREEETT, D. Producción masiva automatizada de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) sobre la dieta artificial Cenibroca modificada. **Cenicafé**, 57 (1): 37-50. 2006. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Maribel-Portilla/publication/313421819\\_Production\\_masiva\\_automatizada\\_de\\_la\\_Broca\\_del\\_Cafe\\_Hypothenemus\\_hampe\\_i\\_Ferrari\\_Coleoptera\\_Scolytidae\\_y\\_de\\_sus\\_parasitoides\\_sobre\\_dietas\\_artificiales/links/5899e2f54585158bf6f8a1b0/Production-masiva-automatizada-de-la-Broca-del-Cafe-Hypothenemus-hampe-i-Ferrari-Coleoptera-Scolytidae-y-de-sus-parasitoides-sobre-dietas-artificiales.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Maribel-Portilla/publication/313421819_Production_masiva_automatizada_de_la_Broca_del_Cafe_Hypothenemus_hampe_i_Ferrari_Coleoptera_Scolytidae_y_de_sus_parasitoides_sobre_dietas_artificiales/links/5899e2f54585158bf6f8a1b0/Production-masiva-automatizada-de-la-Broca-del-Cafe-Hypothenemus-hampe-i-Ferrari-Coleoptera-Scolytidae-y-de-sus-parasitoides-sobre-dietas-artificiales.pdf). Acesso em: 31 jul. 2022.

STASOFT. **Statistica 7.0 for Windows**: computer program manual. Tulsa: Statsoft Inc., 2007. Disponível em: <https://statistica.software.informer.com/7.0/>. Acesso em: 31 jul. 2022.

VILLACORTA, A. Dieta meridica para criação de sucessivas gerações de *Hypothenemus hampei* Ferrari 1867 (Coleoptera: Scolytidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 14, p. 315-319, 1985. Disponível em: [http://www.seb.org.br/admin/files/anais2/ANO%201985%20VOLUME%2014-N%2002/1985\\_V14\\_N2\\_A16.pdf](http://www.seb.org.br/admin/files/anais2/ANO%201985%20VOLUME%2014-N%2002/1985_V14_N2_A16.pdf). Acesso em: 31 jul. 2022.

VILLACORTA, A.; BARRERA, J. F. Nova dieta meridica para criação de *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 22, n. 2, p. 405-409, 31 ago. 1993. Disponível em: <https://anais.seb.org.br/index.php/aseb/article/view/867/863>. Acesso em: 31 jul. 2022.

VILLACORTA, A.; PRELA, A.; POSSAGNOLO, A. F. Redução dos custos na dieta artificial para a broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) para a criação de seus inimigos naturais. In: **Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, I, 2000, Poços de Caldas, MG. Resumos expandidos. Brasília: Embrapa Café: Minasplan. v. 2, p. 1273-1275, 2000. Disponível em: <http://www.sbicafe.ufv.br/handle/123456789/713>. Acesso em: 30 jul. 2022.

## **CAPÍTULO 2**

### **FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS NO CONTROLE DA BROCA-DO-CAFÉ EM LABORATÓRIO**

## RESUMO

FERREIRA, JULIANA SILVA. Fungos entomopatogênicos no controle da broca-do-café em laboratório. 2022. 83 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Produção Vegetal) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2022.

A broca-do-café, *Hyphotenemus hampei*, é considerada uma das principais pragas da cafeicultura pois as larvas desse inseto se alimentam da semente reduzindo a produtividade e a qualidade do café, além de causar queda prematura dos frutos e facilitar a entrada de microrganismos devido ao dano físico causado. Sendo assim, é necessária a adoção de táticas de monitoramento e controle, uma vez que causa prejuízos quantitativos e qualitativos ao cafeeiro. Entre as ferramentas para reduzir a densidade populacional da broca-do-café, está o uso de fungos entomopatogênicos. O controle biológico da broca-do-café é feito principalmente por meio de produtos à base de conídios de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*. Devido à importância de prospecção de isolados de fungos entomopatogênicos para fabricação de novos produtos microbiológicos para controle da broca-do-café objetivou-se neste trabalho avaliar a eficiência de 27 isolados de fungos entomopatogênicos no controle da broca-do-café em laboratório, no intuito de ampliar o potencial de uso desses agentes biológicos de controle. Na primeira etapa, para seleção de isolados, realizou-se dois bioensaios onde as brocas foram imersas em solução ajustada na concentração de  $1 \text{ a } 3 \times 10^8$  conídios/mL de cada isolado e o tratamento controle (água esterilizada). Os tratamentos foram mantidos em ambiente climatizado e após sete dias realizada a avaliação de mortalidade e a mortalidade confirmada foi verificada após câmara úmida. Os isolados que causaram maior mortalidade e dois isolados comerciais foram selecionados para avaliação de concentração letal ( $CL_{50}$  e  $CL_{90}$ ) e tempo letal ( $TL_{50}$  e  $TL_{90}$ ). Para concentração letal as brocas-do-café foram tratadas em diferentes concentrações de conídios e depois mantidas em ambiente climatizado por sete dias para avaliação de mortalidade total e confirmada. Para tempo letal as brocas foram tratadas na concentração  $10^8$  conídios/mL dos isolados selecionados e após dois dias e a cada 24h até o oitavo dia foi verificado o número de indivíduos mortos e preparo de câmara úmida para confirmação. Dos 27 isolados avaliados, 24 apresentaram mortalidade superior ao tratamento controle e três apresentaram mortalidade superior a 85%. Nos ensaios de  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$  os isolados IBCB 353 e IBCB 364 foram mais letais à *H. hampei*. Nos ensaios de  $TL_{50}$  e  $TL_{90}$  os isolados IBCB 66 e IBCB 353 causaram letalidade em menor tempo. Os isolados NCTB 04, IBCB 353 e IBCB 364 são promissores no controle da broca-do-café.

**Palavras-chave:** bioensaio, controle biológico, fungos neotropicais, Hypocreales.



## ABSTRACT

FERREIRA, JULIANA SILVA. Effect of entomopatogenic fungi on the control of the coffee berry borer in the laboratory. 2022. 74 f. Dissertation (Master in Agronomy / Vegetables Production) – Federal University of Uberlandia, Uberlândia, 2022.

*Hyphotenemus hampei* is considered one of the main pests of coffee planting because the larvae of this insect feed on the seed, reducing the productivity and quality of the coffee, in addition to causing premature fruit drop and facilitating the entry of microorganisms due to the physical damage caused. Therefore, it requires the adoption of monitoring and control tactics, since it causes quantitative and qualitative damage to the coffee plant. Among the tools to control the coffee berry borer, there is the use of entomopathogenic fungi that can be prospected for the control of this insect. Biological control of the coffee berry borer is mainly done through products based on conidia of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Due to the importance of prospecting isolates of entomopathogenic fungi for the manufacture of new microbiological products for the control of coffee berry borer, this study aimed to evaluate the efficiency of 28 isolates of entomopathogenic fungi in the control of coffee berry borer in the laboratory. In the first step, for the selection of isolates, two bioassays were carried out where the coffee berry borer were immersed in a solution adjusted to  $10^8$  conidia/mL of each isolate and the control treatment (sterile water). The treatments were kept in an air-conditioned environment and after seven days the mortality assessment was carried out and the confirmed mortality was verified after a humid chamber. The isolates that caused the highest mortality and two commercial isolates were selected for evaluation of lethal concentration ( $LC_{50}$  and  $LC_{90}$ ) and lethal time ( $LT_{50}$  and  $LT_{90}$ ). For lethal concentration, the coffee berry borer was treated at different conidia concentrations and then kept in an air-conditioned environment for seven days to evaluate total and confirmed mortality. For lethal time, the coffee berry borer was treated at a concentration 1 of  $3 \times 10^8$  conidia/mL of the selected isolates and every 24 hours the number of dead individuals was verified and a humid chamber was prepared for confirmation. Of the 27 isolates evaluated, 25 had a mortality higher than the control treatment and three had a mortality higher than 85%. In the  $LC_{50}$  and  $LC_{90}$  assays, the isolates IBCB 353 and IBCB364 were more lethal to *H. hampei*. In the  $LT_{50}$  and  $LT_{90}$  assays, the isolates IBCB 353 and IBCB 66 caused lethality in a shorter time. The isolates IBCB 353 and IBCB 364 are promising in the control of the coffee berry borer.

**Key words:** bioassay, biological control, Hypocreales, neotropical fungi.

## 1. INTRODUÇÃO

A cultura do café, *Coffea arabica* e *C. canephora*, tem grande importância mundial, além desta bebida ser a mais consumida no mundo. Dentre as dificuldades dos cafeicultores está o controle sustentável de pragas e doenças para fornecer um produto de qualidade aos consumidores. Dentre as principais pragas existentes nessa cultura está a broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae). Esse inseto-praga exige a adoção de táticas de monitoramento e controle, uma vez que causa prejuízos quantitativos e qualitativos ao cafeeiro (JOHSON *et al.*, 2020; SOUZA, 2019).

As fêmeas adultas de *H. hampei* iniciam a injúria ao fruto de café quando perfuram a coroa e constroem uma galeria no endosperma, onde os ovos são depositados. Após a eclosão, as larvas se alimentam da semente reduzindo a produtividade (VEGA; KRAMER; JARAMILLO, 2011). Sendo assim, a intensidade das infestações ocasionadas por esse inseto causa prejuízos aos cafeicultores. Esses danos podem ser quantitativos, devido à queda prematura dos frutos e a perda de peso, em função da alimentação do inseto, ou qualitativos devido à alteração do tipo do grão de acordo com o número de defeitos e à qualidade da bebida, que pode ser alterada pela presença de microrganismos (MATIELLO, 2008).

Matiello (2008) avaliou danos quantitativos e qualitativos causados por *H. hampei* em três lavouras de café conilon naturalmente infestadas. As perdas quantitativas de massa de café em coco variaram de 0,64 a 11%, e de massa de café beneficiado foi de 0,99 a 22,73%. Os danos qualitativos foram relacionados ao número de defeitos e de tipos de café que aumentaram à medida que foi elevado o número de frutos infestados pelo inseto. Ambas as perdas e danos tiveram aumento linear, de acordo com a ampliação do nível de infestação, devido ao consumo do fruto pelas larvas e adultos da broca-do-café. Dessa forma o manejo da broca-do-café é importante para evitar perdas causadas pela infestação do inseto na lavoura.

Para controle eficaz da broca-do-café deve-se levar em consideração todos os fatores que constituem o ecossistema do cafeeiro e suas múltiplas interações. É importante conhecer a fenologia da cultura, tais como tempos de floração e idade dos frutos; os fatores favoráveis à ocorrência e alimentação da broca; bem como a biologia e os hábitos de reprodução, para assim adotar as ferramentas de controle, mantendo o nível populacional do inseto de forma que não cause danos e não afete a produtividade (BUSTILLO *et al.*, 1998; CAMILO; OLIVARES; HERNÁNDEZ, 2003).

Entre as ferramentas de controle de *H. hampei*, está o uso de fungos entomopatogênicos que podem ser prospectados para reduzir a densidade populacional desse inseto. O controle biológico da broca-do-café é feito principalmente por meio de produtos à base de *B. bassiana*, fungo comumente encontrado nos orifícios abertos pela broca, como na coroa do fruto do café em épocas mais chuvosas (PARRA; REIS, 2013), e *M. anisopliae*. Essas duas espécies são os entomopatógenos mais estudados e utilizados no controle microbiano de pragas, devido a especificidade, seletividade e compatibilidade com outros métodos, além da segurança ambiental (ALMEIDA; ROCHA; BATISTA FILHO, 2007).

Atualmente para controle biológico de *H. hampei* no Brasil existem 15 inseticidas microbiológicos registrados, compostos por seis isolados de fungos entomopatogênicos das espécies *B. bassiana* e *M. anisopliae*, sendo cinco isolados de *B. bassiana* (BV 13, CG 716, GHA, IBCB 66 e PL 63) e um isolado de *M. anisopliae* (IBCB 425) associado ao isolado de *B. bassiana* IBCB 66 (AGROFIT, 2022). No entanto, existe grande diversidade de gêneros que ainda precisa ser explorada, tais como *Cordyceps*, *Fusarium* e *Paecilomyces*.

Diante disso, é importante a realização de estudos com novos isolados de fungos entomopatogênicos para fabricação de produtos microbiológicos para controle da broca-do-café. Assim, com base no exposto, objetivou-se neste trabalho avaliar a eficiência de isolados de fungos entomopatogênicos no controle da broca-do-café em laboratório, no intuito de ampliar o potencial de uso desses agentes biológicos de controle.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Bioensaios com fungos entomopatogênicos**

O experimento foi conduzido na empresa Nooa Ciência e Tecnologia Agrícola LTDA, localizada na zona rural do município de Patos de Minas, MG, no período de setembro de 2021 a julho de 2022.

#### **2.1.1. Origem e obtenção dos isolados**

Foram utilizados 27 isolados de fungos entomopatogênicos (Tabela 1), sendo oito provenientes do Instituto Biológico de São Paulo - SP, três da Universidade Federal de Uberlândia, Campus Monte Carmelo - MG, um de produto comercial e 14 foram isolados de

forma direta de adultos da broca-do-café colonizados naturalmente encontrados em lavoura de café em Patos de Minas – MG, coordenadas 18°44'13" S e 46°39'40" W. Os fungos foram identificados à nível de gênero por meio da morfologia das colônias e microscopia óptica e preservados pela técnica de Castellani (1939).

**Tabela 1.** Isolados e origem dos fungos entomopatogênicos.

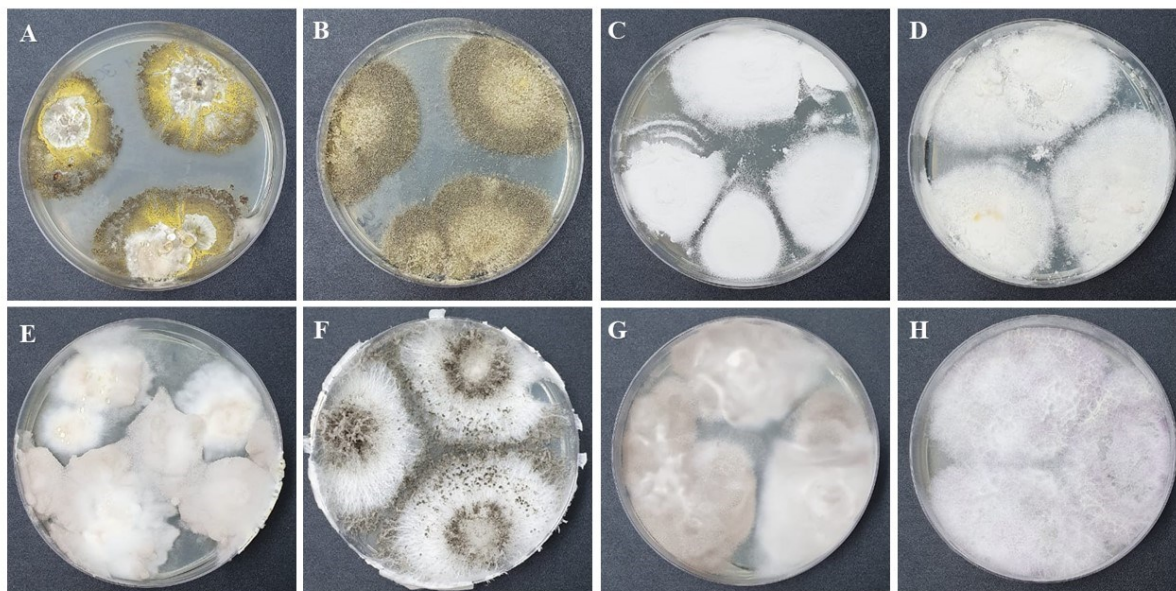
Isolado	Espécie	Origem
CMAA 1306	<i>Beauveria bassiana</i>	Produto comercial
IBCB 170	<i>Beauveria bassiana</i>	Instituto Biológico de São Paulo
IBCB 66	<i>Beauveria bassiana</i>	Instituto Biológico de São Paulo
NCTB 04	<i>Beauveria</i> sp.	Nooa Ciência e Tecnologia Agrícola Ltda.
NCTB 05	<i>Beauveria</i> sp.	Nooa Ciência e Tecnologia Agrícola Ltda.
NCTB 06	<i>Beauveria</i> sp.	Nooa Ciência e Tecnologia Agrícola Ltda.
NCTB 07	<i>Beauveria</i> sp.	Nooa Ciência e Tecnologia Agrícola Ltda.
NCTB 08	<i>Beauveria</i> sp.	Nooa Ciência e Tecnologia Agrícola Ltda.
NCTB 13	<i>Beauveria</i> sp.	Nooa Ciência e Tecnologia Agrícola Ltda.
NCTB 15	<i>Beauveria</i> sp.	Nooa Ciência e Tecnologia Agrícola Ltda.
NCTB 15.1	<i>Beauveria</i> sp.	Nooa Ciência e Tecnologia Agrícola Ltda.
NCTB 16	<i>Beauveria</i> sp.	Nooa Ciência e Tecnologia Agrícola Ltda.
NCTB 18	<i>Beauveria</i> sp.	Nooa Ciência e Tecnologia Agrícola Ltda.
UFUMCB 1	<i>Beauveria</i> sp.	Universidade Federal de Uberlândia
UFUMCB 3	<i>Beauveria</i> sp.	Universidade Federal de Uberlândia
IBCB 130	<i>Cordyceps fumosorosea</i>	Instituto Biológico São Paulo
NCTI 01	<i>Cordyceps</i> sp.	Nooa Ciência e Tecnologia Agrícola Ltda.
NCTC 01	<i>Cordyceps</i> sp.	Nooa Ciência e Tecnologia Agrícola Ltda.
NCTC 02	Trichocomaceae	Nooa Ciência e Tecnologia Agrícola Ltda.
UFUMCF	<i>Fusarium</i> sp.	Universidade Federal de Uberlândia
IBCB 348	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Instituto Biológico de São Paulo
IBCB 353	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Instituto Biológico de São Paulo
IBCB 364	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Instituto Biológico de São Paulo
IBCB 383	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Instituto Biológico de São Paulo
IBCB 391	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Instituto Biológico de São Paulo
IBCB 425	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Instituto Biológico de São Paulo
NCTP 08	<i>Paecilomyces</i> sp.	Nooa Ciência e Tecnologia Agrícola Ltda.

### 2.1.2. Seleção dos isolados

Os isolados foram repicados em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) e incubados a 25°C por 10 dias ou até atingirem a esporulação, dependendo de cada isolado (Figura 1). Após constatada a esporulação, de 20 a 50 mL de solução de água destilada estéril + Tween 0,2%

foram adicionados à placa com cultura crescida de cada isolado e com auxílio de alça de Drigalsk os conídios foram incorporados à solução. Posteriormente, a solução contendo conídios e micélio foi agitada em agitador tipo Vortex e peneirada em peneira de 100 mesh. A concentração das soluções foi verificada em câmara de Neubauer e, quando necessário, ajustada à concentração de  $1$  a  $3 \times 10^8$  conídios por mL, adicionando-se mais solução de água com Tween ou conídios. Com as concentrações ajustadas, 0,5 mL de solução foram adicionadas em tubos criogênicos de 2 mL para realizar o tratamento nos insetos.

**Figura 1.** Colônias de fungos entomopatogênicos em meio Batata Dextrose Ágar (BDA). (A e B) *Metarhizium anisopliae*, (C e D) *Beauveria* sp., (E) *Cordyceps* sp., (F) Trichocomaceae (G) *Paecilomyces* sp. e (H) *Fusarium* sp.



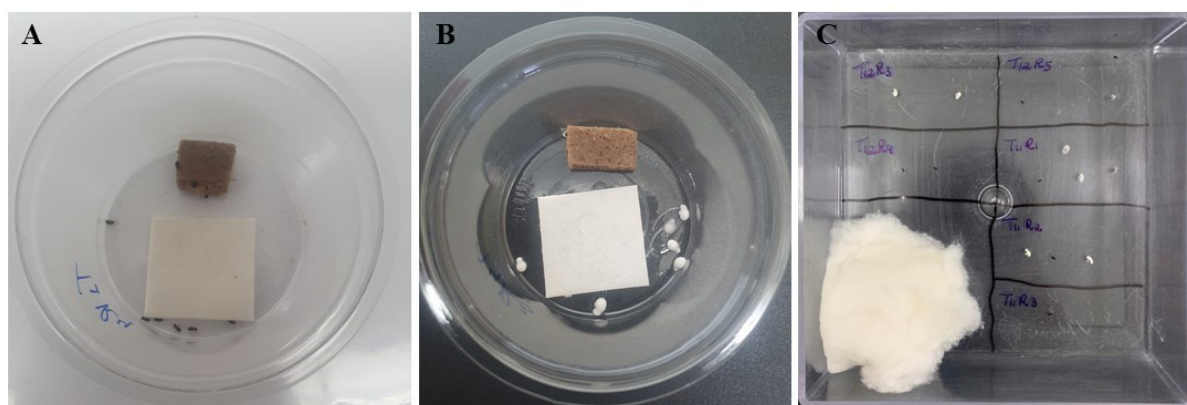
Dez fêmeas adultas da broca-do-café foram colocadas dentro dos tubos criogênicos para imersão nas suspensões de conídios dos entomopatógenos. Esses tubos foram então levemente agitados manualmente por 30 segundos e depois os insetos juntamente com a suspensão foram transferidos para pote plástico de 30 mL com tampa contendo quatro pedaços de papel filtro mata-borrão sobrepostos cortados em  $2 \text{ cm}^2$  previamente esterilizados, para absorção da suspensão de conídios e secagem dos insetos. O tratamento controle foi feito com imersão em solução de água destilada + Tween 0,2%. Decorrido o tempo de uma hora, as brocas-do-café foram transferidas para outro pote plástico (30 mL) contendo um pedaço pequeno de dieta para alimentação dos insetos e um pedaço de papel filtro mata-borrão cortado em tamanho de  $1,5 \text{ cm}^2$ , para que o papel filtro não fique em contato com a dieta.

Foram adicionados 200  $\mu$ L de água destilada esterilizada em cima do papel filtro a fim de se manter microclima úmido dentro dos potes (Figura 2 A).

Os potes foram acondicionados em sala climatizada com temperatura de  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  e umidade relativa de  $80 \pm 10\%$ , regulada pelo acionamento periódico de umidificador de ar para manutenção do microclima externo, por sete dias. A cada 48 h foram adicionados mais 100 $\mu$ L de água destilada estéril aos pedaços de papel filtro. O papel umedecido e a umidade externa do ar serviram para dar condições necessárias à germinação dos conídios.

Depois de 10 dias foi realizada a avaliação dos experimentos separando-se os insetos vivos e mortos com auxílio de pincel nº 00. A mortalidade foi confirmada por meio da observação dos insetos com crescimento micelial e esporulação característica do isolado, além da morfologia de conidióforos e conídios observados em microscópio óptico de luz (Figura 2 B). Brocas mortas sem colonização aparente foram desinfestadas superficialmente em 30 segundos em solução de NaClO 1% e colocadas em papel toalha para secagem. Logo após, foram colocadas em câmara úmida em caixas plásticas tipo Gerbox contendo algodão embebido com água destilada por quatro dias, a  $25^\circ\text{C}$ , para confirmar se houve morte por colonização (Figura 2 C).

**Figura 2.** (A) Recipiente plástico com as brocas-do-café tratadas, dieta e papel filtro umedecido, (B) Brocas colonizadas por *Beauveria bassiana* após sete dias de incubação, (C) Câmara úmida com insetos mortos após quatro dias de incubação.



Os isolados de fungos entomopatogênicos foram divididos em dois grupos para realização de dois bioensaios, o primeiro com 15 isolados e o tratamento controle totalizando 16 tratamentos e o segundo bioensaio com 12 isolados mais o tratamento controle, totalizando 13 tratamentos (Tabela 2). Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente

casualizado com seis repetições. Cada pote plástico de 30 mL de capacidade, com 10 insetos, foi considerado uma repetição.

**Tabela 2.** Tratamentos utilizados nos dois bioensaios para avaliação de potencial patogênico e de virulência à broca-do-café.

Tratamento	Bioensaio I		Bioensaio II	
	Fungo	Isolado	Fungo	Isolado
T <sub>1</sub>	Controle	-	Controle	-
T <sub>2</sub>	<i>Beauveria bassiana</i>	IBCB 66	<i>Cordyceps fumosorosea</i>	IBCB 130
T <sub>3</sub>	<i>Beauveria bassiana</i>	IBCB 170	<i>Cordyceps</i> sp.	NCTI 01
T <sub>4</sub>	<i>Beauveria bassiana</i>	CBMA 1306	<i>Cordyceps</i> sp.	NCTC 01
T <sub>5</sub>	<i>Beauveria</i> sp.	UFUMCB 1	Trichocomaceae	NCTC 02
T <sub>6</sub>	<i>Beauveria</i> sp.	UFUMCB 3	<i>Fusarium</i> sp.	UFUMCF 1
T <sub>7</sub>	<i>Beauveria</i> sp.	NCTB 02	<i>Metarhizium anisopliae</i>	IBCB 348
T <sub>8</sub>	<i>Beauveria</i> sp.	NCTB 03	<i>Metarhizium anisopliae</i>	IBCB 353
T <sub>9</sub>	<i>Beauveria</i> sp.	NCTB 04	<i>Metarhizium anisopliae</i>	IBCB 364
T <sub>10</sub>	<i>Beauveria</i> sp.	NCTB 05	<i>Metarhizium anisopliae</i>	IBCB 383
T <sub>11</sub>	<i>Beauveria</i> sp.	NCTB 06	<i>Metarhizium anisopliae</i>	IBCB 391
T <sub>12</sub>	<i>Beauveria</i> sp.	NCTB 07	<i>Metarhizium anisopliae</i>	IBCB 425
T <sub>13</sub>	<i>Beauveria</i> sp.	NCTB 08	<i>Paecilomyces</i> sp.	NCTP 08
T <sub>14</sub>	<i>Beauveria</i> sp.	NCTB 09		
T <sub>15</sub>	<i>Beauveria</i> sp.	NCTB 10		
T <sub>16</sub>	<i>Beauveria</i> sp.	NCTB 11		

Os valores atípicos (*outliers*) foram identificados com a plotagem dos resíduos estudentizados externamente (RStudent) versus valores preditos (variável Y). A partir do RStudent, valores que se encontravam fora do intervalo -2 a 2 foram considerados *outliers* e suas observações correspondentes foram removidas do banco de dados. Os dados de mortalidade confirmada foram transformados em  $\text{arc-sen } \sqrt{x+0,5}$ . Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Jaque-Berra; à homocedasticidade pelo teste de Hartley; e, a independência dos resíduos por análise gráfica. Posteriormente, sendo atendidos os pressupostos, os dados foram submetidos à análise de variância por meio do teste F ( $p \leq 0,05$ ). Constatando-se significância estatística ao nível de 5%, os efeitos dos tratamentos foram comparados entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). A análise estatística foi realizada com auxílio do software Statistica 7.0 (STATSOFT, 2007).

## 2.2. Multiplicação dos isolados

Para obtenção de conídios dos fungos entomopatogênicos selecionados, em câmara de fluxo laminar, cinco discos de micélio dos isolados com 10 dias de idade crescidos em BDA foram adicionados em Erlenmeyer contendo 200 mL de meio de cultura líquido Batata Dextrose (BD) previamente esterilizado e resfriado. Feito isso, esses Erlenmeyers foram colocados em agitação de 180 rpm e temperatura de 26°C por 48h. Como substrato sólido de crescimento foram preparados saquinhos plásticos contendo arroz parboilizado (Arroz Gringo). Seis quilos de arroz foram colocados de molho com água por 30 minutos, depois de retirado o excesso de água com escorredor de arroz, 250 g do arroz úmido foram fracionados em sacos plásticos de polipropileno, 20 x 30 cm, fechados com grampo e esterilizados em autoclave por 30 min.

Após agitação, em fluxo laminar, com auxílio de seringa, 20 mL de inóculo foram adicionados em cinco saquinhos com arroz e revolvidos manualmente para homogeneização do fungo em todo o arroz. Os saquinhos foram dispostos em prateleiras a  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  de temperatura. No terceiro e no sexto dia o arroz foi revolvido manualmente para rompimento do micélio e trocas gasosas. No oitavo dia o arroz foi espalhado em bandejas por mais três dias na mesma temperatura. Após isso, para remoção dos conídios o substrato foi peneirado manualmente em peneira de 20 e 100 mesh.

## 2.3. Concentração letal média (CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>) e tempo letal médio (TL<sub>50</sub> e TL<sub>90</sub>)

Para realização dos experimentos de CL<sub>50</sub> e TL<sub>50</sub> foi verificada a viabilidade dos conídios dos isolados selecionados multiplicados no arroz. Para análise de viabilidade, alíquotas de 15 uL da diluição  $10^{-4}$  foram colocadas em placas de Petri contendo meio BDA e incubadas por 16 h a 25°C. Após esse período foi adicionado corante azul de lactofenol sobre a os conídios na placa de Petri e no microscópio óptico foram contados cerca de 500 conídios germinados e não germinados para determinação da viabilidade em porcentagem. Posteriormente, para montagem dos experimentos foram realizadas diluições seriadas a partir dos conídios peneirados em solução de água destilada + Tween 0,2%, previamente esterilizada e a concentração de conídios totais estimadas em câmara de Neubauer.

Os bioensaios de CL foram realizados imergindo-se os insetos nas soluções de conídios e, posteriormente, fazendo a transferência para pote plástico com papel filtro umedecido e pedaço de dieta conforme o item 2.1.2. Foram utilizadas as concentrações de 2,5



$\times 10^9$ ;  $2,5 \times 10^8$ ;  $2,5 \times 10^7$ ;  $2,5 \times 10^6$ ;  $2,5 \times 10^5$  e  $2,5 \times 10^4$  conídios viáveis/mL para os isolados de *M. anisopliae* (IBCB 353, IBCB 364, IBCB 425) e  $6 \times 10^9$ ;  $3 \times 10^9$ ;  $3 \times 10^8$ ;  $3 \times 10^7$ ;  $3 \times 10^6$ ;  $3 \times 10^5$  conídios viáveis/mL para os isolados de *B. bassiana* (NCTB 04 e IBCB 66). No total foram 30 tratamentos, com seis repetições (180 parcelas), cada parcela com 15 brocas adultas provenientes da criação massal em dieta artificial. Após sete dias de incubação em sala climatizada foram realizadas avaliações de mortalidade e preparo de câmara úmida conforme o item 2.1.2.

Os bioensaios de TL foram realizados imergindo-se os insetos nas soluções de conídios e transferidas para pote plástico de 30 mL com papel filtro umedecido e pedaço de dieta conforme o item 2.1.2. As concentrações utilizadas foram de  $2,5 \times 10^9$  e  $2,5 \times 10^8$  conídios viáveis/mL para os isolados de *M. anisopliae* (IBCB 353, IBCB 364, IBCB 425); e  $6 \times 10^9$  e  $3 \times 10^9$  conídios viáveis/mL para os isolados de *B. bassiana* (NCTB 04 e IBCB 66) e o tratamento controle contendo solução de água destilada + Tween 0,2%. Tanto para os ensaios de CL quanto de TL foram realizados testes para determinar as doses a serem utilizadas.

No total foram 11 tratamentos, com seis repetições (66 parcelas), cada parcela com 15 brocas adultas provenientes da criação massal em dieta artificial. Após dois dias e a cada 24h até o oitavo dia foi realizada contagem de indivíduos mortos e preparada câmara úmida para avaliação de mortalidade confirmada. Os dados de mortalidade do tempo letal foram corrigidos pela fórmula de Abbott (1925). Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado e os dados de mortalidade obtidos nas diferentes concentrações e tempos foram submetidos à análise de Probit, determinando-se as  $CL_{50}$ ,  $CL_{90}$ ,  $TL_{50}$  e  $TL_{90}$  utilizando o software IBM SPSSStatistics 28.0 (IBM SPSS, 2021).

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1. Seleção de isolados de fungos entomopatogênicos à broca-do-café**

No primeiro bioensaio com diferentes isolados de *Beauveria* spp., foi observado que todos os isolados foram patogênicos a broca-do-café apresentando mortalidade confirmada acima de 30% (Tabela 3). Houve diferença significativa de todos os isolados em relação ao tratamento controle, entretanto, o isolado NCTB 04 destacou-se, apresentando mortalidade superior aos isolados UFUMCB 1, NCTB 06, NCTB 15, NCTB 16, NCTB 13, NCTB 07 UFUMCB 3 e NCTB 08, sendo o único isolado a apresentar mortalidade

confirmada acima de 85%. O bioensaio II, com fungos entomopatogênicos dos gêneros *Cordyceps*, *Fusarium*, *Metarhizium* e *Paecilomyces* também apresentou significância na mortalidade confirmada, os isolados IBCB 364, IBCB 353, IBCB 391, IBCB 383, IBCB 348, IBCB 425, NCTC 01, NCTC 02 e NCTI 01 se diferenciaram estatisticamente do tratamento controle. Os isolados IBCB 364 e o IBCB 353 foram os únicos a apresentarem mais de 85% de mortalidade confirmada.

**Tabela 3.** Efeito de diferentes isolados de fungos entomopatogênicos na mortalidade da broca-do-café.

Bioensaio I		Bioensaio II	
Tratamento	Mortalidade confirmada (%)	Tratamento	Mortalidade confirmada (%)
Controle	0,0 g <sup>1</sup>	Controle	0,0 f
NCTB 08	30,3 f	IBCB 130	1,0 ef
UFUMCB 3	45,0 e	NCTP 08	1,7 ef
NCTB 07	58,3 de	UFUMCF 1	1,7 ef
NCTB 13	58,4 de	NCTI 01	4,2 de
NCTB 16	60,8 cd	NCTC 02	11,7 d
NCTB 15	64,4 bcd	NCTC 01	44,2 c
NCTB 06	67,5 bcd	IBCB 425	53,8 bc
UFUMCB 1	68,2 bcd	IBCB 348	58,3 bc
IBCB 66	70,8 abcd	IBCB 383	63,3 b
CBMA 1306	74,2 abcd	IBCB 391	68,3 ab
IBCB 170	74,2 abcd	IBCB 353	86,7 a
NCTB 15.1	75,0 abcd	IBCB 364	87,5 a
NCTB 18	76,1 abc		
NCTB 05	77,5 ab		
NCTB 04	87,5 a		
CV (%)	5,5		24,3

<sup>1</sup>Médias seguidas de letras iguais, não diferem entre si, através do teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Dentre os 27 isolados testados para controle da broca-do-café, os que apresentaram melhor efeito foram os fungos entomopatogênicos dos gêneros *Beauveria* e *Metarhizium*. Todos os produtos biológicos registrados no Brasil para controle dessa praga são constituídos de propágulos fúngicos desses gêneros. No total são cinco isolados de *B. bassiana* e um de *M. anisopliae* registrados (AGROFIT, 2022). Sendo assim, são necessárias pesquisas para prospecção de novos isolados que controlem esse inseto-praga, que é uma das principais pragas da cafeicultura.

Diversas pesquisas já foram e continuam sendo realizadas para seleção de fungos entomopatogênicos virulentos à broca-do-café e em todos eles os isolados que apresentaram

maior mortalidade desse inseto foram dos gêneros *Beauveria* e *Metarhizium*, corroborando com os dados desse trabalho. A mortalidade confirmada foi escolhida como parâmetro de avaliação para seleção de isolados porque além de confirmar a causa da morte do inseto demonstra a virulência e capacidade do isolado de permanência no ambiente. De acordo Neves e Hirose (2005) em culturas perenes como o café, a conidiogênese do fungo no inseto é muito relevante já que garante sua permanência no ambiente.

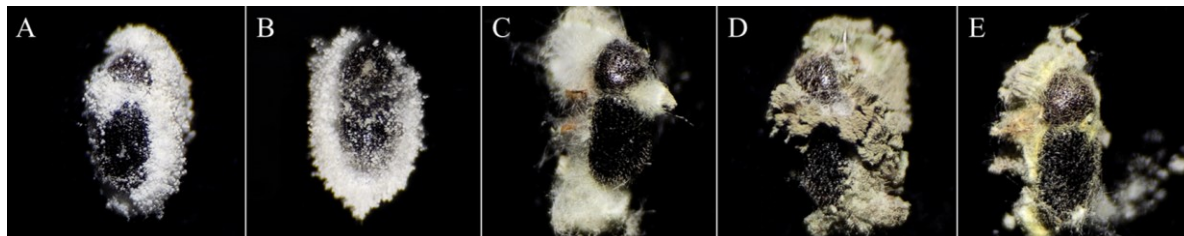
Neves e Hirose (2005) selecionaram 11 isolados de *B. bassiana* com mortalidade confirmada acima de 60% na concentração de  $2,5 \times 10^7$  conídios/mL seis dias após inoculação. De La Rosa *et al.* (1997) selecionaram nove isolados de *B. bassiana* com mortalidade confirmada acima de 90%. Para seleção, as brocas foram submersas por 30 segundos em suspensão de conídios na concentração de  $1 \times 10^8$  conídios/mL. Morales *et al.* (2019) avaliaram a mortalidade confirmada da broca-do-café pelo isolado de *B. bassiana* que foi de 23; 49; 67 e 83% nas concentrações de  $1 \times 10^5$ ;  $1 \times 10^6$ ;  $1 \times 10^7$ ; e  $1 \times 10^8$ , respectivamente.

Nos experimentos de Lecuona *et al.* (1986), o fungo *M. anisopliae* mostrou-se patogênico para broca-do-café *H. hampei* em laboratório, apresentando mortalidade corrigida acima de 60% na concentração  $1,5 \times 10^8$  após quatro dias de incubação. Pava-Ripoll *et al.* (2008) imergiram as brocas-do-café em soluções de conídios de dois isolados de *M. anisopliae*, Ma549 e AaIT-Ma549 (geneticamente modificado). Nas concentrações de  $10^1$ ,  $10^2$  e  $10^3$  conídios/mL o isolado recombinante aumentou significativamente a mortalidade da broca-do-café em 32,2; 56,6 e 24,6%, respectivamente, em relação ao isolado original, após 21 dias de tratamento. Após três dias de tratamento o isolado AaIT-Ma549 matou 75% das brocas enquanto o Ma549 matou 51,3%. No entanto, AaIT-Ma549 obteve menor conidiogênese nos cadáveres de *H. hampei* do que o isolado original. Lezcano *et al.* (2015) encontraram média de 87,5% de mortalidade da broca-do-café infestadas com soluções de  $10^9$  conídios/mL de *Isaria* sp.

Dessa forma, para prosseguir com os testes de mortalidade CL50 e TL50 foram selecionados do bioensaio I os isolados NCTB 04 por ter a maior taxa de mortalidade confirmada e o isolado IBCB 66 que além de estar entre os isolados de *Beauveria* que mais se destacaram estatisticamente em relação à testemunha é o isolado comercial com maior número de produtos registrados para controle da broca-do-café. Já do bioensaio II, foram selecionados os isolados de *M. anisopliae* IBCB 364 e IBCB 353 por terem as maiores taxas de mortalidade confirmada (87,5 e 86,7%) e o IBCB 425 por ser isolado comercial com

registro para a broca-do-café. Dessa forma, foram escolhidos os isolados que apresentaram taxa de mortalidade confirmada maior que 80% e os isolados comerciais (Figura 3).

**Figura 3.** Brocas-do-café colonizadas por isolados de fungos entomopatogênicos. (A) IBCB 66 (*Beauveria bassiana*), (B) NCTB 04 (*Beauveria* sp.), (C) IBCB 353 (*Metarhizium anisopliae*), (D) IBCB 364 (*M. anisopliae*), (E) IBCB 425 (*M. anisopliae*).



### 3.2. Ensaio de concentração e tempo letal de fungos entomopatogênicos à broca-do-café

Nas análises de concentrações letais ( $CL_{50}$  e  $CL_{90}$ ) para os isolados de *M. anisopliae* IBCB 353, 364 e 425 e de *Beauveria* sp. NCTB 04, o  $\chi^2$  calculado foi menor que o  $\chi^2$  tabelado, indicando que o efeito letal desses isolados entomopatogênicos à *H. hampei* é adequado ao modelo de Probit, não sendo observado o mesmo efeito para o isolado IBCB 66. De forma geral, os isolados não comerciais apresentaram maior letalidade em relação aos seus pares comerciais, ou seja, IBCB 353 e 364 demonstram menores CLs que o IBCB 425 e NCTB 04 menor que IBCB 66, demonstrando o potencial desses isolados serem inseridos no manejo da broca-do-café. Ao comparar os isolados de *M. anisopliae* entre si, é possível afirmar que os dois isolados não comerciais apresentaram maior letalidade que o isolado comercial (IBCB 425), pois suas concentrações letais foram menores e, além disso, os intervalos de confiança não se sobrepuseram (Tabela 4).

Em relação a  $CL_{50}$ , o menor valor verificado ( $4,6 \times 10^5$  conídios/mL) foi para o isolado IBCB364, que se destacou com a maior letalidade, e seu intervalo de confiança não se sobrepôs a nenhum dos isolados testados. Para a  $CL_{90}$  o menor valor observado ( $8,16 \times 10^7$  conídios/mL) foi para o isolado IBCB 353, apresentando-se como o mais letal (Tabela 4). Tal fato está relacionado com o isolado em questão apresentar a maior inclinação da reta, dessa forma a resposta de mortalidade é mais rápida conforme as concentrações aumentam. Estes resultados mostraram que são necessários cerca de 5, 44 e 16 vezes menos conídios/mL do IBCB 364 para matar 50% das brocas-do-café em relação aos isolados IBCB 353, 425 e NCTB 04, respectivamente. E para matar 90% das brocas em relação aos isolados IBCB 425

e NCTB 04 são necessários 8 e 10 vezes menos conídios do IBCB 364 e 10 e 14 vezes menos conídios do IBCB 353.

**Tabela 4.** Análise de Probit e concentrações letais (CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>) preditas com base nos dados de resposta de *H. hampei* à aplicação de diferentes isolados de fungos entomopatogênicos.

Isolado	N	Inclinação ± EP	CL <sub>50</sub> (IC a 95%) conídios/mL	CL <sub>90</sub> (IC a 95%) conídios/mL	G.L.	χ <sup>2</sup>	p
IBCB 353	540	0,77 ± 0,04	2,13 × 10 <sup>6</sup> (1,42 × 10 <sup>6</sup> – 3,19 × 10 <sup>6</sup> )	8,16 × 10 <sup>7</sup> (4,61 × 10 <sup>7</sup> – 1,66 × 10 <sup>8</sup> )	4	5,18	0,27
IBCB 364	540	0,57 ± 0,05	4,26 × 10 <sup>5</sup> (2,21 × 10 <sup>5</sup> – 7,54 × 10 <sup>5</sup> )	1,11 × 10 <sup>8</sup> (5,07 × 10 <sup>7</sup> – 3,05 × 10 <sup>8</sup> )	4	5,22	0,26
IBCB 425	540	0,74 ± 0,04	1,87 × 10 <sup>7</sup> (1,22 × 10 <sup>7</sup> – 2,80 × 10 <sup>7</sup> )	8,50 × 10 <sup>8</sup> (4,86 × 10 <sup>8</sup> – 1,69 × 10 <sup>9</sup> )	4	7,15	0,13
IBCB 66	540	0,67 ± 0,23	8,60 × 10 <sup>7</sup> (1,46 × 10 <sup>7</sup> – 4,77 × 10 <sup>8</sup> )	3,58 × 10 <sup>10</sup> (3,64 × 10 <sup>9</sup> – 9,23 × 10 <sup>12</sup> )	4	15,7	0,01 <sup>ns</sup>
NCTB 04	540	0,63 ± 0,09	6,80 × 10 <sup>6</sup> (1,54 × 10 <sup>6</sup> – 2,08 × 10 <sup>7</sup> )	1,17 × 10 <sup>9</sup> (2,90 × 10 <sup>8</sup> – 1,34 × 10 <sup>10</sup> )	4	9,65	0,05

<sup>ns</sup> não significativo. N= número de insetos; EP= erro padrão; CL<sub>50</sub>= concentração letal 50%; CL<sub>90</sub>= concentração letal 90%; G.L= grau de liberdade; IC= intervalo de confiança; χ<sup>2</sup>= Qui-quadrado; p= probabilidade.

Para análise tempo letal médio (TL<sub>50</sub>) os dados de mortalidade confirmada não se adequaram ao modelo de Probit, já que o χ<sup>2</sup> calculado foi maior que o χ<sup>2</sup> tabelado. Dessa forma optou-se realizar as análises de Probit de TL<sub>50</sub> com os dados de mortalidade corrigida pela fórmula de Abbott já que os dados se ajustaram ao modelo de Probit pelo teste de χ<sup>2</sup>.

A ação letal dos isolados avaliados sobre as fêmeas de *H. hampei* iniciou-se a partir do 3º dia após o tratamento com suspensões de conídios. De acordo com a análise de Probit, o TL<sub>50</sub> dos isolados testados foi próximo, variando de 3,2 a 4,4 dias. Observa-se menor TL<sub>50</sub> da broca-do-café para o isolado IBCB 66 (3,2 dias), seguido pelos isolados IBCB 353 (3,5 dias), IBCB 425 (3,8 dias), IBCB 364 (4,3 dias) e NCTB 04 (4,4 dias) (Tabela 5).

Já para o TL<sub>90</sub> a variação foi de 5,6 a 7,3 dias. O isolado IBCB 66 obteve o menor TL<sub>90</sub> (5,6 dias), seguido pelos isolados IBCB 353 (6 dias), NCTB 04 (6,9 dias), IBCB 425 (7,2 dias) e IBCB 364 (7,3 dias) (Tabela 5). Dessa forma, pode-se inferir que o isolado comercial IBCB 66 apresentou menor tempo de letalidade e, portanto, maior virulência devido aos menores tempos letais. Além disso, os tempos letais do mesmo não sobrepõem aos demais, com exceção ao isolado IBCB 353.

**Tabela 5.** Análise de Probit e tempos letais (TL<sub>50</sub> e TL<sub>90</sub>) preditos com base nos dados de resposta de *H. hampei* à aplicação de diferentes isolados de fungos entomopatogênicos.

Isolado	N	Inclinação ± EP	TL <sub>50</sub> (IC a 95%) dias	TL <sub>90</sub> (IC a 95%) dias	G.L.	χ <sup>2</sup>	p
IBCB 353	540	5,78 ± 0,53	3,5 (3,3 – 3,7)	6,0 (5,6 – 6,5)	5	8,55	0,13
IBCB 364	540	6,02 ± 0,50	4,3 (4,1 – 4,5)	7,3 (6,8 – 7,9)	5	9,44	0,09
IBCB 425	540	4,80 ± 0,48	3,8 (3,5 – 4,0)	7,2 (6,7 – 8,0)	5	8,84	0,12
IBCB 66	540	5,46 ± 0,46	3,2 (3,0 – 3,4)	5,6 (5,2 – 6,1)	5	8,09	0,15
NCTB 04	540	6,30 ± 0,48	4,4 (4,2 – 4,6)	6,9 (6,5 – 7,5)	5	9,09	0,11

N= número de insetos; EP= erro padrão; TL<sub>50</sub>= tempo letal 50%; TL<sub>90</sub>= tempo letal 90%; G.L.= grau de liberdade; IC= intervalo de confiança; χ<sup>2</sup>= Qui-quadrado; p= probabilidade.

De acordo com Pava-Ripoll *et al.* (2008) as avaliações de tempo letal médio (TL<sub>50</sub>), concentração letal média (CL<sub>50</sub>), de duração das fases de patogênese, saprogênese e conidiogênese dos fungos entomopatogênicos nos insetos são parâmetros importantes para avaliação da eficiência desses agentes de biocontrole. Essas variáveis são relevantes para verificar as implicações ambientais e econômicas da aplicação desses entomopatógenos no campo.

A maior parte dos estudos de fungos entomopatogênicos para controle da broca-do-café em condições de laboratório encontrados na literatura foram realizados com isolados da espécie *B. bassiana*, demonstrando maior ocorrência natural já que grande parte dos estudos foram realizados a partir de isolamento direto de brocas colonizadas encontradas em campo e potencial dessa espécie para controle desse inseto-praga. Os dados obtidos por Hirose e Neves (2005) foram semelhantes ao obtido no presente experimento. Esses autores selecionaram 11 isolados de *B. bassiana* no controle *in vitro* de *H. hampei*. A mortalidade confirmada variou de 51,6 a 82,8% e a CL<sub>50</sub>  $2,5 \times 10^6$  até  $6,2 \times 10^7$  conídios/mL. O isolado CG425 apresentou maior mortalidade confirmada (82,8%) e menor CL<sub>50</sub> ( $2,5 \times 10^6$  conídios/mL). Os autores sugerem a utilização de um grupo ou mistura de isolados no programa de manejo da broca-do-café para aumentar os limites de tolerância e a permanência dos agentes de biocontrole em campo, podendo melhorar os níveis de controle.

Dalvi (2008) testou quatro isolados de *Beauveria* para controle de *H. hampei* pulverizando soluções de conídios sobre os insetos e a CL<sub>50</sub> variou de  $4 \times 10^4$  a  $1,2 \times 10^5$  conídios/mL. François *et al.* (2021) encontraram CL<sub>50</sub> de dois isolados de *Beauveria* à *H. hampei* que foi  $2,63 \times 10^4$  e  $1,51 \times 10^7$  conídios/mL para os isolados Bb-IRAD.Nkoe e Bb-IRAD.Fbt, respectivamente. A CL<sub>90</sub> foi de  $8,49 \times 10^{11}$  e  $7,18 \times 10^{12}$  conídios/mL para os isolados Bb-IRAD.Nkoe e Bb-IRAD.Fbt, respectivamente.

Morales *et al.* (2019) realizaram pulverização de concentrações de conídios de um isolado de *B. bassiana* sobre adultos de *H. hampei*. A  $CL_{50}$  estimada foi  $2,47 \times 10^6$  conídios/mL e o  $TL_{50}$  para concentrações de  $1 \times 10^7$  e  $1 \times 10^8$  foram de, respectivamente, 4 e 1,5 dias. Os autores ainda testaram o controle da broca-do-café com esse mesmo isolado na diluição  $10^6$  associado ao inseticida químico Spinosad<sup>®</sup>. Esse tratamento causou 95% mortalidade enquanto separados causaram 61% (fungo) e 49% (inseticida químico). Dessa forma, desde que haja compatibilidade entre os produtos químico e biológico estudos podem ser realizados para controle desse inseto-praga.

Lezcano *et al.* (2015) testaram a virulência de um isolado de *Cordyceps* sp. (= *Isaria* sp.) e de isolados comerciais de *B. bassiana* e *M. anisopliae* no controle da broca-do-café. *Cordyceps* sp. apresentou maior mortalidade dos insetos do que os produtos comerciais, demonstrando o potencial da espécie para o controle dessa praga. Os resultados obtidos para o isolado de *Cordyceps* sp. foram  $CL_{50}$  de  $1,1 \times 10^8$  e  $CL_{95}$  de  $5,9 \times 10^9$  conídios/mL. Apesar do potencial da espécie, comparando com os resultados obtidos no presente trabalho, os isolados de *Beauveria* spp. e *M. anisopliae* avaliados necessitam de menores concentrações de conídios para letalidade de *H. hampei*.

Pava-Ripoll *et al.* (2008) testaram a patogenicidade de isolados de *M. anisopliae* em *H. hampei* imergindo os adultos por dois minutos na concentração  $10^7$  conídios/mL. Nessa concentração o tempo médio letal do isolado AaIT-Ma549 (geneticamente modificado) foi de 3 dias enquanto do Ma549 (original) foi de 3,7 dias. Dessa forma o  $TL_{50}$  foi reduzido em 20,1% em relação ao isolado original.

De acordo com o trabalho de François *et al.* (2021), os tempos letais que causaram 50 e 90% de mortalidade de brocas-do-café na concentração de  $3 \times 10^8$  conídios/mL de *B. bassiana* foram 3,7 e 11,7 dias, respectivamente, para o isolado Bb-IRAD.Fbt e 2,7 e 9,1, respectivamente, para o isolado Bb-IRAD.Nkoe. Os autores, observaram que os isolados testados causaram mortalidade das brocas-do-café antes de apresentar sinais de conidiogênese fora do corpo dos insetos, pois a mortalidade confirmada foi menor do que a mortalidade total e esse efeito evidenciou-se conforme aumento da concentração e do tempo.

Blanco (2017) realizou imersão das brocas em solução na concentração  $10^7$  conídios/mL de três isolados de *B. bassiana* (13, 24 e 9205) por três minutos e ofertou café em pergaminho como alimento após 24h de infestação, com objetivo de verificar a patogenicidade dos isolados após quatro repicagens sucessivas. O  $TL_{50}$  estimado na primeira repicagem foi de 2,4; 2,8 e 3,1 dias, na segunda repicagem foi de 3; 3,8 e 3,3 dias, na terceira

de 3,9; 4,6 e 4,1 dias e na quarta de 4,2; 5,0 e 4,6 dias para os isolados 13, 24 e 9205, respectivamente. Esse experimento demonstrou que a virulência dos isolados pode reduzir conforme o número de repicagem sucessivas.

Conforme Silva *et al.* (2003) o tempo letal dos agentes microbianos de controle sobre os insetos-praga pode ser utilizado como dado complementar, pois é mais importante a redução populacional do que a rapidez desse processo. Os fungos entomopatogênicos causam a infecção e a colonização do hospedeiro, e esse processo demanda tempo, por isso podem não possuir efeito letal rápido.

Estudos com fungos entomopatogênicos de outras espécies além de *B. bassiana* para controle da broca-do-café são importantes na busca de controle desse inseto para aumentar a gama de produtos disponíveis e o número de espécies no ambiente para controle natural. De acordo com os dados obtidos, de concentração e tempo letal, os isolados de *M. anisopliae* IBCB 353 e 364 têm potencial para serem testadas em campo para controle da broca-do-café.

#### 4. CONCLUSÕES

Os isolados NCTB 04, de *Beauveria* sp., e IBCB 353 e IBCB 364, de *M. anisopliae*, provocam mortalidade confirmada acima de 85% na broca-do-café. Os ensaios de concentração e dose letais em comparação com os isolados comerciais mostraram que esses isolados apresentam potencial para o controle desse inseto-praga em condições de laboratório.



## REFERÊNCIAS

- ABBOTT, W. S. A Method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, [s.l.], v. 18, n. 2, p. 265-267, 1 abr. 1925. DOI 10.1093/jee/18.2.265a. Disponível em: <https://academic.oup.com/jee/article-abstract/18/2/265/785683?redirectedFrom=PDF>. Acesso em: 30 jul. 2022.
- AGROFIT. Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários - **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil**. Disponível em: [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso em: 28/03/2022.
- ALMEIDA, J. E. M.; ROCHA, T. C.; BATISTA FILHO, A. Desenvolvimento de método para extração física de conídios de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* para formulação pó seco e molhável de bioinseticidas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 4, p. 369-371, out. 2007. DOI 10.1590/1808-1657v74p3692007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aib/a/7Ntf76zfJf8NFPQCQS78SVx/?lang=pt>. Acesso em: 21 jul. 2022.
- BLANCO, Carlos López. Patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei* em generaciones reproductivas. **Apthapi**, La Paz, v. 3, n. 3, p. 639-651, jan. 2017. Disponível em: <http://apthapi.agro.umsa.bo/index.php/ATP/article/view/181>. Acesso em: 30 jul. 2022.
- BUSTILLO, P.A. *et al.* Manejo integrado de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) em Colombia. Chinchica, **CENICAFE**, 134p. ISBN 958-96554-0-8. 1998. Disponível em: <https://biblioteca.cenicafe.org/handle/10778/848>. Acesso em: 31 jul. 2022.
- CAMILO, J. E.; OLIVARES, F. F.; HERNÁNDEZ, H. A. Fenología y reproducción de la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari) durante el desarrollo del fruto. **Agronomía Mesoamericana**, Alajuela, v. 14, n. 1, p. 59-63, 25 set. 2003. DOI 10.15517/am.v14i1.11989. Disponível em: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43714108>. Acesso em: 25 jul. 2022.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, p. 225-226, 1939.
- DALVI, L. P. **Coleta, caracterização molecular e seleção de isolados de *Beauveria bassiana* visando ao controle da broca-do-café no Espírito Santo**. 2008. Dissertação (Mestrado em produção vegetal), Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2008. Disponível em: [http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/123456789/11380/Dissertacao\\_Leandro%20Pin%20Dalvi.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/123456789/11380/Dissertacao_Leandro%20Pin%20Dalvi.pdf?sequence=1&isAllowed=y). Acesso em: 21 jul. 2022.
- DE LA ROSA, W. *et al.* Virulence of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes) strains against the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae). **Journal of Economic Entomology**, [s.l.], v. 90, n. 6, p. 1534-1538, 1 dez. 1997. DOI 10.1093/jee/90.6.1534. Disponível em: <https://academic.oup.com/jee/article/90/6/1534/2216772>. Acesso em: 30 jul. 2022.
- FRANÇOIS, M. E. *et al.* Isolation of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) from the soils of coffee fields and insecticide activity against *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). **Journal of Biopesticides**, [s.l.], v. 14, n. 2, p. 141-153, jan. 2021.

Disponível em:

[https://www.researchgate.net/publication/360237642\\_Isolation\\_of\\_Beauveria\\_bassiana\\_Deuteromycotina\\_Hyphomycetes\\_from\\_the\\_soils\\_of\\_coffee\\_fields\\_and\\_insecticide\\_activity\\_against\\_Hypothenemus\\_hampeii\\_Coleoptera\\_Scolytidae](https://www.researchgate.net/publication/360237642_Isolation_of_Beauveria_bassiana_Deuteromycotina_Hyphomycetes_from_the_soils_of_coffee_fields_and_insecticide_activity_against_Hypothenemus_hampeii_Coleoptera_Scolytidae). Acesso em: 30 jul. 2022.

IBM SPSS Statistics, version 28.0; IBM Corp., 2021. Disponível em:

<https://www.ibm.com/support/pages/downloading-ibm-spss-statistics-280>. Acesso em: 30 jul. 2022.

JOHNSON, M. A. *et al.* Coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*), a global pest of coffee: perspectives from historical and recent invasions, and future priorities. **Insects**, [s.l.], v. 11, n. 12, p. 882, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/insects11120882>. Disponível em:

[https://www.mdpi.com/2075-](https://www.mdpi.com/2075-4450/11/12/882?type=check_update&version=1&utm_source=TrendMD&utm_medium=cpc&utm_campaign=Insects_TrendMD_0)

[4450/11/12/882?type=check\\_update&version=1&utm\\_source=TrendMD&utm\\_medium=cpc&utm\\_campaign=Insects\\_TrendMD\\_0](https://www.mdpi.com/2075-4450/11/12/882?type=check_update&version=1&utm_source=TrendMD&utm_medium=cpc&utm_campaign=Insects_TrendMD_0). Acesso em: 14 out. 2022.

LECUONA, R. E. *et al.* Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., à broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, [s.l.], v. 15, n., p. 21-27, 15 dez. 1986. DOI 10.37486/0301-8059.v15isupl.443. Disponível em: <https://anais.seb.org.br/index.php/aseb/article/view/443>. Acesso em: 30 jul. 2022.

LEZCANO, J. A. *et al.* Patogenicidad y virulência del aislado de la cepa nativa de *Isaria* spp. y dos hongos entomopatógenos comerciales. **Ciencia Agropecuaria**, n. 23, p. 20-38, 2015.

Disponível em: <http://200.46.165.126/index.php/ciencia-agropecuaria/article/view/120>.

Acesso em: 25 jul. 2022.

MATIELLO, J. D. **Perdas no rendimento e qualidade de *Coffea canephora* devido a *Hypothenemus hampei***. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência entomológica; Tecnologia entomológica), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008. Disponível em:

<http://www.sbicafe.ufv.br/handle/123456789/283>. Acesso em: 30 jul. 2022.

MORALES, A. D. *et al.* Effect of spinosad combined with *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) on *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) under laboratory conditions. **Journal of Entomological Science**, [s.l.], v. 54, n. 1, p. 106-109, jan. 2019. DOI 10.18474/jes18-16. Disponível em:

<https://meridian.allenpress.com/jes/article/54/1/106/9898/Effect-of-Spinosad-Combined-with-Beauveria>. Acesso em: 25 jul. 2022.

NEVES, P. M. O. J.; HIROSE, E. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle biológico da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae).

**Neotropical Entomology**, [s.l.], v. 34, n. 1, p. 77-82, fev. 2005. DOI 10.1590/s1519-566x2005000100011. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/ne/a/m8V83VYRS9FnHfWD3Q8KLGJ/?lang=pt#:~:text=O%20fungo%20Beauveria%20bassiana%20%C3%A9,diversos%20hospedeiros%20e%20regi%C3%B5es%20geogr%C3%A1ficas..> Acesso em: 30 jul. 2022.

PARRA, J. R. P.; REIS, P. R. Manejo integrado para as principais pragas da cafeicultura do Brasil. **Visão Agrícola**, Piracicaba, n. 12, p. 47-50, 2013. Disponível em:

<https://www.esalq.usp.br/visaoagricola/sites/default/files/va12-fitossanidade01.pdf>. Acesso em: 31 jul. 2022.

PAVA-RIPOLL, M. *et al.* Increased pathogenicity against coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) by *Metarhizium anisopliae* expressing the scorpion toxin (AaIT) gene. **Journal of Invertebrate Pathology**, [s.l.], v. 99, n. 2, p. 220-226, out. 2008. DOI 10.1016/j.jip.2008.05.004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022201108001201>. Acesso em: 29 jul. 2022.

SILVA, V. C. A. *et al.* Suscetibilidade de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) aos fungos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. **Neotropical Entomology**, [s.l.], v. 32, n. 4, p. 653-658, dez. 2003. DOI 10.1590/s1519-566x2003000400016. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ne/a/tgjRFhD7mV4MdB99RxchPkC/?lang=pt>. Acesso em: 21 jul. 2022.

SOUZA, R. A. **Métodos de manejo para broca-do-café, *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae)**. 2019. Tese (Doutorado em Produção Vegetal), Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2019. Disponível em: [https://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UFES\\_6a6569020b682a36cb163d9ae2c5172f](https://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UFES_6a6569020b682a36cb163d9ae2c5172f)

STASOFT. **Statistica 7.0 for Windows**: computer program manual. Tulsa: Statsoft Inc., 2007.

VEGA, F. E.; KRAMER, M.; JARAMILLO, J. Increasing coffee berry borer (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) female density in artificial diet decreases fecundity. **Journal Of Economic Entomology**, [s.l.], v. 104, n. 1, p. 87-93, 1 fev. 2011. DOI 10.1603/ec10353. Disponível em: <https://academic.oup.com/jec/article/104/1/87/2199558>. Acesso em: 29 jul. 2022.