

POTENCIAL ACARICIDA DO EXTRATO ENZIMÁTICO DE *Metarhizium anisopliae* NO CONTROLE DO ÁCARO VERMELHO DO CAFÉ

Thiago Nieiro Cuzzuol¹, Ana Clara Bayer Bernabé¹, Kristiélén Jeniffer Abreu Mageste¹, Thiago Rodrigues Dutra¹, Ana Beatriz Mamedes Piffer², Ronilda Lana Aguiar¹, Anderson Mathias Holtz¹

¹Instituto Federal do Espírito Santo/Campus Itapina, Rodovia BR 259 - KM 70 - Trecho Colatina X Baixo Guandu, Distrito de Itapina, Zona Rural, 29717-000-ES, Brasil, thiagonieiroc12@gmail.com, bayerbernabea@gmail.com, krisjeniffermageste@outlook.com, thiago.r.dutra@hotmail.com, ronilda.aguiar@ifes.edu.br, anderson.holtz@ifes.edu.br.

²Universidade Federal do Espírito Santo, 29075-910, Alegre, Espírito Santo, Brasil, ana.piffer123@gmail.com.

Resumo

O ácaro vermelho do café, *Oligonychus ilicis* McGregor, 1917 (Acari: Tetranychidae), é uma espécie fitófaga de grande relevância agrícola. Os danos provocados por esse artrópode-praga acarretam na diminuição da produtividade pela redução da taxa fotossintética foliar. A utilização de químicos sintéticos é um dos métodos de controle mais utilizados, porém a crescente preocupação nos impactos ambientais causados implica na busca de alternativas sustentáveis. Diante disso, objetivou-se com o presente trabalho avaliar a eficácia do extrato enzimático de *Metarhizium anisopliae* no controle de *O. ilicis*. Para o bioensaio foram utilizadas 12 fêmeas adultas de *O. ilicis*. As concentrações utilizadas foram 50 e 100%. Em cada tratamento foram aplicados 1 mL de extrato. O efeito bioacaricida foi avaliado 24, 48 e 72 horas após a aplicação do extrato. Conclui-se que o extrato enzimático de *M. anisopliae* apresentou potencial bioacaricida em todas as concentrações testadas sobre fêmeas adultas de *O. ilicis*.

Palavras-chave: Biotecnologia. Controle biológico. Entomopatógenos. *Oligonychus ilicis*.

Área do Conhecimento: Engenharia agrônoma - agronomia

Introdução

O café (*Coffea* spp.) está entre as principais commodities agrícolas presentes no agronegócio global, impactando diretamente no crescimento socioeconômico (SOUZA *et al.*, 2023). O Brasil é o maior produtor mundial da cultura com cerca de 55,1 milhões de sacas beneficiadas no ano de 2023. Dentre as pragas que afetam o cafeeiro encontra-se o ácaro vermelho do café (*Oligonychus ilicis* McGregor, 1917) (Acari: Tetranychidae), a qual possui hábito fitófago, alimentando-se da face adaxial das folhas ocasionando dano no limbo foliar através da raspagem do tecido (FERRÃO *et al.*, 2017).

A utilização do controle químico para este tipo de espécie praga tem sido o método mais utilizado, com acaricidas sintéticos à base de avermectinas, piretróides e organofosforados, os quais estão relacionados com a diminuição de inimigos naturais e ao estímulo da oviposição de fêmeas de *O. ilicis* (REIS *et al.*, 2004; REIS, 2005; FRANCO *et al.*, 2009; GOMES, 2020; AGROFIT, 2023), bem como riscos à saúde humana (D'ÁVILA, 2015).

O controle biológico com utilização de fungos entomopatogênicos têm se mostrado uma alternativa promissora à utilização de químicos sintéticos. YUN *et al.* (2023), observaram isso ao utilizarem suspensão diluída de esporos do fungo *Verticillium lecanii* (Deuteromycota: Hyphomycetes) (Zimm.) Viêgas no controle da cigarrinha pequena (*Empoasca flavescens* F.) (Homoptera: Cicadellidae) com redução de 90% da população em 2 anos.

A virulência de fungos entomopatogênicos está associada à produção de enzimas no processo de infecção do hospedeiro, exemplo disso são as quitinases, proteases e lipases que atuam na degradação de estruturas vitais à sobrevivência do artrópode (JUNIOR; GUARUS, 2011). Com isso, o fungo *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) está entre os principais entomopatógenos utilizados no controle de artrópodes-praga, atuando, por exemplo, na redução da taxa de fecundidade

de fêmeas de *Tetranychus ludeni* (Zacher) (Acari: Tetranychidae) (PEREIRA *et al.*, 2019), como também na mortalidade de soldados da formiga-de-fogo (*Solenopsis saevissima* Smith) (Hymenoptera: Formicidae) (SOUZA *et al.*, 2023).

Diante disso, por apresentar importância econômica na cultura do cafeeiro e visando buscar alternativas sustentáveis, objetivou-se com o presente trabalho avaliar a eficiência do extrato enzimático a base de *M. anisopliae* em diferentes concentrações sobre fêmeas adultas de *O. ilicis*.

Metodologia

O experimento foi realizado no Laboratório de Entomologia e Acarologia Agrícola e no complexo de laboratórios do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo - *Campus Itapina* (IFES-*Campus Itapina*), localizado no município de Colatina, com coordenadas de 19°29'52.7" S 40°45'38.5"W.

Para realização dos testes, uma criação de *O. ilicis* foi estabelecida em laboratório. Para isso, foram coletados ácaros adultos de *O. ilicis* na lavoura de café conilon livre de agrotóxicos do Ifes-*Campus Itapina* e transferidos para as arenas que consistiram em Placas de Petri (14,0 x 1,5cm) contendo disco de folha de café conforme metodologia de REIS *et al.* (1997), modificada pelo Laboratório de Entomologia e Acarologia Agrícola do Ifes-*Campus Itapina*. As Placas de Petri foram mantidas em câmeras climatizadas do tipo B.O.D., a 25±1°C, UR de 70±10% e fotofase de 12h.

Para a preparação das arenas, folhas de *C. canephora* foram coletadas na mesma lavoura, higienizadas e colocadas em Placas de Petri (10,0 x 1,2 cm). Para a montagem das unidades experimentais foi adicionado algodão umedecido no fundo e ao redor da folha de café para manter a sua turgidez e evitar a fuga dos ácaros. Cada tratamento consistiu em 10 repetições, com 12 fêmeas adultas de *O. ilicis* por repetição. A pulverização foi realizada utilizando um aerógrafo modelo Alfa 2, conectado a um compressor calibrado com pressão constante de 1.3 bar e 1 mL de solução de cada concentração para cada repetição. As Placas de Petri foram mantidas em câmeras climatizadas do tipo B.O.D., conforme descrição anterior.

Produção enzimática

As culturas fúngicas foram obtidas a partir do isolamento e repicagem da ressuspensão de conídios do formulado comercial Metarril®, conforme prescrito na bula. Os conídios foram ressuspensos em água destilada esterilizada e alíquotas foram adicionadas em meio batata-dextrose-ágar (BDA). Os processos foram realizados em cabine de segurança biológica, sob condições estéreis. Repicagens sucessivas foram realizadas até a obtenção da cultura com colônias de coloração esverdeada, característico da colônia de *M. anisopliae*.

A partir da cultura pura, inoculou-se em tubos de ensaio inclinado contendo o mesmo meio descrito anteriormente. Após o crescimento realizou-se a ressuspensão. Retirou-se uma alíquota e inoculou em frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo arroz polido esterilizado para aumentar a esporulação do fungo.

Como substrato sólido para a fermentação foi utilizado farelo de trigo, sem preferência por marca específica. Em frascos Erlenmeyer (125 mL) foram adicionados o substrato sólido, solução de meio mínimo (K₂HPO₄, MgSO₄, ZnSO₄, FeSO₄ e CuSO₄) e a suspensão de conídios de *M. anisopliae*. Os frascos inoculados foram cultivados sob fermentação em estado sólido para produção de extrato enzimático.

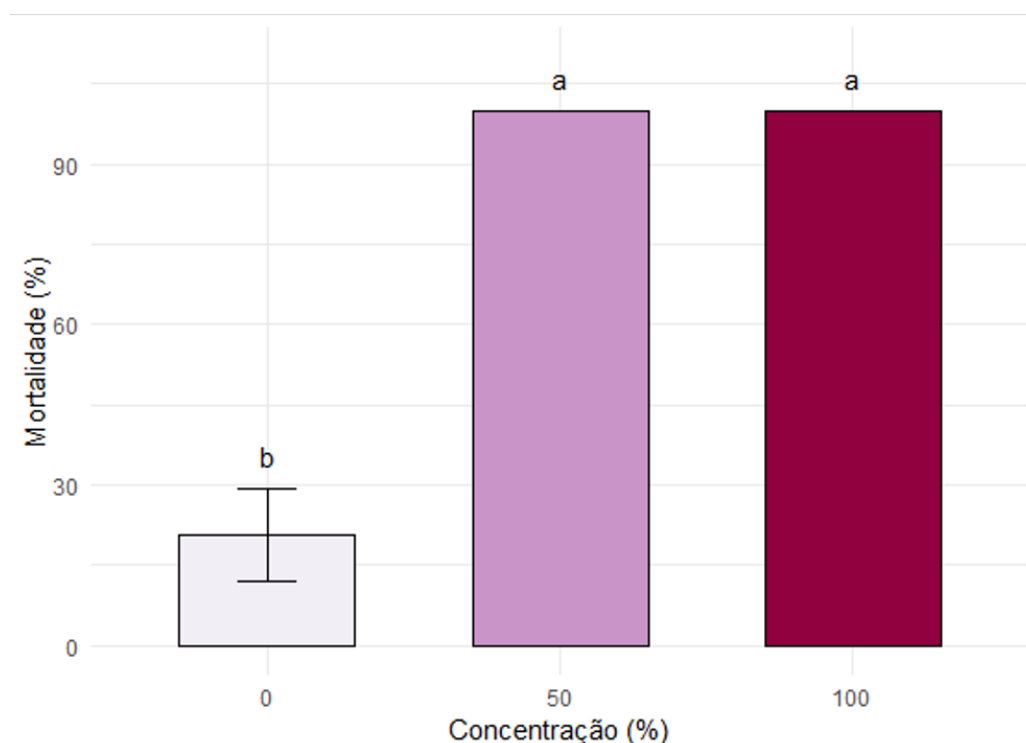
O cultivo foi mantido em BOD a 28 ± 1°C, umidade relativa de 70 ± 10% e 24 horas de escuro, por 7 dias. Com o cultivo fermentado, adicionou-se água destilada aos frascos (1:10 p/v) para isolamento das enzimas secretadas, centrifugou-se por 30min e extraiu-se o sobrenadante como extrato enzimático (Em processo de patente).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Para cada extrato enzimático testado, os dados de mortalidade foram corrigidos pela fórmula de ABBOTT (1925) e posteriormente submetidos ao teste de Kruskal-Wallis para comparar as medianas (p≤0,05). O gráfico foi gerado com o auxílio do programa estatístico R versão 4.2.3 (R CORE TEAM, 2023).

Resultados

O teste de toxicidade do extrato enzimático a partir de *M. anisopliae* sobre *O. ilicis* apresentou mortalidade de 100% a partir da concentração de 50% (Figura 1).

Figura 1- Mortalidade cumulativa da população de *Oligonychus ilicis* pelo extrato enzimático de *Metarhizium anisopliae*. Medianas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância.



Fonte: Os autores (2024).

O extrato enzimático de *M. anisopliae* mostrou potencial bioacaricida em fêmeas adultas de *O. ilicis*, causando mortalidade de 100% dos indivíduos na concentração de 50%, evidenciando que concentrações menores podem ser utilizadas no manejo do ácaro vermelho do cafeeiro (Figura 2). Os tratamentos diferiram entre si do tratamento controle, porém, as medianas de mortalidade obtidas nos tratamentos foram estatisticamente iguais, na concentração de 50%, quanto na de 100%.

Discussão

O controle biológico de artrópodes-praga na agricultura tem se mostrado cada vez mais frequente. Nessa perspectiva, a utilização de fungos entomopatogênicos, integrado a outros métodos de controle de pragas agrícolas, contribui para a promoção de medidas mais sustentáveis no que concerne à segurança alimentar e à proteção ambiental (ALVES, 2014; SOUSA *et al.*, 2023). Isso corrobora com SANTANA *et al.* (2023), que ao avaliarem o potencial do fungo *Beauveria bassiana* no controle do ácaro da necrose *Aceria guerreronis* Keifer (Acari: Eriophyidae), observaram alta letalidade na praga. Além disso, ainda no presente trabalho foi testado a associação de óleos vegetais e calda sulfocálcica no crescimento do fungo, e concluíram que *B. bassiana* e óleo mineral podem ser usados tanto separadamente quanto de forma intercalada, pelo fato de não apresentarem efeito antagônico, otimizando o controle pela integração de métodos.

Na cultura do café, a utilização desses microrganismos tem eficiência comprovada em diferentes organismos, por exemplo, a broca da haste (*Xylosandrus compactus* Eichhof) (Coleoptera: Curculionidae), cochonilhas e ácaros fitófagos (SOUZA, 2019; MORO *et al.*, 2020; LIMA, 2021). A virulência desses fungos se dá por meio da produção de compostos que atuam sobre ácaros e insetos, de modo que, em sua maioria, inibem alguns processos fisiológicos e metabólicos, levando à morte do hospedeiro (MORA; CASTILHO; FRAGA, 2016).

No presente trabalho, 24h após a aplicação do extrato enzimático na concentração de 100%, aspectos como o escurecimento, inchaço do idiossoma e encolhimento dos tarsos foram observados durante as avaliações. Nesse contexto, atribui-se ao êxito da mortalidade à presença de enzimas resultantes da fermentação em estado sólido do farelo de trigo.

Dessa forma, os diferentes compostos produzidos, bem como sua natureza química, estão diretamente associados ao substrato escolhido no processo fermentativo, tempo de fermentação e ao tipo de macro e micronutriente fornecido. Isso foi comprovado por ALVES (2023) ao avaliar o efeito bioacaricida de diferentes extratos enzimáticos no controle do ácaro rajado (*Tetranychus urticae* KOCH, 1836) (Acari: Tetranychidae), onde os diferentes tempos e substratos resultaram em quantidades variadas de protease e lipase produzidas, nesse sentido, os extratos cujos substratos eram farelo de trigo e farelo de trigo mais pó de tenébrio, cultivados por 8 dias, obtiveram mortalidade de 89,3 e 84,5%, respectivamente, enquanto o extrato cujo substrato era composto por farelo de trigo mais azeite de oliva (8 dias) a mortalidade obtida foi de 51,2%.

Além disso, a fermentação em estado sólido (FES) vem ganhando destaque na biotecnologia devido à capacidade de produção enzimática a partir da degradação de polímeros vegetais complexos, nesse sentido, microrganismos como fungos filamentosos estão entre os principais na maquinaria microbiana, principalmente pela capacidade de crescimento mesmo em condições onde há baixo teor de umidade disponível (SANTOS *et al.*, 2018).

Outro ponto a ser discutido está relacionado à fragilidade do exoesqueleto após a aplicação do extrato, com isso, ao encostar as cerdas do pincel para avaliar se haveria movimentação do ácaro, notou-se que o exoesqueleto se deformava facilmente, extravasando os constituintes internos do organismo. Tal situação pode estar associada à ação de lipases ou proteases presentes no extrato. Tais enzimas são capazes de ocasionar modificações superficiais na camada mais externa da cutícula do hospedeiro, com o intuito de adquirir nutrientes, no processo há rompimento de ligações químicas associadas com a rigidez da estrutura (ST. LEGER *et al.*, 1990; BIDOCHKA *et al.*, 1997; RIBEIRO, 2006).

Conclusão

Extrato enzimático de *M. anisopliae* cultivado em farelo de trigo, por 7 dias, mostrou potencial bioacaricida no sobre fêmeas adultas de *O. ilicis*.

Referências

ABBOTT, W. S.; *et al.* Um método para calcular a eficácia de um inseticida. **Journal Economic of Entomology**, v. 18, n. 2, pág. 265-267, 1925.

AGROFIT, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. **Consulta de praga**. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 09 jun. 2024.

ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2014.

ALVES, A. G. **Atividade acaricida de extratos enzimáticos a base de *Metarhizium anisopliae* (HYPOCREALES: CLAVICIPITACEAE) sobre *Tetranychus urticae* (KOCH, 1836) (ACARI: TETRANYCHIDAE)**. Trabalho de Conclusão de Curso, 2023. Disponível em: <https://repositorio.ifes.edu.br/handle/123456789/3480>.

BIDOCHKA, M.J.; *et al.* Mechanisms of deuteromycete fungal infections in grasshoppers and locusts: no overview. **Memo Entomol Sosc Can** 171: 213-224, 1997.

D'ÁVILA, E. A. O. **Risco crônico de intoxicação por ingestão de resíduos de produtos fitossanitários pela população do Espírito Santo**. Dissertação (Mestrado em Defesa Sanitária Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2015. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/9533>.

FERRÃO, R.G.; et al. **Café Conilon**. 2. ed. Vitória: Incaper, 2017. 784p.

FRANCO, R. A.; et al. Influência da Infestação de *Oligonychus Ilcis* (Mcgregor, 1917) (Acari: Tetranychidae) sobre a Taxa de Fotossíntese Potencial de Folhas de Cafeeiro. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.76, p.205-210, 2009.

GOMES, M. da S. **Efeito do extrato hidroalcoólico da casca de lima ácida ‘galego’ (*Citrus aurantifolia* Tanaka) e ‘tahiti’ (*Citrus latifolia* Tanaka) no controle de ácaro vermelho do café *Oligonychus ilicis* (mcgregor, 1917) (acari: tetranychidae)**. Trabalho de Conclusão de Curso, 2020. Disponível em: <https://repositorio.ifes.edu.br/handle/123456789/2858>.

JUNIOR, M. E.; GUARUS, I. F. F. **Controle biológico de insetos pragas**. Rio de Janeiro: I Seminário Mosaico, 2011.

LIMA, L. M. R. ***Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* no controle de *Planococcus* sp. na cultura do cafeeiro em condições de campo**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2021. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/33411>.

MORA, M. A. E.; CASTILHO, A. M. C.; FRAGA, M. E. Fungos entomopatogênicos: enzimas, toxinas e fatores que afetam a diversidade. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 18, p. 335-49, 2016.

MORO, L. B.; et al. Potencial do uso de fungos entomopatogênicos no controle de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) em mamoeiro: efeito de cultivares sobre a patogenicidade. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, p. 267-272, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1808-1657v78p2672011>.

PEREIRA, S. L.; et al. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* fungi to *Tetranychus ludeni* (Acari: Tetranychidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 86, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/18081657000272018>. Acesso em: 09 jun. 2024.

R CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, 2023. <http://www.rproject.org>.

REIS, P.R.; et al. Controle de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) e *Oligonychus ilicis* (McGregor, 1917) (Acari: Tenuipalpidae, Tetranychidae) em cafeeiro e o impacto sobre ácaros benéficos. **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, p.269-281, 2004.

REIS, P.R. Ácaro-vermelho. **Cultivar**, v.7, p.14-17, 2005.

RIBEIRO, T. da. S. **Análise comparativa da secreção de proteases e quitinases do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* na presença de diferentes cutículas de artrópodes**. Dissertação de mestrado, 2006. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/10942>.

SANTANA, S. F.; et al. Potencial do fungo *Beauveria bassiana* no controle do ácaro-da-necrose *Aceria guerreronis* (Acari: Eriophyidae). **Scientia Plena**, v. 19, n. 9, 2023. <https://doi.org/10.14808/sci.plena.2023.080204>.

SANTOS, P. S. dos.; et al. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: uma revisão sistemática. **The Journal of Engineering and Exact Science**, v.4, n.2, 2018.

SOUSA, J. V. P. de.; et al. USO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS UTILIZADOS PARA CONTROLE BIOLÓGICO DE INSETOS-PRAGAS NA AGRICULTURA. **Facit Business and Technology Journal**, v. 2, n. 46, 2023.

SOUZA, R. A. de. **Fungos endofíticos em folhas de cafeeiro: diversidade e potencial entomopatogênico sobre a broca-do-café**. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2019. Disponível em: <http://repositoriobiologico.com.br/jspui/handle/123456789/115>.

SOUZA, G. S. de *et al.* Mechanized harvesting of conilon coffee plants using a self-propelled machine. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 27, p. 140-148, 2023. <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v27n2p140-148>

SOUZA, W. G. de. *et al.* CONTROLE BIOLÓGICO DA FORMIGA-DE-FOGO (*Solenopsis saevissima*) COM OS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*. In: **Congresso Fluminense de Pós-Graduação-CONPG**, 2023.

ST. LEGER.; *et al.* Second messenger involvement in differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **J Genet Microbiol** 136: 1779-1789, 1990.

YUN, K. S.; *et al.* Biological control of the small leafhopper, *Empoasca flavescens* F. (Homoptera: Cicadellidae) using the entomopathogenic fungus, *Verticillium lecanii*. **Egyptian Journal of Pest Control**, v. 33, n. 1, p. 36, 2023. <https://doi.org/10.1186/s41938-023-00682-3>

Agradecimentos

À Fundação de Amparo a Pesquisas no Espírito Santo (Fapes), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Instituto Federal do Espírito Santo (IFES).