



**Tecnologia de aplicação de *Beauveria bassiana*  
(Hypocreales: Cordycipitaceae) no controle de *Hypothenemus hampei*  
(Coleoptera: Curculionidae)**

**Raquel Moraes Costa Pereira**

**Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo**  
**Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios**  
**Instituto Biológico**  
**Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e**  
**Ambiental no Agronegócio**

**Tecnologia de aplicação de *Beauveria bassiana***  
**(Hypocreales: Cordycipitaceae) no controle de *Hypothenemus hampei***  
**(Coleoptera: Curculionidae)**

**Raquel Moraes Costa Pereira**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio. Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

**São Paulo**  
**2020**

**Raquel Moraes Costa Pereira**

**Tecnologia de aplicação de *Beauveria bassiana*  
(Hypocreales: Cordycipitaceae) no controle de *Hypothenemus hampei*  
(Coleoptera: Curculionidae)**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema por meio do Controle Biológico no Manejo Integrado de Pragas.

Orientador: Professor Dr. Antonio Batista Filho

**São Paulo  
2020**

Eu, **Raquel Moraes Costa Pereira**, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico, de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela internet desde que citada a fonte e após autorização do NIT-IB.

Assinatura: \_\_\_\_\_ Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo**  
**Núcleo de Informação e Documentação – IB**

---

Pereira, Raquel Moraes Costa.

Tecnologia de aplicação de *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) no controle de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae). / Raquel Moraes Costa Pereira. - São Paulo, 2020.

112 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA.2020D.RP001

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Linha de pesquisa: Manejo integrado de pragas e doenças em ambientes rurais e urbanos.

Orientador: Antonio Batista Filho.

Versão do título para o inglês: Application technology of *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) in the control of *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae).

1. Eficiência 2. Suspensões 3. Blastosporos 4. Disseminadores 5. IBCB66  
I. Pereira, Raquel Moraes Costa II. Batista Filho, Antonio III. Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

*IB/Bibl./2020/001*

---

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Raquel Moraes Costa Pereira

Título: Tecnologia de aplicação de *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) no controle de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae)

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema por meio do Controle Biológico no Manejo Integrado de Pragas.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.


Aprovada em: 07/07/2020

### Banca Examinadora

Prof. Dr. Antônio Batista Filho

Instituição: APTA

Julgamento: aprovada


Assinatura: 

Prof. Dr. José Eduardo Marcondes de Almeida

Instituição: Instituto Biológico/APTA

Julgamento:

APROVADA

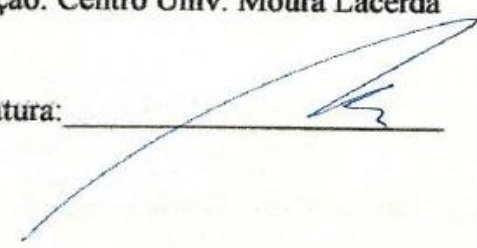
Assinatura: 

Prof. Dr. Alexandre de Sene Pinto

Instituição: Centro Univ. Moura Lacerda

Julgamento:

APROVADA

Assinatura: 

## DEDICATÓRIA

*Dedico,*

*À Deus que é a Mente suprema, superior e onipotente de onde emana todo o saber, à minha mãe Helena Olímpia e ao meu esposo Alexandre Roberto.*

*“Na natureza nada se cria, nada se perde, tudo se transforma...”*

*Antoine Lavoisier*

*“O problema imaginado por minha mente foi solucionado pelo céu luminoso do Brasil”*

*Albert Einstein*

*“Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei nos ombros de gigantes”*

*Isaac Newton*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço,

Ao Instituto Biológico e ao Programa de Pós-graduação pela oportunidade de ter sido discente nesta Instituição de pesquisa qualificada e reconhecida nacionalmente e de importância significativa no desenvolvimento da sanidade, saúde e segurança alimentar na agricultura do país.

À FUNDAG – Fundação de Apoio à Pesquisa Agrícola pelo apoio e concessão da bolsa de estudos, pois sem a mesma seria muito difícil minha participação nesta jornada.

Ao Dr. Antonio Batista Filho, por aceitar ser meu orientador mesmo diante de todo trabalho como diretor do Instituto Biológico e, posteriormente, seus desafios e novas responsabilidades ao assumir a coordenação da APTA- Agência Paulista de Tecnologias do Agronegócio.

Ao Dr. José Eduardo Marcondes de Almeida, por sua atenção e paciência como coorientador e professor, pela confiança e ensinamentos como pesquisador, por inspirar e estimular o meu desenvolvimento profissional no controle biológico de pragas de forma multidisciplinar, íntegra e dinâmica.

Ao Dr. Alexandre de Sene Pinto, pela gentil participação na banca de qualificação, ocasião na qual deu várias dicas preciosas para continuidade da escrita do trabalho e pela atenção especial na banca da defesa. Foram de grande valia todas as considerações.

À pesquisadora Harumi Hojo, pelo apoio direto ao andamento dos trabalhos no cafezal de São Paulo, pela paciência, atenção e disposição em ajudar sempre.

A todos do Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde Animal-CAPSA, em especial aos membros do Laboratório de Controle Biológico pela ajuda com materiais, convivência e colaboração.



Aos colegas de pós-graduação da turma 2018/2020, em especial à Regiane e ao Mateus que me ajudaram no início das coletas de grãos de café brocados. Foi muito legal!

Ao Dr. Ricardo Harakava e aos colegas do laboratório de Fitopatologia e Bioquímica pela atenção, apoio e disponibilização do uso de materiais e equipamentos durante os experimentos no cafezal de São Paulo.

Aos professores das disciplinas cursadas, pela atenção e compartilhamento dos conhecimentos importantíssimos nessa seara da Sanidade e Segurança no Agronegócio.

À minha família e amigos, pelo eterno apoio e por acreditarem na minha capacidade, em especial à minha mãe Helena Olímpia e meu esposo Alexandre Roberto.

A todos que conheci durante a trajetória do mestrado, pois tive a oportunidade de conhecer pessoas de outros países e de outros estados, de adquirir novos conhecimentos e novas experiências para a minha carreira profissional e meu crescimento como pesquisadora científica na área do agronegócio brasileiro.

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

## RESUMO

PEREIRA, Raquel Moraes Costa. **Tecnologia de aplicação de *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) no controle de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae)** 2020. 116 f. 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, 2020.

O objetivo da pesquisa foi avaliar a eficiência de diferentes métodos de aplicação do fungo *Beauveria bassiana* IBCB66 no controle de *Hypothenemus hampei*. Foram realizados dez experimentos em laboratório com aplicação de suspensões com blastosporos e com conídios aéreos de *B. bassiana* IBCB66, por três métodos de aplicação: imersão, pulverização em Torre de Potter e caminhamento sobre conídios aéreos em pó. As suspensões foram padronizadas em  $2,4 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^7$  e  $1 \times 10^7$  conídios/mL<sup>-1</sup> e o pó com concentrações  $1,14 \times 10^9$ ;  $5,7 \times 10^9$ ;  $1,14 \times 10^8$ ;  $5,7 \times 10^7$ ;  $1,14 \times 10^7$  e  $5,7 \times 10^6$  conídios/g. Em campo foram realizados experimentos com os métodos: sachês disseminadores; pulverização e polvilhamento na planta e em solo. Com os sachês foram dois experimentos por 24 horas; um experimento por 15 dias e um experimento por 30 dias. Para os experimentos de 24 horas e 15 dias, foram cinco tratamentos com sachês de diferentes materiais, com concentrações de conídios em arroz+fungo em  $2 \times 10^9$  conídios/g e conídios aéreos em pó em  $1 \times 10^{10}$  conídios/g, com uma testemunha e cinco repetições. Para os sachês por 30 dias foram quatro tratamentos e uma testemunha, com a concentração do pó de conídios aéreos de *B. bassiana* em  $5,98 \times 10^9$  conídios/g. Com os métodos de aplicação por pulverização e polvilhamento em planta e em solo, nos experimentos I e II foi utilizada calda feita com pó molhável (WP) Ecobass® em  $2 \times 10^{13}$ /ha, para o experimento III a calda foi feita com blastosporos de IBCB66 em  $5 \times 10^{12}$ /ha + Silwet a 0,1%. O polvilhamento foi feito com pó arroz+fungo (CP) com a concentração em  $2 \times 10^{13}$ /ha. Os dados obtidos foram analisados por meio do teste ANOVA seguido de teste de Tukey a 5%, por meio do software SISVAR® e o teste de Duncan a 5 % por meio do software SPSS® Statics, versão 12.1. O método mais eficiente em laboratório foi o caminhamento sobre pó de conídios aéreos nas concentrações  $1 \times 10^{10}$  e  $1 \times 10^8$  conídios/g. Para os experimentos I, II e III, mesmo após a terceira aplicação os índices de frutos brocados mantiveram-se altos. O sachê disseminador mais eficiente foi o papel filtro furado contendo conídios de IBCB66 puros, com maior média de UFCs por ponto e custo de R\$ 0,26 a unidade. Os conídios dos sachês expostos em campo após 30 dias apresentaram viabilidade acima de 89%. Os métodos de aplicação do fungo *B. bassiana* utilizados nesta pesquisa apresentaram eficiência no controle de *H. hampei*.

**Palavras-chave:** Eficiência. Suspensões. Blastosporos. Disseminadores. IBCB66. Conídio pó.

## ABSTRACT

PEREIRA, Raquel Moraes Costa. **Tecnologia de aplicação de *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) no controle de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae)**. 2020. xx f. 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.

The objective of the research was to evaluate the efficiency of different methods of application of the fungus *Beauveria bassiana* IBCB66 in the control of *Hypothenemus hampei*. Ten experiments were carried out in the laboratory with the application of suspensions with blastospores and with *B. bassiana* IBCB66 aerial conidia, by three application methods: immersion, spraying in Potter Tower and walking over powdered aerial conidia. The suspensions were standardized at  $2.4 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^7$  and  $1 \times 10^7$  conidia/mL<sup>-1</sup> and the powder with concentrations of  $1.14 \times 10^9$ ;  $5.7 \times 10^9$ ;  $1.14 \times 10^8$ ;  $5.7 \times 10^7$ ;  $1.14 \times 10^7$  and  $5.7 \times 10^6$  conidia/g. In the field, experiments were carried out with the methods: disseminating sachets; spraying and sprinkling on the plant and soil. The sachets were two experiments for 24 hours; an experiment for 15 days and an experiment for 30 days. For the experiments of 24 hours and 15 days, there were five treatments with sachets of different materials, with concentrations of conidia in rice+fungus in  $2 \times 10^9$  conidia/g and aerial powder conidia in  $1 \times 10^{10}$  conidia/g, with a control and five repetitions. For sachets for 30 days there were four treatments and one control, with the concentration of *B. bassiana* aerial conidia powder in  $5.98 \times 10^9$  conidia / g. With the methods of application by spraying and sprinkling on plants and on the ground, in experiments I and II, grout made with wettable powder (WP) Ecobass® was used in  $2 \times 10^{13}$ /ha, for experiment III the grout was made with blastospores of IBCB66 in  $5 \times 10^{12}$  /ha + 0.1% Silwet. The sprinkling was done with powder rice + fungus (CP) with the concentration in  $2 \times 10^{13}$ /ha. The data obtained were analyzed using the ANOVA test followed by the Tukey test and 5%, using the SISVAR® software and the 5% Duncan test using the SPSS® Statics software, version 12.1. The most efficient method in the laboratory was walking on aerial conidia powder at concentrations  $1 \times 10^{10}$  and  $1 \times 10^8$  conidia/g. For experiments I, II and III, even after the third application, the brocade fruit indexes remained high. The most efficient disseminating sachet was the perforated filter paper containing pure IBCB66 conidia, with a higher average of UFCs per point and a cost of R \$ 0.26 per unit. Conidia of sachets exposed in the field after 30 days showed viability above 89%. The *B. bassiana* fungus application methods used in this research showed efficiency in the control of *H. hampei*.

**Keywords:** Efficiency. Suspensions. Blastospores. Disseminators. IBCB66. Conidium powder.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – A: *Hypothenemus hampei* vista dorsal; B: *H hampei* vista lateral; C: Macho de *H. hampei* com élitros levantados; D: Fêmea de *H. hampei* com asa membranosa exposta. **Fonte:** Imagens: A- adaptada de VEGA *et al.*, 2015; B – adaptada de Oliveira Filho (1927) – Arquivos do Instituto Biológico; C e D adaptadas de FUNDACCER, 2016..... 30
- Figura 2** – Ciclo de vida de *Hypothenemus hampei*, a broca-do-café; A- ovos; B- larva; C- Pupa fêmea; D – Adulto fêmea. **Fonte:** Adaptada de: COSTA, V. A., CAPSA, IB, Campinas - SP..... 30
- Figura 3** – A: sementes infestadas ainda dentro do pergaminho; B: Sementes de fruto verde com broca e presença de fungos na câmara escavada; C: fruto maduro infestado e apresentando ‘Dust/frass’; D: fruto maduro e seco com furos no pergaminho. **Fonte:** RMC Pereira, 2019..... 31
- Figura 4** – A, B, C: armadilhas em pet modelos IAPAR; D: armadilha industrializada. **Fonte:** Imagens adaptadas: A, B e C: do manual de combate à broca-do-café EMBRAPA/FUNDACCER, D: terraviva.com.br..... 32
- Figura 5** - A: Cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar (*Mahanarva fimbriolata*) morta pelo fungo *Metarhizium anisopliae*; B: Adulto do percevejo de renda da seringueira (*Leptopharsa heveae*) morto por *Sporothrix insectorum*; C: *Diaphorina citri* morta por *Beauveria bassiana*; D: Spodoptera exígua morta por *Nomuraea rileyi*. **Fonte:** Imagens adaptadas: A: Revista Strider; B: Alves R. Teixeira; Pinto *et. al*, 2012; C e D: 5368209 invasive.org..... 35
- Figura 6** – Estruturas de *Beauveria bassiana*: A: corpos hifais; B: hifas com fiálides e conidióforos; C, D e E: germinação de um aglomerado de conídios, F: conídios. **Fonte:** bcrc.firdi.org.tw, 2019..... 38
- Figura 7** – A: *Prorops nasuta*; B: *Cephalonomia stephanoderis* parasitando larva de *Hypothenemus hampei*; C: female *Phymastichus coffea*. **Fonte:** Imagens adaptadas: A: Dr. Valmir Costa, CAPSA – Campinas; B: Rodrigues & Covas – Universidade de Porto Rico; C: Dr Georg Goergen, International Institute of Tropical Agriculture, Benin, by Jaramillo..... 38
- Figura 8** – Laboratório de Controle Biológico - CAPSA- Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde, Campinas, SP, Brasil. **Fonte:** RMC Pereira, 2019..... 44
- Figura 9** – Cafezal - CAPSA- Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde; 22°54’22”S (Lat.) e 47°00’56”W (Long.). Área delimitada em amarelo corresponde a área da pesquisa. **Fonte:** Imagem adaptada de: Google Earth, 2019.... 44
- Figura 10** – Cafezal do Instituto Biológico em São Paulo, SP, 23°35’16”S (Lat.) e 46°39’00”W (Long.). Área delimitada em amarelo corresponde a área da pesquisa. **Fonte:** Imagem adaptada de: Google Earth, 2019..... 45

<b>Figura 11</b> – Frutos de café brocados dispostos em bandejas enquanto as gaiolas eram higienizadas. <b>Fonte:</b> RMC Pereira, 2018.....	45
<b>Figura 12</b> – Criação de <i>Hypothenemus hampei</i> em condições de laboratório: A: grãos coletados; B: higienização; C: secagem; D: Gaiolas; E: triagem durante o manejo; F: caixas de criação. <b>Fonte:</b> RMC Pereira, 2018/2019.....	46
<b>Figura 13</b> – Tampa superior da gaiola com mais de 20 insetos, no momento do manejo diário. <b>Fonte:</b> RMC Pereira, 2019.....	47
<b>Figura 14</b> – UFC's de IBCB66 após ficarem em câmara tipo B.O.D. ( $26 \pm 1$ °C) vista sob estereomicroscópio Stemí DV4 Zeizz® em ampliação de 16 vezes – A: colônias após 24 horas; B: colônias após 7 dias. <b>Fonte:</b> RMC Pereira, 2019.....	47
<b>Figura 15</b> – Reprodução da cepa IBCB66: A: autoclave; B: sacos de polipropileno com arroz esterilizados em resfriamento; C: preparo da suspensão para inoculação; D: inoculação; E: fermentação em sala climatizada. <b>Fonte:</b> RMC Pereira, 2019.....	48
<b>Figura 16</b> – A: meio de cultura autoclavado; B: meio de cultura após inoculação da cepa IBCB66 e fermentação por 7 dias em agitador. <b>Fonte:</b> RMC Pereira, 2019.....	49
<b>Figura 17</b> – Processo de retirada de <i>Hypothenemus hampei</i> para os experimentos: A: brocas na gaiola; B: brocas no papel toalha na caixa de criação; C: separação com pincel macio e disposição em placas de petri esterilizadas. <b>Fonte:</b> RMC Pereira, 2019.....	49
<b>Figura 18</b> – A: microscópio óptico, contador manual e placas com fungo inoculado com IBCB 66 após 15 horas em câmara climatizada tipo B.O.D. ( $26 \pm 1$ °C); B: conídios germinados e não germinados vistos sob microscópio óptico em ampliação de 400 x. <b>Fonte:</b> RMC Pereira, 2019.....	50
<b>Figura 19</b> – Métodos de aplicação: A: por imersão com suspensão com blastosporos; B: por pulverização de suspensão com conídios aéreos em Torre de Potter; C: por caminhamento sobre pó de conídios aéreos. <b>Fonte:</b> RMC Pereira, 2019.....	50
<b>Figura 20</b> - Colocação de dieta após 24 horas da realização do experimento. <b>Fonte:</b> RMC Pereira, 2019.....	52
<b>Figura 21</b> – Avaliação da mortalidade e evolução da esporulação por IBCB66: A: acompanhamento da mortalidade sob estereomicroscópio; B: painel da câmara climatizada; C: insetos mortos em câmara úmida e na prateleira da câmara climatizada; D e E, insetos mortos com esporulação apresentada após 72 horas da constatação do óbito. <b>Fonte:</b> RMC Pereira, 2019.....	53
<b>Figura 22</b> - Avaliação dos frutos após coleta prévia: A: fruto perfurado; B: observação sob estereomicroscópio; C: constatação da ocorrência de <i>Hypothenemus hampei</i> . <b>Fonte:</b> RMC Pereira, 2019.....	54

<b>Figura 23</b> – Campo demarcado e bandejas em dia de coleta: A: plantas Mundo Novo; B: início de parcela da cultivar Catuaí. <b>Fonte:</b> RMC Pereira, 2019.....	54
<b>Figura 24</b> – Preparação da calda em campo: A: Materiais para a preparação da calda; B: Atomizador costal utilizado nas pulverizações. <b>Fonte:</b> RMC Pereira, 2019.....	55
<b>Figura 25</b> – A: pesagem do material em polvilhadeira manual estéril; B: aplicação na cultivar Mundo Novo. <b>Fonte:</b> RMC Pereira, 2019.....	55
<b>Figura 26</b> – A: bandejas com potes plásticos em dia de coleta; B: material de campo em fase de análise; C: grãos após as análises de cada coleta dispostos em bandejas. <b>Fonte:</b> RMC Pereira, 2019.....	56
<b>Figura 27</b> – Preparação de calda com blastosporos de IBCB66: A: blastosporos de IBCB66 e espalhante Silwet; B: costal já com a calda e em campo. <b>Fonte:</b> RMC Pereira, 2019.....	56
<b>Figura 28</b> – Confeção de sachês disseminadores com diferentes materiais: A: sachês de gaze de algodão; B: sachês de papel sulfite; C: sachês de papel filtro; D: sachê de papel filtro sendo furado e pronto para campo. <b>Fonte:</b> RMC Pereira, 2019.....	58
<b>Figura 29</b> – Processo de extração de conídios aéreos de IBCB66: A: material em fluxo laminar B: peneiramento de arroz+fungo; C: peneira. <b>Fonte:</b> RMC Pereira, 2019.....	58
<b>Figura 30</b> – Teste para verificação de viabilidade: A: material em fluxo laminar; B: placa de petri observada durante a contagem dos conídios viáveis, ampliação em microscópio óptico 100x. <b>Fonte:</b> RMC Pereira, 2019.....	59
<b>Figura 31</b> – Figura sem escala representando a marcação dos pontos para cada repetição do experimento I. <b>Fonte:</b> RMC Pereira, 2019.....	60
<b>Figura 32</b> – Figura sem escala representando a marcação dos pontos para cada repetição do experimento II. <b>Fonte:</b> RMC Pereira, 2019.....	60
<b>Figura 33</b> – A: sachê de gaze de algodão com substrato de arroz+fungo no ponto 1; B: placa de petri após as 24 horas; C: placas de petri de todas as repetições após a retirada de campo; D: placas de Petri dispostas em câmara climatizada tipo B.O.D. <b>Fonte:</b> RMC Pereira, 2019.....	61
<b>Figura 34</b> – A: placas de Petri do experimento I após 4 dias em câmara climatizada tipo B.O.D. e após a contagem das UFC's; B: placa de petri com maior número de UFC de <i>Beauveria bassiana</i> . <b>Fonte:</b> RMC Pereira, 2019.....	61
<b>Figura 35</b> – Teste de viabilidade, em fluxo laminar, com o conteúdo dos sachês de papel sulfite após 15 dias em campo. <b>Fonte:</b> RMC Pereira, 2019.....	62

<b>Figura 36</b> – Figura sem escala representando a marcação dos pontos para cada repetição do experimento com sachês disseminadores no cafezal de São Paulo - SP. <b>Fonte:</b> RMC Pereira, 2019.....	64
<b>Figura 37</b> - A: <i>Hypothenemus hampei</i> após 48 horas da pulverização da suspensão fúngica em Torre de Potter; 1 = <i>H. hampei</i> viva e ovo em grão da dieta; 2 = <i>H. hampei</i> morta e sem esporulação; B: <i>H. Hampei</i> em esporulação após 96 horas da imersão em suspensão de blastosporos IBCB66; C: <i>H. Hampei</i> em esporulação após 96 horas do caminhar sobre pó <i>Beauveria bassiana</i> . <b>Fonte:</b> RMC Pereira, 2019.	70
<b>Figura 38</b> - Experimento III, cultivar Catuaí, imagens das análises da coleta 2 após a segunda aplicação: A: fruto Catuaí brocado; B: broca morta e infectada com <i>Beauveria bassiana</i> ; C larvas de <i>Hypothenemus hampei</i> . <b>Fonte:</b> RMC Pereira, 2019.	76
<b>Figura 39</b> - Frutos observados após o experimento III da cultivar Catuaí; A= brocas infectadas em planta não marcada porém dentro da área delimitada; B= brocas infectadas observada em planta fora da área delimitada na pesquisa. <b>Fonte:</b> RMC Pereira, 2020.....	75
<b>Figura 40</b> - Média de UFC de IBCB66 capturadas em placas de Petri contendo BDA, no período de 25 a 26/04/2019, sem sachês. <b>Fonte:</b> RMC Pereira, 2020.....	79
<b>Figura 41</b> - Média de UFC de IBCB66 capturadas em placa de Petri no período de 26 a 27/04/2019. Experimento I, T2, sachês de gaze de algodão contendo 10g de arroz+fungo. <b>Fonte:</b> RMC Pereira, 2020.....	79
<b>Figura 42</b> - Média de UFC de IBCB66 capturadas em placa de Petri no período de 27 a 28/04/2019. Experimento I, T3, sachês de papel filtro contendo arroz+fungo. <b>Fonte:</b> RMC Pereira, 2020.....	80
<b>Figura 43</b> - Média de UFC de IBCB66 capturadas em placa de Petri no período de 28 a 29/04/2019. Experimento I, T4, sachês de papel sulfite contendo arroz+fungo. <b>Fonte:</b> RMC Pereira, 2020.....	80
<b>Figura 44</b> - Média de UFC de IBCB66 capturadas em placa de Petri no período de 28 a 29/04/2019, Experimento I, T5, sachês de papel filtro furado contendo conídios aéreos puros. <b>Fonte:</b> RMC Pereira, 2020.....	81
<b>Figura 45</b> - Média de UFC de IBCB66 capturadas em placas de Petri contendo BDA, no período de 15 a 16/05/2019. Experimento II, T1 sem sachês. <b>Fonte:</b> RMC Pereira, 2020.....	82
<b>Figura 46</b> - Média de UFC de IBCB66 capturadas em placa de Petri no período de 16 a 17/05/2019. Experimento II, T2, sachês de gaze de algodão contendo 10g de arroz+fungo. <b>Fonte:</b> RMC Pereira, 2020.....	82
<b>Figura 47</b> - Média de UFC de IBCB66 capturadas em placa de Petri no período de 17 a 18/05/2019. Experimento II, T3, sachês de papel filtro contendo arroz+fungo. <b>Fonte:</b> RMC Pereira, 2020.....	83

<b>Figura 48</b> - Média de UFC de IBCB66 capturadas em placa de Petri no período de 18 a 19/05/2019. Experimento II, T4, sachês de papel sulfite contendo arroz+fungo. <b>Fonte:</b> RMC Pereira, 2020.....	83
<b>Figura 49</b> - Média de UFC de IBCB66 capturadas em placa de Petri no período de 19 a 20/05/2019, Experimento II, T5, sachês de papel filtro furado contendo conídios aéreos puros. <b>Fonte:</b> RMC Pereira, 2020.....	82
<b>Figura 50</b> - Aplicação 1, coleta 1, novembro 2019. Média de brocas-do-café vivas e mortas infectadas por <i>B. bassiana</i> por ponto e por tratamento.....	87
<b>Figura 51</b> - Aplicação 1, coleta 2, dezembro 2019. Média de brocas-do-café vivas e mortas infectadas por <i>B. bassiana</i> por ponto e por tratamento.....	88
<b>Figura 52</b> - Aplicação 2, coleta 1, dezembro 2019. Média de brocas-do-café vivas e mortas infectadas por <i>B. bassiana</i> por ponto e por tratamento.....	88
<b>Figura 53</b> - Aplicação 2, coleta 2, janeiro 2020. Média de brocas-do-café vivas e mortas infectadas por <i>B. bassiana</i> por ponto e por tratamento.....	88
<b>Figura 54</b> - Aplicação 3, coleta 1, janeiro 2020. Média de brocas-do-café vivas e mortas infectadas por <i>B. bassiana</i> por ponto e por tratamento.....	89
<b>Figura 55</b> - Aplicação 3, coleta 2, fevereiro 2020. janeiro 2020. Média de brocas-do-café vivas e mortas infectadas por <i>B. bassiana</i> por ponto e por tratamento.....	89
<b>Figura 56</b> - A: sachês de papel filtro furado com pouca alteração no material de confecção e com o restante dos conídios aéreos em pó após 30 dias em campo; B: pesagem do conteúdo restante de conídios aéreos do sachê do tratamento 2 ponto 1. <b>Fonte:</b> RMC Pereira, 2020.....	90
<b>Figura 57</b> - Sachê com dispositivo auxiliar para potencialização da disseminação de conídios aéreos em pó. <b>Fonte:</b> RMC Pereira, 2019.....	91
<b>Figura 58</b> - Registros por ano, dos inseticidas para diferentes culturas. <b>Fonte:</b> imagem adaptada de Sistema Agrotóxico e Fitossanitário – MAPA, 2019.....	94
<b>Figura 59</b> - Registros por ano, dos inseticidas para diferentes culturas. <b>Fonte:</b> imagem adaptada de Sistema Agrotóxico e Fitossanitário – MAPA, 2019.....	94
<b>Figura 60</b> - Registros por ano, dos inseticidas microbiológicos para a cultura cafeeira. <b>Fonte:</b> imagem adaptada de Sistema Agrotóxico e Fitossanitário – MAPA, 2019.....	95



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Porcentagem média da viabilidade de conídios aéreos mL <sup>-1</sup> e de Ufc's de blastosporos de <i>Beauveria bassiana</i> IBCB66 para os experimentos realizados em laboratório.....	65
<b>Tabela 2</b> – Mortalidade de <i>Hypothenemus hampei</i> infectada com suspensão de blastosporos de <i>Beauveria bassiana</i> aplicados por imersão (26 ± 1° C ; UR ± 47).....	66
<b>Tabela 3</b> – Mortalidade de <i>Hypothenemus hampei</i> infectada com suspensão de conídios aéreos de <i>Beauveria bassiana</i> aplicados por pulverização em Torre de Potter (26 ± 1 °C; UR ± 47).....	67
<b>Tabela 4</b> – Mortalidade de <i>Hypothenemus hampei</i> infectada com de conídios aéreos de <i>Beauveria bassiana</i> em pó aplicados por caminhamento (25 ± 1° C; UR ± 47).....	68
<b>Tabela 5</b> – Mortalidade média de <i>Hypothenemus hampei</i> infectada com conídios aéreos de <i>Beauveria bassiana</i> e blastosporos por diferentes métodos de aplicação de forma simultânea (25 ± 1 °C; UR ± 47).....	69
<b>Tabela 6</b> - Porcentagem média da viabilidade de conídios aéreos mL <sup>-1</sup> e de Ufc's de blastosporos de IBCB66 para os experimentos realizados no cafezal de São Paulo.....	70
<b>Tabela 7</b> – Cultivar Mundo Novo. Porcentagem de frutos brocados por <i>Hypothenemus hampei</i> em coleta prévia realizada em 10/12/2018, apenas com a demarcação das repetições (28 ± 1 °C na data da coleta).....	71
<b>Tabela 8</b> – Porcentagem de frutos brocados por <i>Hypothenemus hampei</i> após a primeira aplicação de conídios de <i>Beauveria bassiana</i> para o período de 17/12/2018 a 17/01/2019 (34 ± 1 °C) na data da aplicação).....	72
<b>Tabela 9</b> – Porcentagem de frutos brocados por <i>Hypothenemus hampei</i> após a segunda aplicação de conídios de <i>Beauveria bassiana</i> para o período de 18/01/2019 a 17/02/2019 (28 ± 1 °C na data da aplicação).....	72
<b>Tabela 10</b> – Porcentagem de frutos brocados por <i>Hypothenemus hampei</i> após a terceira aplicação de conídios de <i>Beauveria bassiana</i> para o período de 18/02/2019 a 17/03/2019 (27 ± 1 °C na data da aplicação).....	73
<b>Tabela 11</b> – Porcentagem de frutos brocados por <i>Hypothenemus hampei</i> em coleta prévia em 07/12/2018, apenas com a demarcação das repetições (27 ± 1 °C) na data da coleta).....	73
<b>Tabela 12</b> – Porcentagem de frutos brocados por <i>Hypothenemus hampei</i> após a primeira aplicação de conídios de <i>Beauveria bassiana</i> para o período de 17/12/2018 a 17/01/2019 (34 ± 1 °C na data da aplicação).....	74
<b>Tabela 13</b> – Porcentagem de frutos brocados por <i>Hypothenemus hampei</i> após a segunda aplicação de conídios de <i>Beauveria bassiana</i> para o período de 18/01/2019 a 17/02/2019 (28 ± 1 °C na data da aplicação).....	74

<b>Tabela 14</b> – Porcentagem de frutos brocados por <i>Hypothenemus hampei</i> após a terceira aplicação de conídios de <i>Beauveria bassiana</i> para o período de 18/02/2019 a 17/03/2019 ( $27 \pm 1$ °C na data da aplicação).....	75
<b>Tabela 15</b> - Frutos atacados (%) por broca-do-café, <i>Hypothenemus hampei</i> , tratados com pulverização de suspensão de blastosporos de IBCB66 e polvilhamento com conídios de <i>Beauveria bassiana</i> em área de café Catuaí (São Paulo-SP).....	76
<b>Tabela 16</b> - Porcentagem média da viabilidade de conídios aéreos mL <sup>-1</sup> de <i>Beauveria bassiana</i> , antes da realização dos experimentos realizados nos cafezais de Campinas – SP e São Paulo – SP.....	78
<b>Tabela 17</b> - Número de Unidades Formadoras de Cólônias (UFC média) de <i>Beauveria bassiana</i> aplicados com sachês disseminadores em oito pontos de coleta 24 horas após a aplicação (Campinas-SP).....	85
<b>Tabela 18</b> - Número de Unidades Formadoras de Cólônias (UFC média) de <i>Beauveria bassiana</i> aplicados com sachês disseminadores, em cinco repetições com oito pontos cada, avaliados a cada 3, 7, 10 e 14 dias. UFC capturadas em Placas de Petri por 24 horas em campo na data (Campinas-SP).....	85
<b>Tabela 19</b> - Porcentagem média da viabilidade de conídios aéreos/mL <sup>-1</sup> de <i>Beauveria bassiana</i> , após a retirada de campo. Cafezal Campinas, SP.....	86
<b>Tabela 20</b> - Frutos atacados (%) por broca-do-café, <i>Hypothenemus hampei</i> , tratados conídios de <i>Beauveria bassiana</i> aplicados por meio de sachê disseminadores (São Paulo - SP).....	87
<b>Tabela 21</b> - Porcentagem média da viabilidade de conídios aéreos de <i>Beauveria bassiana</i> restantes nos sachês de papel filtro furado após a retirada de campo. Cafezal São Paulo, SP.....	90
<b>Tabela 22</b> - Média (g) de peso final dos sachês de papel filtro furado após a retirada de campo. Cafezal São Paulo, SP.....	91
<b>Tabela 23</b> - Custos individuais estimados para os materiais de confecção dos sachês disseminadores e do substrato arroz+fungo e conídio pó puro de <i>B. bassiana</i> .....	93
<b>Tabela 24</b> - Custos gerais para a confecção de sachês disseminadores de conídios aéreos de IBCB66 com diferentes materiais contendo arroz+fungo ou 1g de conídio puro e custo por hectare considerando um alcance de disseminação de conídios em um raio de 5 m.....	93

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
2.1	Objetivo geral.....	23
2.2	Objetivos específicos.....	23
<b>3.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>24</b>
3.1	A cultura cafeeira no mundo e no Brasil.....	24
3.2	Pragas do cafeeiro.....	26
3.3	<i>Hypothenemus hampei</i> , a broca-do-café.....	28
3.3.1	Aspectos biológicos, fisiológicos, etológicos e morfológicos.....	29
3.3.2	Danos causados ao café.....	31
3.4	Controle biológico.....	32
3.4.1	Fungos entomopatogênicos.....	35
3.4.2	<i>Beauveria bassiana</i> .....	36
3.4.3	Controle biológico de <i>Hypothenemus hampei</i> .....	38
3.5	Tecnologia de aplicação para fungos entomopatogênicos.....	39
3.6	Estudos econômicos.....	41
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>44</b>
4.1	Área de desenvolvimento da pesquisa.....	44
4.2	Criação de <i>Hypothenemus hampei</i> em laboratório.....	45
4.3	Isolado de <i>Beauveria bassiana</i> IBCB66.....	47
4.3.1	Reprodução da cepa IBCB66 para os bioensaios.....	48
4.4	Avaliação dos métodos de aplicação: imersão, pulverização em Torre de Potter e caminhamento, em adultos de <i>Hypothenemus hampei</i> , em condições de laboratório.....	49
4.5	Avaliação dos métodos de aplicação por pulverização e polvilhamento de <i>Beauveria bassiana</i> no cafezal de São Paulo, SP.....	53
4.6	Avaliação de disseminadores de conídios de <i>Beauveria bassiana</i> no cafezal de Campinas, SP.....	57
4.6.1	Sachês por 24 horas.....	59
4.6.2	Sachês por 15 dias.....	62
4.7	Avaliação de disseminadores de conídios de <i>Beauveria bassiana</i> em campo, São Paulo, SP.....	63

4.7.1	Sachês por 30 dias.....	63
4.8	Estudos econômicos.....	64
4.9	Análise estatística.....	64
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>65</b>
5.1	Mortalidade de fêmeas adultas de <i>H. hampei</i> em laboratório.....	65
5.1.1	Aplicação de suspensão por imersão.....	65
5.1.2	Aplicação de suspensão por pulverização em Torre de Potter.....	66
5.1.3	Aplicação por caminhamento sobre conídios aéreos em pó.....	68
5.1.4	Experimento com três métodos de aplicação simultâneos.....	69
5.2	Experimentos de campo, cafezal de São Paulo, SP.....	70
5.2.1	Experimento I, cultivar Mundo Novo.....	71
5.2.2	Experimento II, cultivar Catuaí.....	73
5.2.3	Experimento III, cultivar Catuaí.....	75
5.3	Avaliação de disseminadores de conídios aéreos nos cafezais de Campinas, SP e São Paulo, SP.....	78
5.3.1	Sachês por 24 horas, experimento I, Cafezal Campinas, SP.....	78
5.3.2	Sachês por 24 horas, experimento II, Cafezal Campinas, SP.....	81
5.3.3	Sachês por 15 dias, Cafezal Campinas, SP.....	85
5.3.4	Sachês por 30 dias, Cafezal São Paulo, SP.....	86
5.4	Estudos econômicos.....	92
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>97</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>98</b>
	<b>ANEXO I.....</b>	<b>110</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Uma das “commodities” mais importantes do Brasil é um arbusto da família Rubiaceae e do gênero *Coffea*, o café, cultura que tem uma história importante e de destaque (D’AGOSTINI et al. 2008). O cultivo teve início no estado do Pará e, posteriormente, devido às condições climáticas favoráveis, teve seu cultivo ampliado rapidamente em estados como Maranhão, Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Minas Gerais. O café era então uma cultura secundária no cenário nacional, entretanto em pouco tempo tornou-se um dos produtos-base da economia brasileira (CARVALHO, 2007).

Com a expansão da cultura cafeeira em um país tropical, também vieram problemas com doenças e pragas. Em 1927 foi fundado o Instituto Biológico de Defesa Agrícola e Animal, sob a direção de Arthur Neiva, com o objetivo de desenvolver técnicas fitossanitárias e métodos de controle de uma das principais pragas da cultura cafeeira: a broca-do-café. Desde então pesquisas são feitas e demais estudos sobre esta praga, além da divulgação de conhecimento científico aos cafeicultores (REBOUÇAS et al. 2009; REBOUÇAS, 2017).

O Brasil é hoje o maior produtor e exportador de café e segundo maior consumidor do produto no mundo (SOUZA et al. 2013; CONAB, 2017). O fato de o país possuir uma variedade de climas, relevos, altitudes e latitudes que permitem a produção de uma ampla gama de tipos e qualidades de cafés que alcançam alto valor comercial colaboram para esses fatos (BRASIL, 2017).

O parque cafeeiro brasileiro está estimado em 2,22 milhões de hectares. São cerca de 287 mil produtores, predominando mini e pequenos, em aproximadamente 1.900 municípios que, fazem parte de associações e cooperativas. De acordo com informações da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a área cultivada no país totaliza 2,16 milhões de hectares, com o crescimento de 1,4% em relação a 2019 (CONAB 2017; CONAB 2020).

A espécie *Coffea arabica* é a mais sensível à infestação pelo besouro *Hypothenemus hampei*, a broca-do-café. Sua origem é africana e foi identificada pela primeira vez em 1913, no município de Campinas, Estado de São Paulo, causando enormes prejuízos aos produtores da época (SILVA, 2006; MESQUITA et al., 2016).

Como já se sabe, o Brasil é um país de clima tropical e possui uma grande diversidade de microclimas. Sendo assim, em grandes monoculturas como a do café, essas condições geram a necessidade de melhorias e adequações das técnicas de produção e controle de insetos-praga, de forma sustentável, levando em conta tanto as diferenças geográficas quanto as dimensões das propriedades produtoras (IBGE, 2016).

A praga de maior importância na cultura cafeeira, *H. hampei*, é também a de maior dificuldade no manejo (CURE et al., 2020). O besouro possui ciclo biológico que permite rápida proliferação. Tem hábito críptico e multivoltino o que a torna uma praga de difícil manejo e sem perspectivas de erradicação (LAURENTINO, 2004; LEITE, 2016; MOTA 2017). A praga provoca danos perfurando e ovipositando exclusivamente os frutos em qualquer das suas fases, causando perdas consideráveis à produção. A ação da broca ocasiona significativa perda tanto da qualidade final da bebida, quanto do peso do grão para a venda (SOUZA; REIS, 1997; BENASSI, 2000; MOTA, 2013).

Desde 2013, com a proibição do uso do organoclorado endossulfan pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a proliferação de *H. hampei* tem aumentado nas lavouras. Atualmente os métodos de enfrentamento deste besouro, em sua maioria, são derivados do próprio endossulfan como o ciantraniliprolí que possui menor índice de toxicidade (EMBRAPA, 2020).

De acordo com Silva et al. (2012), políticas internacionais exigem cada vez mais alternativas ao uso de defensivos agrícolas, o que dá destaque para as técnicas de controle biológico por meio do uso de fungos entomopatogênicos. Além disso, as tecnologias de aplicação de bioprodutos ainda são feitas com as mesmas tecnologias de aplicação da agricultura convencional (SANTOS, 2005b). Esta situação pode justificar realização de pesquisas para melhorias e avanços na área de controle biológico.

Como forma mais voltada ao desenvolvimento sustentável no agronegócio, o controle biológico à base do fungo *Beauveria bassiana* tem sido alternativa promissora de manejo e controle da broca-do-café. O fungo é cosmopolita, ocorre naturalmente no ambiente e é comum maior ocorrência em anos chuvosos (ALVES, 1992; ALVES, 1998, PARRA; REIS, 2013).

Em estudos de laboratório na aplicação de *B. bassiana* contra o besouro *Cosmopolites sordidus*, Soares et al. (2012) registraram 60 % de eficiência no controle biológico da praga. No entanto, de acordo com Botero (2018), o fungo aplicado em campo nas concentrações mínimas de  $1 \times 10^9$  por hectare, pode alcançar 100% de eficiência na mortalidade de *H. hampei*.

Tendo em vista a necessidade de melhoria e avanços no controle biológico e o problema com a broca-do-café, este trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência de diferentes métodos de aplicação do fungo *B. bassiana* IBCB66 no controle de *H. hampei*, incluindo testes para nova tecnologia de disseminação de conídios aéreos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a eficiência de diferentes métodos de aplicação do fungo *Beauveria bassiana* no controle de *Hypothenemus hampei*, a broca-do-café.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliação da mortalidade de fêmeas adultas de *H. hampei* pelos métodos de: imersão com suspensão de blastosporos, pulverização em Torre de Potter com suspensão de conídios aéreos e caminhamento sobre pó de conídios aéreos em condições de laboratório;
- Avaliação da eficiência do fungo *B. bassiana* em campo por meio de metodologias de polvilhamento e pulverização na planta e em solo em condições de campo;
- Avaliação de tecnologia de aplicação de conídios aéreos de *B. bassiana* por meio de disseminadores em forma de sachês em condições de campo;
- Realização de estudos econômicos para o controle de *H. hampei*.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 A cultura cafeeira no mundo e no Brasil

A cultura do café, remonta aos primórdios da cultura de pastores de cabras. Até os dias de hoje sem evidências reais de sua descoberta, mas com relato de que sua possível origem foi detectada pelo pastor Kaldi que viveu na Etiópia a cerca de mil anos. Assim sendo o pastor, com a ajuda de um monge local, resolveu usar os grãos em forma de infusão e passou a consumi-la. Desde então, a descoberta espalhou-se rapidamente pela região, criando imediatamente, uma demanda muito grande pela bebida (MARTINS, 2008; ABIC, 2019).

Conforme estudos de Martins (2008), existia também a forma de consumo, feita por etíopes, que consistia em macerados de grãos maduros misturados a banha e até produtos alcoólicos gerados por fermentação. Após a descoberta dos resultados excitatórios da bebida, os árabes foram os primeiros a dominar o cultivo de *Coffea* e apenas permitiam a saída do grão de seu território após retirarem a semente do pergaminho para evitar o brotamento. Entretanto, nessa disputa, foram os holandeses a conseguirem o cultivo da planta em estufas, o que facilitou a difusão pelo território europeu.

No Brasil, com campos implantados cada vez maiores também vieram os problemas. A infestação das lavouras com *H. hampei*, a broca-do-café, na década de 1920, coincidiu com a queda da bolsa de Nova York, onde juntas provocaram uma queda na economia nacional gerando para a sociedade cafeeira necessidades que levaram à mobilização do Estado na busca por soluções. Diante dessa busca, o governo do Estado de São Paulo criou o Instituto Biológico oficialmente no ano de 1927, com o objetivo de encontrar soluções fitossanitárias adequadas ao combate da praga nos cafezais (SAES; NAKAZONE, 2002; REBOUÇAS et al., 2009).

Desde então, medidas de prevenção e combate ao besouro foram estudadas e aplicadas, mas apenas na década de 1970 que houve realmente uma mudança significativa. Por meio do Plano de Renovação e Revigoração de Cafezais, organizado pelo já extinto Instituto Brasileiro de Café (IBC), houve mudanças na forma de uso da terra, bem como nos equipamentos, encerrando assim, o uso da lavoura condicionada apenas às condições naturais do ambiente e levando a adoção de novas tecnologias (IBGE, 2016).



Atualmente, são conhecidas cerca de 123 espécies, sendo duas principais para comercialização, *Coffea arabica* e *Coffea canephora* (robusta ou conilon), e que apresentam grandes variedades de linhagens, permitindo campos produtivos com diferentes condições geoclimáticas (DAVIS et al., 2006; BRASIL, 2018; ABIC, 2019).

A cultura cafeeira, assim como a da cana, foi e é de fundamental importância no desenvolvimento da economia, da infraestrutura, entre outras áreas de relevância para Brasil. A produção do café foi tida, ainda no século XIX, como o ouro verde tamanha foi a importância do cultivo e resultados financeiros para a sociedade da época. Hoje, além do país ser o maior produtor e exportador de café do mundo, é também o segundo maior consumidor do produto (EMBRAPA CAFÉ, 2017; CONAB, 2018). Atualmente o café é produzido em diferentes regiões do território nacional, com maior concentração nos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo e Paraná. Mas também há produção significativa na Bahia e em Rondônia. O Estado de Minas Gerais é o maior produtor interno, com produtividade entre 26,42 a 27,68 milhões de sacas (CONAB, 2019).

Conforme dados da EMBRAPA Café (2019), no ano cafeeiro 2018-2019, a produção mundial de café arábica foi estimada em 104,01 milhões de sacas e a de café robusta em 63,5 milhões, totalizando cerca de 167,47 milhões de sacas no geral. Em relação ao consumo mundial para o mesmo período, tanto de países produtores como exportadores, estimou-se um volume de 165,19 milhões de sacas consumidas, confirmando as expectativas de crescimento contínuo de mercado.

Hoje, o café tornou-se um produto apreciado mundialmente e nas mais variadas formas de consumo. Além disso, há diminuição do uso dos cafés tradicionais em países mais desenvolvidos e um aumento significativo no consumo dos especiais. Este fato gera a necessidade de uma cadeia industrial renovada, que exige dos produtores de café cuidados com a qualidade da produção principalmente na diminuição do uso de defensivos agrícolas (SAES; NAKAZONE, 2002).

Em um sistema de monocultura como o do café, são constatados problemas fitossanitários específicos, como por exemplo, a infestação por *Hypothenemus hampei* e os danos econômicos oriundos do desenvolvimento biológico da praga (COSTA et al., 2002).

O coleóptero *H. hampei* está presente em praticamente todos os territórios em que há cafeicultura (VEGA et al., 2015). Resultados de levantamento estatístico de Jaramillo et al. (2006) apontam alguns países com índices considerados altos de infestação pela praga broca-do-café: Tanzânia 90%, Malásia 50-90%, Uganda 80%, Colômbia 60%, México 60%, e Jamaica 58-85%.

De acordo com relatório da Organização Internacional do Café (OIC), apesar da bienalidade negativa para a produtividade de *Coffea arabica*, o Brasil deve permanecer na liderança produtiva do grão para o período 2019/2020 (CONSORCIO PESQUISA CAFÉ, 2020). Ademais, sendo o maior produtor e exportador mundial, o país passa a ser o que mais deve se preocupar com aspectos fitossanitários e da sustentabilidade na cadeia produtiva do cafeeiro.

Na busca por melhor produtividade e pela diminuição de custos com o ataque de pragas, doenças e pela melhor adaptação da cultivar aos fatores climáticos, foram também desenvolvidas diversas variedades melhoradas geneticamente tendo como base as espécies *C. arabica* e *C. canephora*. Uma lista delas pode ser encontrada nos sites dos institutos de pesquisas tais como: Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) [www.iac.sp.gov.br](http://www.iac.sp.gov.br), Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) [www.iapar.br](http://www.iapar.br) e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária para estudos do café (EMBRAPA CAFÉ) [www.embrapa.br/cafe](http://www.embrapa.br/cafe). As cultivares produzidas podem ser conferidas também na listagem do Registro Nacional de Cultivares do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2018).

Desde 2013, quando o Endosulfam teve seu uso proibido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os problemas com a praga *H. hampei* voltaram a preocupar produtores, com os índices de infestação podendo ficar acima dos danos econômicos (ABIC, 2018; INCAPER, 2018).

### 3.2 Pragas do cafeeiro

A ocorrência de pragas em lavouras cafeeiras é comum no mundo todo. Esses insetos-praga, se não controlados adequadamente, podem afetar todas as etapas da cadeia produtiva, trazendo grandes prejuízos à produção (PARDEY et al., 2015).

Com o aumento da produção cafeeira no Brasil, foi observado aumento significativo no número de pragas, tanto primárias, quanto secundárias. Esta situação está relacionada ao uso excessivo de defensivos agrícolas, bem como deficiências técnicas de manejo, trazendo consequências diversas ao homem quanto ao meio ambiente (SILVA; BRITO, 2015).

São consideradas como principais pragas na cafeicultura: o bicho-mineiro *Perileucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae), a broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) e as cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) (ALVES, 1998; GAMA et al., 2006; PARRA; REIS, 2013; MESQUITA, 2016).

Já se sabe que o território brasileiro possui uma variedade de climas, relevos, altitudes e latitudes que permitem a produção de uma ampla gama de culturas e, com isso, a necessidade de investimentos em tecnologias e melhores formas de manejo em ambientes tropicais e suas especificidades (PARRA, 2016; BRASIL, 2018).

O Manejo Integrado de Pragas é uma forma de gerenciamento agrícola que permite manter a densidade populacional de um organismo-praga abaixo do nível de dano econômico (EHLER, 2006). O uso integrado das técnicas de combate possíveis aos insetos-praga, selecionadas como base nos parâmetros econômicos, ecológicos e sociológicos devem ser considerados e adotados mesmo que de forma gradativa (ZANETTI, 2013).

### **3.3 *Hypothenemus hampei*, a broca-do-café**

Conforme relatório de pragas e doenças do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2019), a espécie *Hypothenemus hampei* pertence à ordem Coleoptera, família Curculionidae, sub-família Scolytinae e ao gênero *Hypothenemus*, tendo como sinônímia *Stephanoderes hampei* (Ferrari, 1867), *Stephanoderes coffeicola* (Ferrari, 1867), *Cryphalus hampei* (Ferrari, 1867), entre outros.

A broca-do-café é de origem africana e foi reconhecida como praga em 1901, no Congo e, no Brasil, por volta de 1910. Em 1913 foi considerada praga devastadora causando grandes prejuízos às lavouras de café (BATISTA FILHO et al., 1989; REVISTA CAFEICULTURA, 2006; REBOUÇAS, 2009; INFANTE et al., 2014).

Em estudos realizados por Machado (2004), por meio de análises genéticas de linhagens da broca-do-café, foi sugerido que a introdução do inseto nas Américas se deu inicialmente pelo território brasileiro, espalhando-se após por Peru e Colômbia.

Da entrada da praga se propagou no Estado de São Paulo, tendo como início os cafezais do município de Campinas, por volta de 1913, e desde que o organoclorado Endosulfam teve seu uso proibido por sua alta toxicidade, tem se tornado a praga de maior importância nas lavouras cafeeiras (INFANTE et al., 2014; MOTA, 2017; D'AGOSTINI et al., 2018; BRASIL, 2018).

De acordo com Leite (2016), fatores climáticos, tais como: aumento de umidade e sombreamento, maior adensamento, dificuldades de mecanização da colheita e a coleta de grãos pós colheita, favorecem o desenvolvimento e proliferação da praga.

O coleóptero *H. hampei* é resistente, pois adapta-se bem às condições do ambiente, conseguindo sobreviver em sementes no solo e nas mais variadas condições de maturação. Os maiores níveis de infestação são observados em anos com maiores índices pluviométricos e entressafra úmida no ano anterior, mas também se observa a proliferação do inseto em períodos de estiagens, com um ciclo mais curto e mais rápido (SILVA et al., 2013).

Após o banimento do químico endosulfan, que mais eficiência tinha sobre o controle da praga *H. hampei*, ainda não foi encontrado substituto equivalente. Seu uso foi interrompido em território nacional a partir de julho de 2013, por suas moléculas serem cumulativas no ambiente e seu potencial carcinogênico ser elevado. Este agrotóxico pertence ao grupo de organoclorados e faz parte da lista de POP's (poluentes orgânicos persistentes) de que trata a convenção de Estocolmo (BRASIL, 2018).

O controle biológico por meio de fungos entomopatogênicos, bem como por seus predadores e parasitoides, tem sido alternativa de combate ao inseto (BEZERRA, 2013; PARRA; REIS, 2013; BATISTA-FILHO, 2016).

### **3.3.1 Aspectos biológicos, fisiológicos, etológicos e morfológicos**

A broca-do-café é um inseto que co-evoluiu com o gênero *Coffea* tornando-se dependente bioticamente das condições do cafeeiro para seu desenvolvimento e continuidade da espécie. Logo, interferências na fenologia do café vão causar alterações no ciclo da praga (FERREIRA et al., 2000; JARAMILLO, 2008). No entanto, existem registros de resultados de pesquisas que mostram que em condições específicas o inseto pode também migrar para outros hospedeiros, mas sem conseguir êxito em seu desenvolvimento (LAURENTINO; COSTA, 2004). Convive com diversos tipos de fungos tanto da parte edáfica quanto aérea das plantas de café, sendo considerada boa transportadora desses fungos no ambiente de cultivo de *C. canephora* (GAMA et al., 2005).

De hábito críptico e monófago, *H. hampei* tem ciclo realizado totalmente intra-fruto e apenas a fêmea, quando já adulta e fecundada, deixa o fruto de origem para proliferação e, conseqüentemente, infestação de novos frutos. Foi descrita por em 1867, pelo entomologista austríaco Ferrari (SOUZA; REIS, 1997; LAURENTINO; COSTA, 2004; MOTA, 2013).

Ao sair em busca de outro fruto para a oviposição, a broca-do-café perfura o grão ainda verde, permanecendo ou não no seu interior até que os níveis granação (fase de diminuição da porcentagem de água dentro do fruto) estejam adequados para o desenvolvimento da prole e enquanto esses níveis não apresentam umidade adequada não há

colonização e o inseto pode abandonar o fruto. Entretanto, as aberturas feitas pelo besouro podem servir de porta de entrada para outros tipos de micro-organismos, que podem igualmente causar danos significativos ao produto final (LAURENTINO; COSTA, 2004; MOTA, 2013).

Diferenças na fenologia do café podem interferir na reprodução de *H. hampei*, bem como no número de frutos brocados, uma vez que a idade das plantas, juntamente com chuvas ou secas fora de época, promovem um microclima que favorece ciclos mais ou menos rápidos, com mais ou menos frutos perfurados (CIIAGRO, 2018). Nesse contexto, conforme Silva et al. (2017), a diapausa é também uma estratégia evolutiva que a broca-do-café utiliza para manter-se em campo após a colheita.

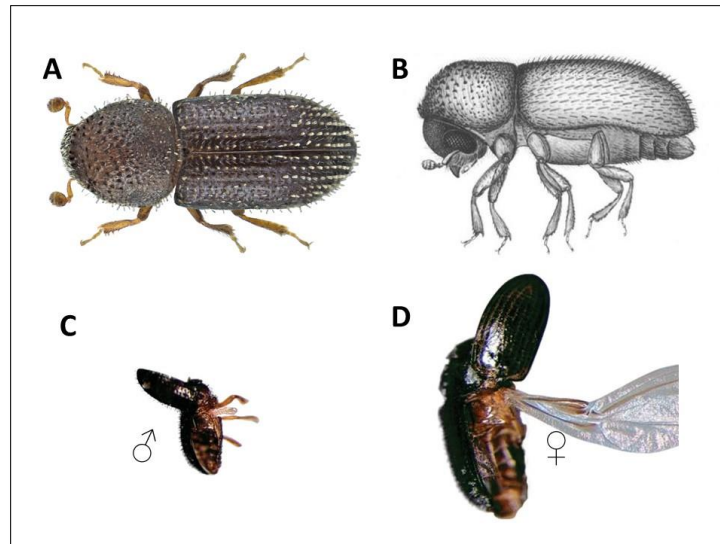
A fisiologia de *H. hampei* é específica e dependente da interação de bactérias de seu intestino na degradação da cafeína e isso garante sua sobrevivência. Substâncias excitatórias podem ser encontradas em diversos organismos. Além do cafeeiro, em mais de outras 60 plantas, a cafeína (1,3,7-trimethylxanthine) pode ser identificada. Este alcaloide é considerado muito tóxico para diversos tipos de micro-organismos, mas, no entanto, alguns deles conseguem realizar o processo de degradação (TAGLIARI et al., 2003).

Estudos realizados em 16 países com amostragens do besouro *H. hampei*, demonstraram que os genes identificados HhMAN1 comprovam a transferência genética lateral a partir de bactérias. Esses micro-organismos que existem na flora intestinal do inseto e auxiliam na degradação da cafeína de tal maneira que permite a sobrevivência da broca-do-café após sua alimentação. Sem essa capacidade fisiológica seria inviável o desenvolvimento de *H. hampei* em *Coffea* (CEJA-NAVARRO et al., 2015). Também, análises realizadas com cerca de 37 amostras do coleóptero e de diferentes localizações geográficas, indicam que essa codificação é pretérita à disseminação do inseto após sua saída do território Africano (ACUÑA et al., 2012).

Devido a relações ecológicas intraespecíficas, níveis baixos de variabilidade genética de *H. hampei* foram identificados e este pode interferir no manejo direto do coleóptero, sugerindo resistência para químicos pelo fato da alta endogamia e rápida proliferação (JARAMILLO et al., 2006).

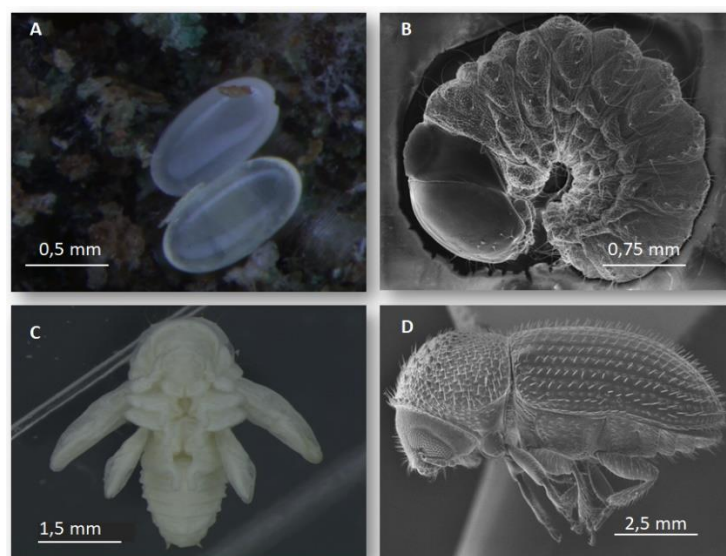
A broca-do-café, em seus aspectos morfológicos, possui o primeiro par de asas bem resistente de consistência córnea, antenas do tipo capitada, aparelho bucal tipo mastigador, tarsos providos de garras, cercos ausentes e olhos compostos.

O dimorfismo sexual existe, sendo o macho de tamanho diminuto variando entre 1,0 e 1,2 mm e a fêmea variando entre 2,0 e 3,0 (Figura 1). O macho possui além do élitro, asas vestigiais atrofiadas e não voa. Já a fêmea, tem asas posteriores membranosas com veias longitudinais e transversais e capacidade para vôo (GULLAN; CRANSTON, 2012; VEGA et al. 2015; FUNDACCER, 2016).



**Figura 1** – A: *Hypothenemus hampei* vista dorsal; B: *H hampei* vista lateral; C: Macho de *H. hampei* com élitros levantados; D: Fêmea de *H. hampei* com asa membranosas exposta. **Fonte:** Imagens: A- adaptada de VEGA *et al.*, 2015; B – adaptada de Oliveira Filho (1927) – Arquivos do Instituto Biológico; C e D adaptadas de FUNDACCER, 2016.

A broca-do-café possui ciclo holometábolo (LAURENTINO; COSTA, 2004) com fases: ovo, larva, pupa e adulto (Figura 2).



**Figura 2** – Ciclo de vida de *Hypothenemus hampei*, a broca-do-café; A- ovos; B- larva; C- Pupa fêmea; D – Adulto fêmea. **Fonte:** Adaptada de: COSTA, V. A., CAPSA, IB, Campinas - SP.

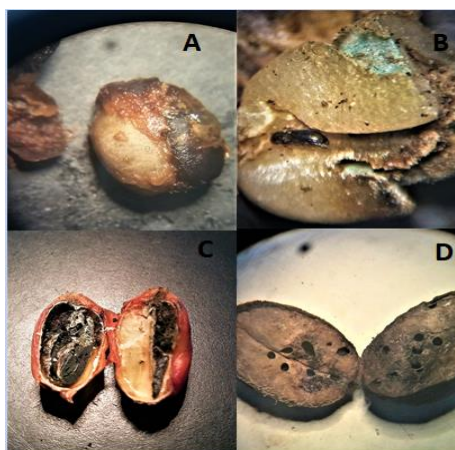
A proporção sexual é de 1 macho para 10 fêmeas. Seu ciclo entre a oviposição e fase adulta varia entre 20 e 45 dias, dependendo das condições bióticas e abióticas. O período em dias para cada fase pode ser: incubação: 4 a 13,5; larvas: 11 a 29,5; pupa: 2 a 14 e de adulta: 21 a 156 dias. Cada fêmea já sai do grão copulada. Pode colocar em cada câmara escavada no endosperma (semente) cerca de 20 a 30 ovos e ao longo de sua vida reprodutiva entre 75 e 150, abandonando o fruto para reiniciar a colonização (MATHIEU, 2001; COSTA et al. 2002; LAURENTINO; COSTA, 2004; FUNDACCER, 2016; MESQUITA, 2016).

### 3.3.2 Danos causados ao café

Desde que o organoclorado endosulfan teve seu uso proibido por sua alta toxicidade tanto ao homem quanto para o ambiente (BRASIL, 2018), restaram poucas opções para o controle do besouro *H. hampei* e com baixo custo (KROHLING et al., 2017).

A preocupação com a infestação do besouro praga *H. hampei* por parte dos produtores da região do Cerrado e do Sul de Minas Gerais foi grande na safra 2017/2018. Dos quase 14 mil cooperados da Cooxupé, cooperativa localizada em Guaxupé (MG), 16% apresentaram problemas com a broca-do-café. Os problemas com a broca foram da ordem de 6% na safra 2017/2018, número que triplicou afetando aproximadamente mais de 110 mil sacas em 2017 (SNA, 2017, CANAL RURAL, 2017).

A alimentação do besouro dentro do fruto do café pode causar queda precoce do mesmo na lavoura, gerando perdas de cerca de 20% do peso. Além da diminuição da qualidade tanto qualitativa quanto quantitativa, há também a depreciação da bebida final em função das alterações químicas causadas por metabólitos produzidos pelo besouro (REIS, 2016; CAFEICULTURA, 2017; ABIC, 2018). Esses danos são consideráveis (Figura 3).



**Figura 3** – A: sementes infestadas ainda dentro do pergaminho; B: Sementes de fruto verde com broca e presença de fungos na câmara escavada; C: fruto maduro infestado e apresentando ‘Dust/frass’; D: fruto maduro e seco com furos no pergaminho. **Fonte:** RMCPereira, 2019.

A praga *Hypothenemus hampei* pode ser monitorada como forma de prevenção no manejo da lavoura, a fim de não permitir que ocorra índices que ultrapassem o nível de dano econômico. Além disso, indica o melhor momento de realizar a aplicação de produtos no combate à praga. Deve ser iniciado aos 80-90 dias após a florada do cafezal. Este período coincide com época de trânsito do inseto-praga que, em geral ocorre entre outubro a dezembro, podendo variar de novembro a janeiro, lembrando que a fase de florada pode ser diferenciada em função da idade das plantas e das condições bióticas e abióticas do ambiente (MESQUITA, 2016; FUNDACCER, 2016).

Pode ser feito por meio do uso de armadilhas (Figura 4) que podem conter voláteis atrativos à broca e serem confeccionadas de forma artesanal em garrafas plásticas ou compradas prontas. O monitoramento também pode ser feito por meio da análise dos frutos nas rosetas (conjunto de frutos ao redor do ramo) da planta e contagem de 100 grãos brocados, sendo o limite aceitável em 3% (BEZERRA, 2013; MOTA, 2017; FUNDACCER, 2016).



**Figura 4** – A, B, C: armadilhas em pet modelos IAPAR; D: armadilha industrializada. **Fonte:** Imagens adaptadas: A, B e C: do manual de combate à broca-do-café EMBRAPA/FUNDACCER, D: terraviva.com.br.

No caso da porcentagem de grãos brocados ultrapassar o limite de 3%, é necessário fazer manejo mais rigoroso adotando-se preferencialmente o manejo integrado de pragas (MIP), podendo contemplar os controles: biológico, cultural e até mesmo o químico (LAURENTINO; COSTA, 2004; MESQUITA, 2016; FUNDACCER, 2016; SNA, 2017).

### 3.4 Controle biológico

A história do controle biológico está diretamente relacionada com a existência e evolução do homem no planeta e principalmente ao desenvolvimento da agricultura. Há registros do uso desta técnica natural por civilizações antigas como a chinesa, a hebraica, a



egípcia e a grega. No século III a.C., chineses já utilizavam *Oecophylla smaragdina* contra *Tesseratoma papillosa* e, em 1.182 para efetivação no combate a *Schistocerca gregaria* foi elaborada a primeira Lei para controle biológico contra esta praga (PARRA et. al., 2002; WAQUIL, 2019).

No mundo, o marco do controle biológico clássico aplicado se deu em 1888 e teve grande êxito. O grande acontecido foi em função dos problemas causados por *Icerya purchasi* (Hemiptera: Margarodidae). Oriundo da Austrália, foi introduzido nos Estados Unidos sem seu predador natural, a joaninha australiana *Rodolia cardinalis* (Coleoptera: Coccinellidae). Em 1889, os resultados do controle biológico foram ótimos, consagrando a técnica (PARRA, 2011).

O uso de ser vivo para controlar ser vivo é uma técnica na qual se leva em consideração aspectos ecológicos, bem como especificidades intraespecíficas da teia trófica. Isso gera vantagens frente a outros métodos de controle nas lavouras pois permite equilíbrio ambiental e reduz drasticamente riscos de contaminações residuais de defensivos agrícolas nos alimentos e, conseqüentemente, à saúde humana. Além disso, a adoção do controle biológico minimiza a possibilidade de resistência a inseticidas, ressurgência e a diminuição de pragas secundárias e colabora para o uso consciente da biodiversidade, bem como sua valorização (PARRA et al., 2002; CNI, 2016; IB, 2019).

Apesar do alto potencial do uso do controle biológico, existem desafios a serem vencidos, como por exemplo, em regiões tropicais que possuem macro e micro climas variados, com grande amplitude térmica ao longo do dia, o que facilita a manutenção do ciclo biológico de muitas pragas (ALVES, 1998). Um outro aspecto que dificulta a aplicação de controle biológico são os projetos que, não tem continuidade e são, em geral, executados de forma regional e sem o conhecimento técnico adequado. A falta de interdisciplinaridade também é considerada causa do pouco uso de potenciais inimigos naturais para muitas pragas (PARRA et al., 2002).

A descoberta e a possibilidade de registro de novas moléculas químicas de pesticidas, com modo de ação inovador, para os próximos 10 anos é quase nula (IRAC, 2017). Isso corrobora com registros do crescimento do número de bioinseticidas e do uso do controle biológico por meio de fungos entomopatogênicos como o *Beauveria bassiana* no combate à *H. hampei*, a broca-do-café, e a doenças como a ferrugem, causada por *Hemileia vastatrix*, combatida pelo fungo *Lecanicillium lecanii* (MESQUITA, 2016).

No Brasil, as primeiras referências acerca de organismos entomopatogênicos sobre pragas, têm registros em 1920 e os primeiros estudos em 1932. Mais precisamente na

década de 1960, o controle biológico passa a ter programas de pesquisa científica de forma inter e multidisciplinar e, em 2008, é feito o primeiro registro de fungicida biológico (ALVES, 1998; PARRA, 2016).

Apesar dos desafios para a implantação do controle biológico em lavouras brasileiras, há registros de que esse uso vem aumentando em torno de 15 a 20% ao ano com expectativas de faturamento de 15% para o mercado brasileiro no setor de bio defensivos (AGROANALYSIS, 2016; APqCNOTÍCIAS, 2019).

De forma mais sustentável do ponto de vista socioeconômico e agroambiental, sistemas de cultivo de orgânicos têm tido aumento no uso de bioprodutos em detrimento aos químicos. O uso do controle químico vem sendo repensado por pesquisadores, órgãos governamentais e pelos próprios agricultores. Essa mudança tem resultado em maior sanidade e estabilidade da produção com menor custo e maior segurança ao meio ambiente (ALVES, 1998; TAMAI et al., 2002).

Entre os organismos usados no controle biológico, os fungos entomopatogênicos, apesar de terem seu uso já há séculos, estão sendo considerados bioinseticidas de nova geração e estão inseridos na Lei 7.802 de 11 de julho de 1989, regulamentada pelo Decreto 4.074 de 04 de janeiro de 2002 e por normativa específica. Suas vantagens são a não poluição ambiental e a ausência de danos aos animais e ao homem (MASCARIN; PAULI, 2010; BRASIL, 2018).

Os fungos patógenos de insetos têm sido muito estudados e já foram constatados em mais de 20 gêneros ocorrendo enzoótica ou epizooticamente sobre organismos de importância agrícola (ALVES, 1992). Esses organismos representam um grande potencial para o controle biológico e têm sido utilizados com sucesso no controle de algumas pragas tais como a cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar (*Mahanarva fimbriolata*) e a cigarrinha-da-folha (*Mahanarva posticata*) pelo o fungo *Metarhizium anisopliae* (MASCARIN; PAULI, 2010; ALVES et. al. 2010; ALMEIDA; BATISTA FILHO, 2016).

No Brasil, existe uma regulamentação na produção e no registro dos bioinseticidas. Em geral, a produção de micro-organismos tem sido feita por grandes empresas, enquanto a de macro-organismos por pequenos produtores. Esse modelo está em fase de adequação em função das exigências de mercado devido a crescente mudança no cenário do agronegócio, por questões de sustentabilidade e pelo aumento do uso do controle biológico nos últimos anos. Em 2010, havia apenas 19 produtos registrados e em 2017 foram mais de 143 entre plantas, bactérias, fungos e agentes predadores (EMBRAPA NOTÍCIAS, 2016; BRASIL, 2018).

### 3.4.1 Fungos entomopatogênicos

Fungos entomopatogênicos foram os primeiros organismos a serem usados no controle microbiano de insetos e sua grande variabilidade genética é considerada uma das maiores vantagens desses micoinseticidas. No Brasil, o início dos estudos com esses patógenos datam de 1932. Entretanto, apenas na década em 1964, após epizootia de *M. anisopliae* sobre as cigarrinhas da cana-de-açúcar, os fungos passaram a ser mais estudados. Entomopatógenos são capazes de colonizar e levar a óbito diversas espécies de insetos (Figura 5) e ocasionar alto índice epizootico (ALVES, 1992; ALVES, 1998; MASCARIN; PAULI, 2010; BATISTA-FILHO, 2016).



**Figura 5** - A: Cigarrinha-da-raíz da cana-de-açúcar (*Mahanarva fimbriolata*) morta pelo fungo *Metarhizium anisopliae*; B: Adulto do percevejo de renda da seringueira (*Leptopharsa heveae*) morto por *Sporothrix insectorum*; C: *Diaphorina citri* morta por *Beauveria bassiana*; D: *Spodoptera exigua* morta por *Nomuraea rileyi*. **Fonte:** Imagens adaptadas: A: Revista Strider; B: Alves R. Teixeira; Pinto *et. al*, 2012; C e D: 5368209 invasive.org.

A maneira de atuação dos fungos entomopatogênicos se dá principalmente por contato, mas também pode ser por ingestão. Após a fase de adesão, há a posterior produção de enzimas proteolíticas que darão condições ao seu desenvolvimento e infecção do inseto. Devido à grande variabilidade genética e morfológica dos fungos, podem ser realizados estudos de seleção de espécies mais virulentas para maior eficiência para aplicação em campo. Em seu modo de ação, possuem as fases de: adesão, germinação, formação de apressórios, formação de grampos de penetração, penetração, colonização, reprodução e formação de esporos de resistência (ALVES, 1998; STÜRMER, 2004; BATISTA-FILHO, 2016).

Em relação à produção desses patógenos em laboratório para posterior uso em campo, são usadas diferentes estruturas, tais como: conídios, que tem a função de reprodução e disseminação; blastosporos, que tem a função de disseminação intra-inseto (hemolinfa); micélio, que permite ao fungo chegar à parte externa do hospedeiro; e esporos de resistência, que têm a função de preservar a espécie no ambiente. As formas mais comumente utilizadas para o controle biológico de pragas são conídios aéreos e blastosporos (ALVES, 1998; BOLETIM TÉCNICO IB, 2006).

Os fungos pertencentes à ordem Entomophthorales e ao subfilo Entomophthoromycotina, são considerados bioinseticidas promissores pois os índices de epizootia causados são da ordem de 50% e, atualmente, são conhecidos mais de 10 gêneros. Entretanto, apesar de terem sido estudados desde a década de 1940, ainda não se conseguiu sua produção massal, o que evidencia a necessidade de mais pesquisas (BOLETIM TÉCNICO IB, 2007).

### 3.4.2 *Beauveria bassiana*

O fungo *Beauveria bassiana*, foi estudado primeiramente por Agostino Bassi, cuja intenção era descobrir as origens da doença ‘muscardina’ que atacava o bicho-da-seda (*Bombyx mori*) no início do século XIX. Após muitas tentativas e experimentos, hipotetizou que a doença era causada por fungos que podiam passar de carcaças infectadas para insetos vivos. Sua hipótese foi reforçada após estudos microscópicos de Giuseppe Balsamo-Crivelli e com mais alguns resultados de pesquisas da época, sendo o primeiro caso de constatação da causalidade entre micro-organismo e a doença (FERREIRA; MARTINS, 1997; ALVES, 1998).

O gênero *Beauveria* pode ocorrer em mais de 200 espécies de artrópodes. A infecção nos insetos pode ser observada por micélio de coloração esbranquiçada e que, nas condições bióticas e abióticas adequadas, podem germinar. Acerca das relações patógeno-hospedeiro, há uma variação no período de desenvolvimento de cada espécie envolvida bem como das condições ambientais na ocasião dos estudos ou aplicação em campo, sendo favoráveis a umidade em torno de 90% e a temperatura com variação entre 23 e 28 °C (DALZOTO; UHRY, 2009; ALVES, 1998).

Também, de acordo com Alves (1998), em relação a infecção causada por *B. bassiana*, ocorre geralmente via tegumento, podendo também ser via oral ou espiráculos e demais partes membranosas do inseto. Geralmente, ocorre entre 12 e 18 horas, dependendo da presença de nutrientes como por exemplo quitina, glicose e nitrogênio. Após aproximadamente

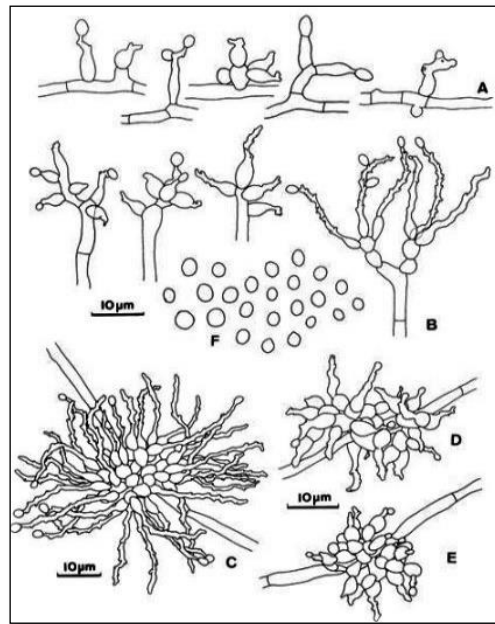
72 horas, o inseto já estará colonizado sendo os tecidos gorduroso e intestinal, bem como túbulos de Malpighi, as primeiras estruturas do inseto a serem atacadas, ocasionando a morte do mesmo por reações de ruptura de membrana e interrupção de suas atividades fisiológicas.

No controle biológico, comumente são usados nas formulações de bioinseticidas conídios aéreos de *B. bassiana*. Porém, além dessas estruturas, também existem bioensaios com blastosporos, estruturas leveduriformes, que são produzidos assim que o fungo penetra no hospedeiro. Estas células podem ser produzidas artificialmente em meio líquido, em proporção de C:N de 10:1. Os blastosporos são estruturas consideradas idênticas em seu modo funcional em relação às células hifais e possuem parede celular com a mesma composição das hifas, são higroscópicos e têm baixo índice de viabilidade no ambiente (ALVES et al., 2010). Conforme Alves (1998), os blastosporos têm uma capacidade infectiva menor que a dos conídios aéreos. Entretanto, há uma compensação pelo aumento na quantidade de unidades infectivas em relação ao volume do meio, além de ser mais rápido o processo de colheita e de infecção no hospedeiro.

No índice monográfico B40 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), *B. bassiana* possui a seguinte classificação taxonômica:

- \*Super-reino: Eukaryota
- \*Reino: Fungi
- \*Divisão: Ascomycota
- \*Subdivisão: Pezizomycotina
- \*Classe: Sordariomycetes
- \*Ordem: Hypocreales
- \*Família: Cordycipitaceae
- \*Gênero: Beauveria
- \*Espécie: *Beauveria bassiana*

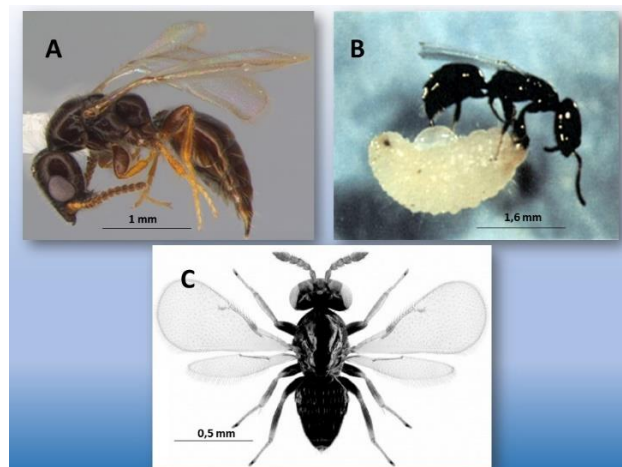
*B. bassiana* (Figura 6) é cosmopolita, generalista, edáfico, podendo ocorrer também como endófito em plantas e possui boa capacidade entomopatogênica (LAURENTINO, 2004; ALVES, 1998).



**Figura 6** – Estruturas de *Beauveria bassiana*: A: corpos hifais; B: hifas com fiálides e conidióforos; C, D e E: germinação de um aglomerado de conídios, F: conídios. **Fonte:** bcr.firdi.org.tw, 2019.

### 3.4.3 Controle biológico de *Hypothenemus hampei*

Até 1995, o manejo de *H. hampei* era realizado exclusivamente forma química, mas a partir daquele ano o fungo *B. bassiana* passou a ser utilizado em algumas lavouras (ALVES, 1998). Outros exemplos de agentes de controle biológico da broca-do-café são as vespas de origem africana (Figura 7): *Prorops nasuta* (Waterston, 1923), *Cephalonomia stephanoderis* (Betrem) e *Phymastichus coffea* (Schmiedknecht, 1923).



**Figura 7** – A: *Prorops nasuta*; B: *Cephalonomia stephanoderis* parasitando larva de *Hypothenemus hampei*; C: female *Phymastichus coffea*. **Fonte:** Imagens adaptadas: A: Dr. Valmir Costa, CAPSA – Campinas; B: Rodrigues & Covas – Universidade de Porto Rico; C: Dr Georg Goergen, International Institute of Tropical Agriculture, Benin, by Jaramillo.

No entanto, a utilização desses organismos é mais viável em pequenas propriedades pois o uso dos mesmos requer manejo mais exigente e custoso em função da criação (BENASSI, 1996; AMOND; MOORE, 1998; LAURENTINO; COSTA, 2004; JARAMILLO et al., 2006; BEZERRA, 2013; PARRA; REIS, 2013; MESQUITA, 2016).

No Brasil, o fungo *B. bassiana* tem sido o mais utilizado para formulação de produtos biológicos para o combate das infestações por *H. hampei* nas lavouras cafeeiras (LOPES, 2004). Em geral, para a boa eficiência do uso do fungo *B. bassiana*, as aplicações devem ser inundativas e com cepas altamente virulentas, além das condições climáticas e bom preparo do aplicador (BOTERO, 2018).

### 3.5 Tecnologia de aplicação para fungos entomopatogênicos

O Brasil é líder mundial em tecnologias de controle biológico e o crescimento previsto é 15% ao ano, com previsão maior que para o mercado mundial que é de 9% (EMBRAPA, 2019). Entretanto, no país, a aplicação de bioinseticidas à base de fungos entomopatogênicos têm sido feita por meio das mesmas tecnologias utilizadas para aplicação de agroquímicos (GARCIA et al., 2005).

Para a aplicação de bioprodutos, incluindo os fungos entomopatogênicos, as técnicas mais utilizadas são pulverização e polvilhamento. Também, são as mais utilizadas na agricultura convencional (SANTOS, 2005b). Segundo o autor:

“Pulverização, é um processo físico-mecânico que permite que uma substância sólida ou líquida seja transformada em partículas ou gotas o mais uniforme possível e a aplicação em si é a deposição em qualidade e quantidade do ingrediente ativo definido em uma formulação representada pelos diâmetro e densidade de gotas por unidade de área, sobre um alvo desejado”.

Também, a verificação das condições gerais tais como: pH da e qualidade da água, principalmente em relação à dureza, a formulação e a diluição adequada do produto, as condições climáticas favoráveis e o treinamento do aplicador são fatores primordiais para o sucesso nos resultados após a aplicação (SANTOS, 2005b; RODRIGUES et al., 2019).

Para a tecnologia de aplicação por pulverização, o bom desempenho dos fungos entomopatogênicos dependem primordialmente dos índices de umidade do ar no momento da aplicação, principalmente se a calda for a base de água, pois a relação está diretamente ligada à

evaporação da gota e interfere diretamente no rendimento operacional (SANTOS, 2005a). Além disso se forem baixos podem não germinar (ALVES, 1998).

Conforme Raetano (1996), a técnica de aplicação por pulverização requer conhecimento sobre diversos fatores como: tamanho da planta e densidade da copa, deriva, velocidade de deslocamento do vento, tipo de equipamento utilizado bem como sua higienização, combinação de bicos no pulverizador, volume de saída de ar do pulverizador e, observação se há ou não escorrimento do produto aplicado, pois assim sendo a eficiência será prejudicada. A falta de atenção com esses aspectos são atualmente apontadas como responsáveis pelos maus resultados no uso dos defensivos agrícolas (SANTOS, 2005b).

Em relação aos bioinseticidas, em geral, a produção de microorganismos tem sido feita por grandes empresas enquanto a de macroorganismos por pequenos produtores. Esse modelo está em fase de transição e adequação devido a crescente mudança no cenário do agronegócio por questões de sustentabilidade e pelo aumento do uso do controle biológico nos últimos anos. Em 2010 havia apenas 19 produtos registrados, em 2018 já são mais de 143 entre plantas, bactérias, fungos e agentes predadores (EMBRAPA NOTÍCIAS, 2016; ABCBIO, 2018; BRASIL, 2018) e, esse crescimento pode favorecer novos estudos para tecnologias de aplicação de fungos.

Apesar dessa relativa mudança e do crescimento do uso do controle biológico no Brasil, existe ainda a necessidade de encontrar formas eficazes, baratas e eficientes de como forma de aplicação. Não menos importante, é preciso melhorar a forma e a frequência nas orientações e qualificações de colaboradores da cadeia produtiva no Manejo Integrado de Pragas (MIP) e manter a realização em conjunto com pesquisas básicas e aplicadas seguidas da transferência da tecnologia ao produtor (TAMAI et al., 2002; PARRA, 2014; AGÊNCIA FAPESP, 2016).

Recentemente uma nova tecnologia de embalagem para manutenção da viabilidade dos fungos entomopatogênicos em prateleira foi desenvolvida. A tecnologia chamada TEV – Tecnologia Embrapa de Vida-de-prateleira preserva a viabilidade do fungo em até 80% em temperaturas superiores a 37 °C (EMBRAPA NOTÍCIAS, 2018). Entretanto, pesquisas para tecnologias de aplicação que permitam maior tempo e viabilidade das cepas infectantes de fungos entomopatogênicos em campo ainda são escassas, mesmo em se tratando da cultura cafeeira que possui um sistema agroindustrial de grande porte.



Conforme citado anteriormente, as tecnologias de aplicação de fungos entomopatogênicos são as mesmas utilizadas no manejo convencional para aplicação de agroquímicos. Com base no Manejo Integrado de Pragas (MIP), podemos citar as tecnologias de aplicação por: pulverização (mais usada), por polvilhamento, por via aérea, por armadilhas com semioquímicos e feromônios sexuais e por diversos equipamentos e máquinas que variam em forma e tamanho em função: do tamanho, da disposição e distanciamento entre as ruas e as plantas e das curvas de nível da lavoura (ALVES, 1998). São escassas pesquisas para desenvolvimento de novas tecnologias de aplicação para fungo entomopatogênico no controle da broca-do-café.

### **3.6 Estudos econômicos**

O sistema econômico prevalecente no mercado mundial atual é o capitalista ou economia de mercado. Nesse sistema existe ordem e coordenação através do mecanismo de preços. O Brasil é um país capitalista e dentro da microeconomia, o café tem uma grande representatividade, sendo o quinto produto de maior relevância na balança comercial e compõe cerca de 36% da produção mundial (EMBRAPA NOTÍCIAS, 2018).

A cafeicultura é responsável por uma avultada movimentação financeira, que abarca desde a mão de obra até a comercialização. Assim sendo, sua cadeia produtiva impacta muito o mercado interno gerando assim, necessidades de melhorias no gerenciamento dos custos de produção (LUZ et al., 2019).

A ideia de que a maior utilização de produtos com base em moléculas químicas seja prática ideal para o aumento de produção está mudando no Brasil. Atualmente o custo ecológico de um produto tem sido levado em consideração e em função disso, a agricultura orgânica tem tido aumento (DALZOTO; UHRY, 2009).

Conforme Borsari e Claudino (2018), em 2016 o mercado global de bio defensivos foi estimado em U\$ 2,5 bilhões com crescimento contínuo, tendo o mercado brasileiro destaque quando consideradas áreas agrícolas, diversidade de culturas e climas. Ainda, a projeção para crescimento do setor na América Latina é de 40% até 2021. Em relação a adoção do controle biológico na cultura do café, as projeções são da ordem de crescimento de 20%.

Segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), atualmente existem 19 agentes microbianos e 82 produtos registrados, sendo 38

produtos à base de fungos entomopatogênicos. Em nível mundial estima-se que existam mais de 200 produtos à base de fungos registrados para controlar insetos.

No caso do combate e controle da praga *Hypothenemus hampei*, a maior parte das estratégias tem base na aplicação de inseticidas sintéticos que têm custos elevados (LUZ et al., 2019) além de nos próximos 10 anos não haver previsão de desenvolvimento de novas moléculas (IRAC, 2017). Em geral, os princípios ativos utilizados hoje no controle de *H. hampei* são derivados do endosulfan que por ser um organoclorado com potencial de bioacumulação no ambiente e toxicidade aos vertebrados, teve seu uso proibido no Brasil a partir de 2013 (LEITE, 2016; AGROFIT, 2019; BRASIL, 2019; CONAB, 2019; CNA, 2019).

As interferências na opção da adoção do controle biológico dentro do Manejo Integrado de Pragas (MIP), é a questão da cultura arraigada entre aqueles que manejam a cadeia produtiva. Estudos de Borsari e Claudino (2018), mostram que 43% dos produtores desconhecem as técnicas e produtos para controle biológico.

Problemas gerados pelo uso de moléculas químicas, como a resistência de pragas e patógenos, contaminações no ambiente e principalmente o surgimento de pragas secundárias, tem sido a justificativa para adesão de muitos produtores ao uso do controle biológico tanto no Brasil como no mundo (AGÊNCIA FAPESP, 2016).

Tendo em vista as questões de custos com a produção, a decisão para adotar ou não produtos para controle biológico, quer seja para o controle de infestações por pragas quer por doenças, depende de fatores como a constatação da eficiência e segurança do aplicador, bem como dos recursos hídricos e organismos não alvo (BORSARI; CLAUDINO, 2018).

Depois da proibição do endosulfan para o controle da broca-do-café, o número de produtos (princípio ativo) para o controle biológico de *H. hampei*, não teve grande incremento. Fatores tais como custos para registros de novos produtos, dos prazos serem longos e do enquadramento de biodefensivos serem os mesmos dos agrotóxicos têm dificultado tanto o desenvolvimento quanto a disponibilização de novos produtos no mercado (POMELLA, 2014). Mesmo com um bom gerenciamento da propriedade e da cultura do café de forma sustentável, o uso de diferentes estratégias de aplicação de produtos bem como controle da gestão ambiental são fundamentais para que o produtor tenha sucesso (MOREIRA et al., 2012).

Apesar do crescimento dos registros de produtos biológicos para o controle biológico de pragas nos últimos anos, para o enfrentamento de *H. hampei*, o mercado dispõe de produtos químicos em maior número que produtos para o controle biológico. Isso significa que estudos são necessários para o desenvolvimento de novas tecnologias de aplicação. Além disso, produtores devem ter constante atenção quanto ao uso dos fungicidas e a compatibilidade com

os produtos à base de fungos entomopatogênicos com vistas a não incorrer em gastos e ineficiência do bioprodutos utilizado (MOREIRA et al., 2012).

Os fungos entomopatogênicos são, em geral, menos suscetíveis aos efeitos negativos dos agroquímicos em relação aos parasitoides e insetos predadores. No entanto, defensivos químicos são os mais prejudiciais para esses microorganismos (MASCARIN; PAULI, 2010). Como exemplo, as aplicações de fungicidas para o controle da ferrugem do cafeeiro (doença causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*) ocasiona baixa eficiência do fungo *B. bassiana* (SANTINATO et al., 2017).

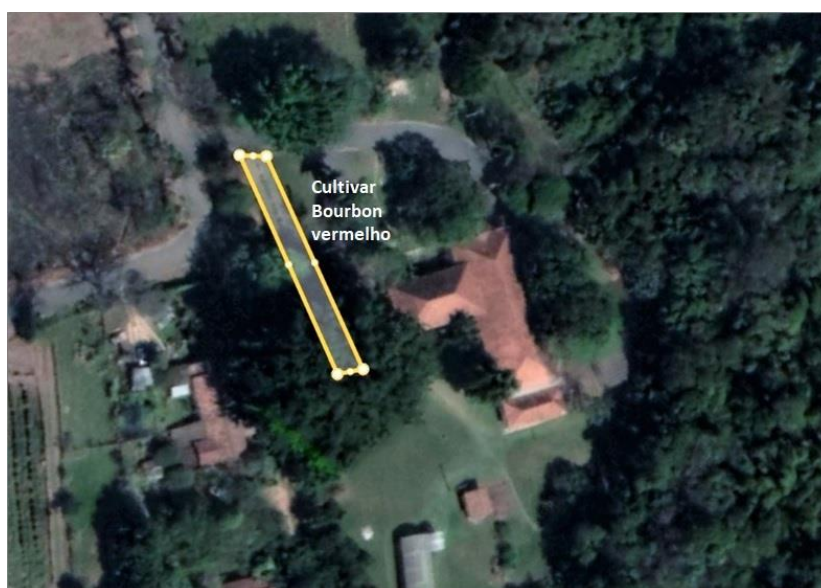
## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Área de desenvolvimento da pesquisa

O projeto de pesquisa foi desenvolvido nas dependências do Instituto Biológico, sendo em três áreas diferentes: na Unidade Laboratorial de Referência de Controle Biológico (Figura 8) no cafezal, ambos do CAPSA – Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde Animal, Campinas – SP (Figura 9) e no cafezal de São Paulo, Capital (Figura 10). Nos dois cafezais não há a aplicação de nenhum tipo de fungicida ou herbicida.



**Figura 8** – Laboratório de Controle Biológico - CAPSA- Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde, Campinas, SP, Brasil. **Fonte:** RMCPereira, 2019.



**Figura 9** – Cafezal - CAPSA- Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde; 22°54'22"S (Lat.) e 47°00'56"W (Long.). Área delimitada em amarelo corresponde a área da pesquisa. **Fonte:** Imagem adaptada de: Google Earth, 2019.



**Figura 10** – Cafezal do Instituto Biológico em São Paulo, SP, 23°35'16"S (Lat.) e 46°39'00"W (Long.). Área delimitada em amarelo corresponde a área da pesquisa. **Fonte:** Imagem adaptada de: Google Earth, 2019.

#### 4.2 Criação de *Hypothenemus hampei* em laboratório

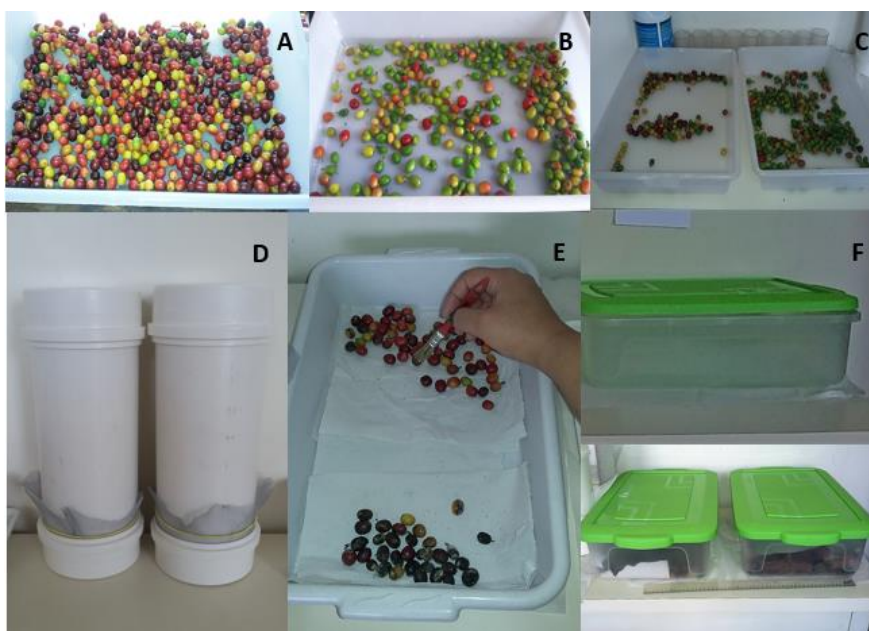
A criação de *H. hampei*, a broca-do-café, foi feita com base em Hirose e Neves (2002). Foram feitas adaptações à metodologia visando a maior facilidade no manejo e ao melhor controle da degradação e umidade dos grãos (Anexo I).

Os exemplares de *H. hampei* utilizados neste trabalho foram obtidos de frutos brocados das cultivares Mundo Novo e Catuaí, coletados no Cafezal Urbano do Instituto Biológico de São Paulo e no cafezal do CAPSA. As coletas se deram em períodos pré e pós colheita, em 2018 e 2019, ocasião em que os frutos se encontravam em estágios diferenciados de amadurecimento, havendo uma mescla de grãos verdes, esverdeados e cereja (Figura 11).



**Figura 11** – Frutos de café brocados dispostos em bandejas enquanto as gaiolas eram higienizadas. **Fonte:** RMC Pereira, 2018

Os frutos trazidos do campo foram higienizados com hipoclorito de sódio a 5%, ficando imersos nesta solução por aproximadamente 1 minuto, e após, enxaguado em água corrente. Posteriormente, o material foi deixado secar à sombra por 48 horas em seguida disposto em gaiolas feitas com tubos de PVC com 25 cm de altura e 10 cm de diâmetro, com uma tampa em cada extremidade, sendo uma delas consideradas o fundo da gaiola com tela de 2,5 mm de abertura e aproximadamente 15 x 15 cm de área, presas com elástico para facilitar o manejo e retirada dos insetos para os bioensaios (Figura 12). Nas gaiolas foram colocados papel toalha ao fundo e dentro do tubo com os grãos. Manteve-se a temperatura ambiente em  $26 \pm 1$  °C e UR  $\pm 60$ .



**Figura 12** – Criação de *Hypothenemus hampei* em condições de laboratório: A: grãos coletados; B: higienização; C: secagem; D: Gaiolas; E: triagem durante o manejo; F: caixas de criação. **Fonte:** RMC Pereira, 2018/2019.

A criação de *H. hampei* apresentou número de brocas suficientes para a realização dos bioensaios. Apesar do número de frutos de café em cada gaiola ser bem inferior ao recomendado por Hirose e Neves (2002), foi possível a obtenção, em geral, de uma quantidade maior que 20 insetos por gaiola/dia (Figura 13).

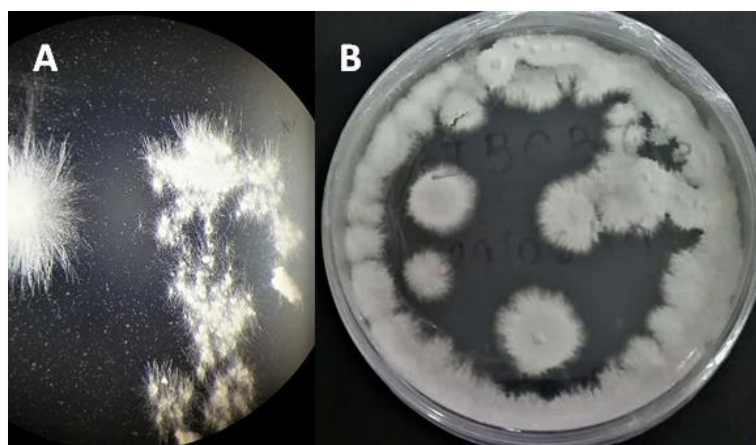


**Figura 13** – Tampa superior da gaiola no momento do manejo diário. **Fonte:** RMC Pereira, 2019.

Os experimentos de laboratório foram realizados entre o outono e o inverno e, por isso foi necessário a utilização de um aquecedor no ambiente para manter a temperatura em  $26 \pm 1$  °C entre maio e agosto de 2019.

#### 4.3 Isolado de *Beauveria bassiana* IBCB66

O agente microbiológico de controle utilizado nos bioensaios deste trabalho foi obtido do isolado IBCB 66 de *B. bassiana*. A cepa (Figura 14) pertence a Coleção de Fungos Entomopatogênicos “Oldemar Cardim Abreu” do CAPSA – Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde Animal do Biológico em Campinas – SP, reconhecida como fiel depositária pelo CGEN/MMA e é registrado como produto fitossanitário para uso na agricultura orgânica (BRASIL, 2016).



**Figura 14** – UFC's de IBCB66 após ficarem em câmara tipo B.O.D. ( $26 \pm 1$  °C) vista sob estereomicroscópio Stemi DV4 Zeiss® em ampliação de 16 vezes – A: colônias após 24 horas; B: colônias após 7 dias. **Fonte:** RMC Pereira, 2019.

### 4.3.1 Reprodução da cepa IBCB66 para os bioensaios

A reprodução da cepa IBCB66 de *B. bassiana* para os bioensaios foi realizada na ULR de Controle Biológico do Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde Animal (CAPSA). Nesta etapa, a produção do fungo *B. bassiana* foi realizada com base em Alves (1998); Leite et al., 2003 e Boletim Técnico 03 EMBRAPA (2004) e em conformidade com a rotina do laboratório, por dois processos:

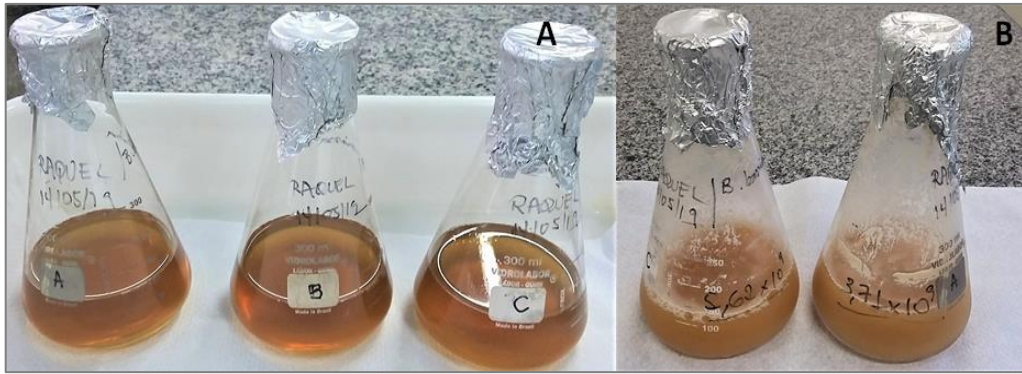
a) Produção por fermentação sólida (Figura 15): sacos plásticos de polipropileno com aproximadamente 500 g de arroz umedecido e esterilizado em autoclave a 121 °C por 30 minutos. Após o resfriamento, cada saco foi inoculado com 10 mL<sup>-1</sup> de suspensão com conídios aéreos proveniente do processo de raspagem de colônias de IBCB66. Após a inoculação, o material foi posto para fermentação por 15 dias em sala climatizada (26 ± 1 °C), até a esporulação do fungo.



**Figura 15** – Reprodução da cepa IBCB66: A: autoclave; B: sacos de polipropileno com arroz esterilizados em resfriamento; C: preparo da suspensão para inoculação; D: inoculação; E: fermentação em sala climatizada. **Fonte:** RMCPereira, 2019.

b) Produção por fermentação líquida em meio de cultura com balanceamento adequado de: extrato de levedura, sacarose, cloreto de potássio, fosfato monopotássico, sulfato de magnésio em 500 mL de água destilada. O material foi autoclavado e, após, dividido em três Erlenmeyers e inoculado com suspensão de conídios aéreos na concentração de  $1 \times 10^8$  conídios mL<sup>-1</sup> (Figura 16).



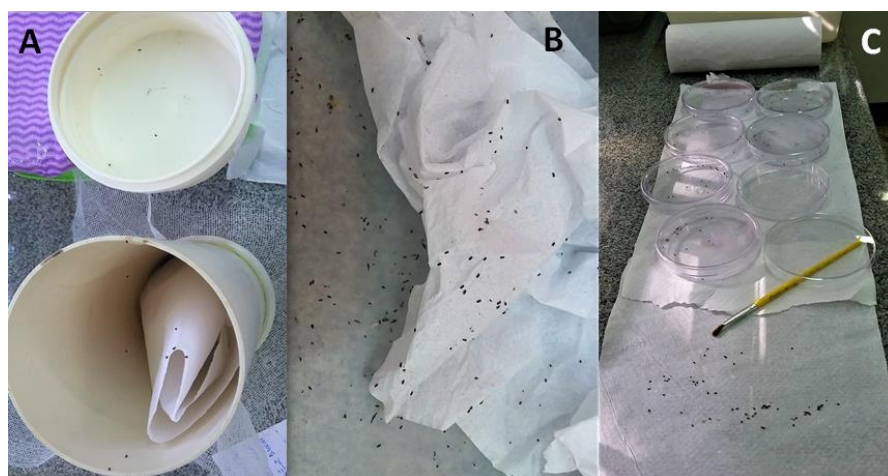


**Figura 16** – A: meio de cultura autoclavado; B: meio de cultura após inoculação da cepa IBCB66 e fermentação por 7 dias em agitador. **Fonte:** RMC Pereira, 2019.

Para fermentação, o material foi colocado em agitador orbital (200 rpm) em sala climatizada a  $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  por 7 dias (LEITE et al., 2003). Após, foi feita a contagem de conídios em câmara de Neubauer para identificação da concentração. Segundo Ottati-de-Lima et al. (2010), o método produz blastosporos em maior quantidade em relação ao volume do meio e conídios aéreos em menor tempo do que a fermentação sólida.

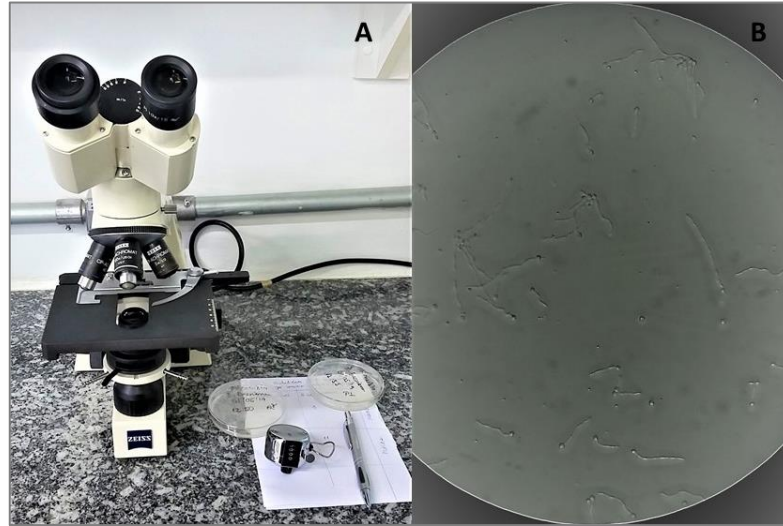
#### 4.4 Avaliação dos métodos de aplicação: imersão, pulverização em Torre de Potter e caminhamento, em adultos de *H. hampei*, em condições de laboratório

Nos experimentos realizados em laboratório foram utilizados insetos fêmeas e adultas, com idade aproximada entre 21 e 25 dias. Na ocasião da realização dos experimentos, após a retirada do papel toalha das gaiolas ou da caixa de criação, foi feita a separação das brocas com auxílio de um pincel macio previamente lavado com álcool 70% e seco (Figura 17).



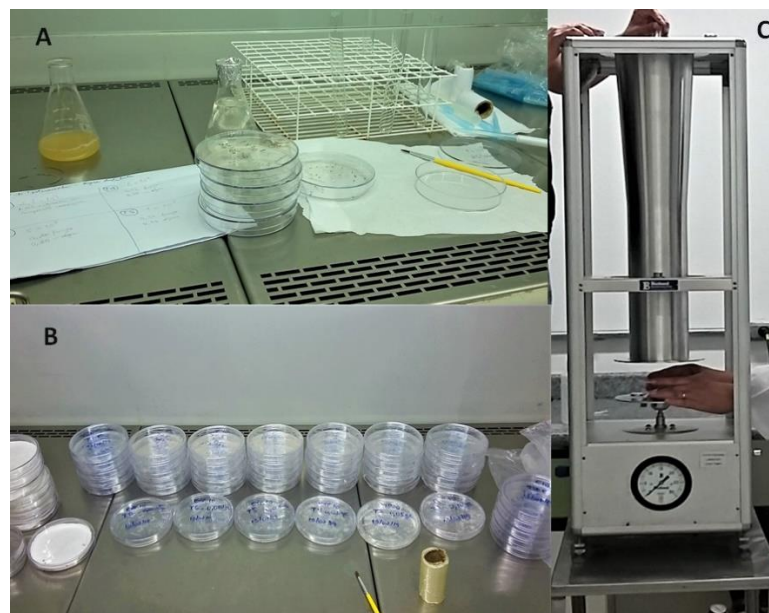
**Figura 17** – Processo de retirada de *Hypothenemus hampei* para os experimentos: A: brocas na gaiola; B: brocas no papel toalha na caixa de criação; C: separação com pincel macio e disposição em placas de petri esterilizadas. **Fonte:** RMC Pereira, 2019.

Para todos os experimentos foram também realizados testes de viabilidade dos materiais antes da realização (Figura 18).



**Figura 18** – A: microscópio óptico, contador manual e placas com fungo inoculado com IBCB 66 após 15 horas em câmara climatizada tipo B.O.D. ( $26 \pm 1$  °C); B: conídios germinados e não germinados vistos sob microscópio óptico em ampliação de 400 x. **Fonte:** RMCPereira, 2019.

Os experimentos foram realizados por meio dos seguintes métodos de aplicação: por imersão em suspensão com blastosporos, por pulverização de suspensão com conídios aéreos em Torre de Potter e por caminhamento sobre pó de conídios aéreos puros e secos. Foram realizados três experimentos para cada método (19).



**Figura 19** – Métodos de aplicação: A: por imersão com suspensão com blastosporos; B: por pulverização de suspensão com conídios aéreos em Torre de Potter; C: por caminhamento sobre pó de conídios aéreos. **Fonte:** RMCPereira, 2019.

Para cada experimento de cada método: foi utilizado 175 exemplares de fêmeas adultas de *H. hampei*, retirados do processo de criação ou na véspera ou no próprio dia do ensaio.

As suspensões fúngicas utilizadas foram feitas com blastosporos para aplicação pelo método de imersão, foram sete tratamentos, sendo um deles apenas com o veículo da suspensão (água destilada) e o restante com as concentrações padronizadas em:  $2,4 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^7$  e  $1 \times 10^7$  conídios/mL<sup>-1</sup>.

A aplicação das suspensões pelo método de imersão foi feita da seguinte forma: para cada concentração foi feita preparação das diluições em vidraria esterilizada. Em fluxo laminar, foi disposto 1mL da suspensão fúngica, conforme a concentração para o tratamento, em uma placa de Petri contendo 25 brocas, as quais ficaram imersas por cerca de 10 segundos. Em seguida, foram separadas em cinco repetições e em grupos de cinco besouros e colocados em câmara climatizada tipo Fitotron ( $25 \pm 2$  °C; UR 47) com avaliação a cada 24 horas, por até dez dias, para acompanhamento da mortalidade e separação em câmaras úmidas.

Para a aplicação das suspensões pelo método de pulverização em Torre de Potter (Burkard, Rickmansworth Herts England), com ajuste de pressão para garantir a deposição de  $1,8 \pm 0,1$  mg por cm<sup>-2</sup> por placa submetida à pulverização de 1mL da suspensão fúngica. As suspensões foram preparadas com conídios aéreos em pó, em fluxo laminar, com vidraria esterilizada para ajustes das concentrações. Depois, as suspensões foram colocadas em tubos próprios para o equipamento, e pulverizadas sobre placa de Petri contendo 25 brocas por tratamento. Posteriormente, os insetos foram separados em cinco repetições com cinco brocas em cada, e colocados em câmara climatizada tipo Fitotron ( $25 \pm 2$  °C; UR  $\pm$  47) com avaliação a cada 24 horas, por até 10 dias, para acompanhamento da mortalidade e separação em câmaras úmidas.

Para os experimentos por caminhamento sobre o pó, foram utilizados conídios aéreos peneirados de arroz+fungo cuja concentração inicial foi de  $1,14 \times 10^{10}$  conídios/g padronizados em  $1,14 \times 10^9$ ;  $5,7 \times 10^9$ ;  $1,14 \times 10^8$ ;  $5,7 \times 10^7$ ;  $1,14 \times 10^7$  e  $5,7 \times 10^6$  conídios/g. Foram 7 tratamentos sendo a testemunha sem o pó.

A aplicação dos conídios em pó foi feita da seguinte forma: os conídios aéreos foram pesados em placa de Petri estéril conforme cada concentração. Em fluxo laminar, foram colocadas 25 brocas, previamente separadas, em placa Petri com o fungo e conforme cada tratamento. O caminhamento dos insetos sobre o pó foi feito por cerca de 30 segundos sendo após retirados e divididos em cinco repetições. Após, foram colocados em câmara climatizada

tipo Fitotron ( $25 \pm 2$  °C; UR  $\pm$  47) com avaliação a cada 24 horas, por até 10 dias, para acompanhamento da mortalidade e separação em câmaras úmidas.

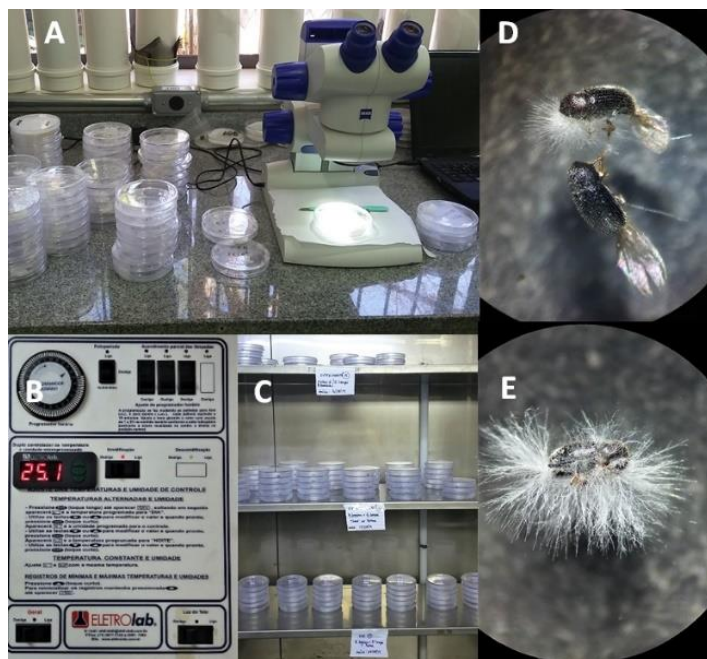
Após 24 horas da realização foi colocada dieta natural que consistiu em lascas de frutos de café recém colhidos (Figura 20).



**Figura 20** - Colocação de dieta após 24 horas da realização do experimento. **Fonte:** RMC Pereira, 2019.

Realizou-se um último experimento com o seguinte delineamento: um teste para cada método de aplicação (imersão, pulverização em Torre de Potter e caminhamento), com concentração única de  $1 \times 10^8$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ . Para cada método foram dois tratamentos, sendo um a testemunha com água destilada. Foram utilizadas 25 fêmeas adultas de *H. hampei* para cada tratamento e nas mesmas condições biológicas dos experimentos anteriores. As aplicações foram realizadas conforme cada método já descrito anteriormente.

Todos os experimentos foram avaliados sob estereomicroscópio Stemi DV4 Zeiss®, com aumento de visualização variando entre 12 e 16 vezes, conforme a necessidade de nitidez, para avaliar as condições dos insetos bem como sua motilidade e a mortalidade. Para os dez experimentos foram utilizados um total de 1.725 brocas. (Figura 21).



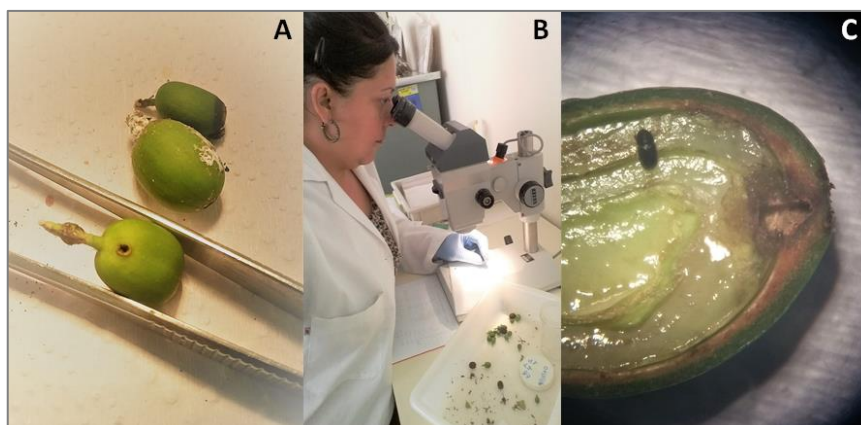
**Figura 21** – Avaliação da mortalidade e evolução da esporulação por IBCB66: A: acompanhamento da mortalidade sob estereomicroscópio; B: painel da câmara climatizada; C: insetos mortos em câmara úmida e na prateleira da câmara climatizada; D e E, insetos mortos com esporulação apresentada após 72 horas da constatação do óbito. **Fonte:** RMC Pereira, 2019.

#### 4.5 Avaliação dos métodos de aplicação por pulverização e polvilhamento de *B. bassiana* no cafezal de São Paulo

Conforme estudos de Neves et al. (2005) e Botero (2018), a concentração mínima para aplicação em campo deve ser de  $1 \times 10^9$  a  $5 \times 10^9$  conídios viáveis/g, diluídos em 1 L de água. Sendo assim foram escolhidas as concentrações de  $2 \times 10^{13}$  e  $5 \times 10^{12}$  para os experimentos no cafezal de São Paulo.

Antes do início dos experimentos foi realizada coleta prévia para confirmação da ocorrência de *H. hampei* na área de estudos. Foram cinco parcelas demarcadas para cada área, com delineamento ao acaso para cinco tratamentos e cinco repetições cada. Foram coletados 20 frutos por planta, sendo 10 de cada face, de forma aleatória e nos três terços da planta.

Quanto ao número de plantas nas parcelas, foram cinco plantas úteis para a cultivar Mundo Novo e três plantas úteis para a cultivar Catuaí. Após a coleta prévia foi constatada existência do besouro-praga nas parcelas demarcadas (Figura 22).



**Figura 22-** Avaliação dos frutos após coleta prévia: A: fruto perfurado; B: observação sob estereomicroscópio; C: constatação da ocorrência de *Hypothenemus hampei*. **Fonte:** RMC Pereira, 2019.

Foram realizados dois experimentos entre os meses de Dezembro de 2018 e Março de 2019 denominados experimentos I cultivar Mundo Novo e II cultivar Catuaí. Entre Novembro de 2019 e Março de 2020 foi realizado o experimento III com a cultivar Catuaí.

Nos experimentos I e II, os grãos se encontravam ainda na fase ‘chumbão’ e granação progressiva (diminuição dos níveis de água no interior do fruto). O delineamento experimental foi realizado em blocos inteiramente casualizados, por meio de dois métodos de aplicação: pulverização e polvilhamento.

Cada experimento foi dividido em cinco parcelas com cinco tratamentos cada: testemunha, polvilhamento em solo, polvilhamento na planta, pulverização no solo e pulverização na planta. A concentração foi padronizada em  $2 \times 10^{13}$  UFC ha<sup>-1</sup> tanto para o pó quanto para a suspensão (calda).

A área de estudos foi demarcada com estacas numeradas e respeitando-se fileira e plantas de bordas (Figura 23).



**Figura 23** – Campo demarcado e bandejas em dia de coleta: A: plantas Mundo Novo; B: início de parcela da cultivar Catuaí. **Fonte:** RMC Pereira, 2019.

Foram três aplicações em intervalos de 30 dias, sempre no período entre 16h:00min e 18h30min para favorecimento da adesão e germinação do fungo e maior probabilidade de atingir a broca em voo. Para a calda, foi utilizado pó molhável Ecobass® com 2,8 g de fungo/parcela e aplicação foi feita com atomizador costal STIHL SG20. Na data da aplicação, os fungos foram retirados do freezer e acondicionados em caixa de isopor, contendo gelo artificial, e utilizados apenas no momento da preparação da calda (diluição) já em campo (Figura 24).



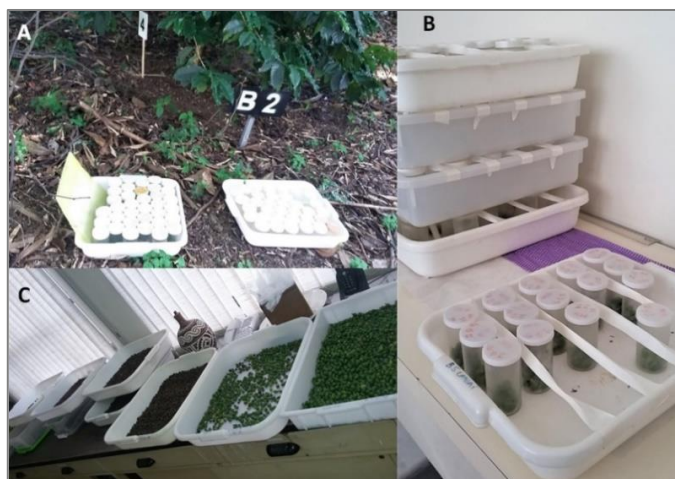
**Figura 24** – Preparação da calda em campo: A: Materiais para a preparação da calda; B: Atomizador costal utilizado nas pulverizações. **Fonte:** RMCPereira, 2019.

Para a aplicação por polvilhamento, foi utilizado pó de arroz+fungo (PS), e a aplicação foi feita com polvilhadeira manual tipo talqueira (Figura 25), estéril, de uso único, com a concentração padronizada em  $2 \times 10^{13}$  UFC ha<sup>-1</sup>. A pesagem dos fungos foi realizada no final da tarde do dia anterior à aplicação acondicionados diretamente na polvilhadeira. O material foi mantido em freezer ( $-10 \pm 4$  °C).



**Figura 25** – A: pesagem do material em polvilhadeira manual estéril; B: aplicação na cultivar Mundo Novo. **Fonte:** RMCPereira, 2019.

Foram coletados dez frutos por planta, sendo cinco em cada face e de forma aleatória, respeitando-se as condições das plantas, em campo, com o objetivo de avaliar a porcentagem de frutos brocados e não brocados. As coletas foram realizadas em 7, 14, 21 e 28 dias após cada aplicação (Figura 26).



**Figura 26** – A: bandejas com potes plásticos em dia de coleta; B: material de campo em fase de análise; C: grãos após as análises de cada coleta dispostos em bandejas. **Fonte:** RMC Pereira, 2019.

O experimento III foi realizado na área da cultivar Catuaí entre Novembro de 2019 e Março de 2020. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com cinco parcelas e cinco tratamentos: testemunha, pulverização na planta, pulverização no solo, polvilhamento na planta e polvilhamento no solo.

Para o método de aplicação por pulverização, neste experimento, a calda foi feita com blastosporos, cuja concentração de  $5 \times 10^9$  UFC/ha com adição de espalhante Silwet a 0,1% e aplicada com costal Guarany (Figura 27).



**Figura 27** – Preparação de calda com blastosporos de IBCB66: A: blastosporos de IBCB66 e espalhante Silwet; B: costal já com a calda e em campo. **Fonte:** RMC Pereira, 2019.



Para a aplicação por polvilhamento, foi utilizado pó de arroz+fungo (PS), sendo a aplicação feita com polvilhadeira manual tipo talqueira, estéril e de uso único, com a concentração padronizada em  $2 \times 10^{13}$  UFC há-1. Repetiu-se a forma de pesagem acondicionamento e transporte ao campo realizadas nos experimentos I e II.

Foram feitas três aplicações com intervalos de 30 dias cada. As coletas foram feitas quinzenalmente sendo duas após cada aplicação. A cada coleta, avaliou-se o número de frutos total em cada tratamento, o número de frutos brocados.

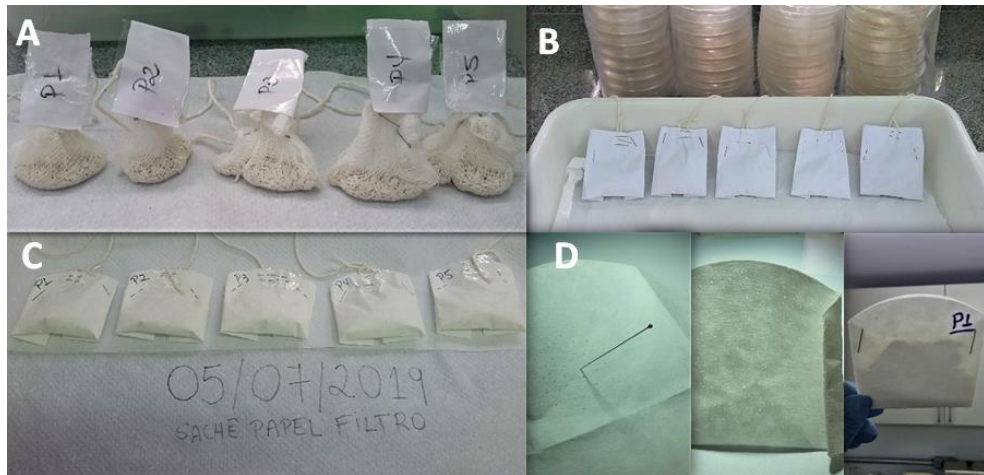
#### **4.6 Avaliação de disseminadores de conídios de *B. bassiana* no cafezal de Campinas - SP**

Foram realizados quatro experimentos: dois com sachês por 24 horas, um com sachês por 15 dias e um com sachês por 30 dias. Foram realizados entre abril e setembro de 2019 no cafezal do Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde Animal, Campinas – SP, com a cultivar Bourbon vermelho de cerca de quatro anos. O experimento com sachês por 30 dias foi realizado no cafezal urbano em São Paulo, SP, com a cultivar Mundo Novo de cerca de 25 anos com sachês contendo conídios de *B. bassiana* puro.

Para os três primeiros experimentos o delineamento foram de duas maneiras: a) dois experimentos com sachês por 24h, com distâncias diferentes para o experimento I e para o Experimento II, com o objetivo de verificar se haveria ou não dispersão do fungo na área de estudos; b) um experimento com sachês em campo por 15 dias com o objetivo de verificar a durabilidade dos materiais e viabilidade dos conídios após o período exposto às intempéries.

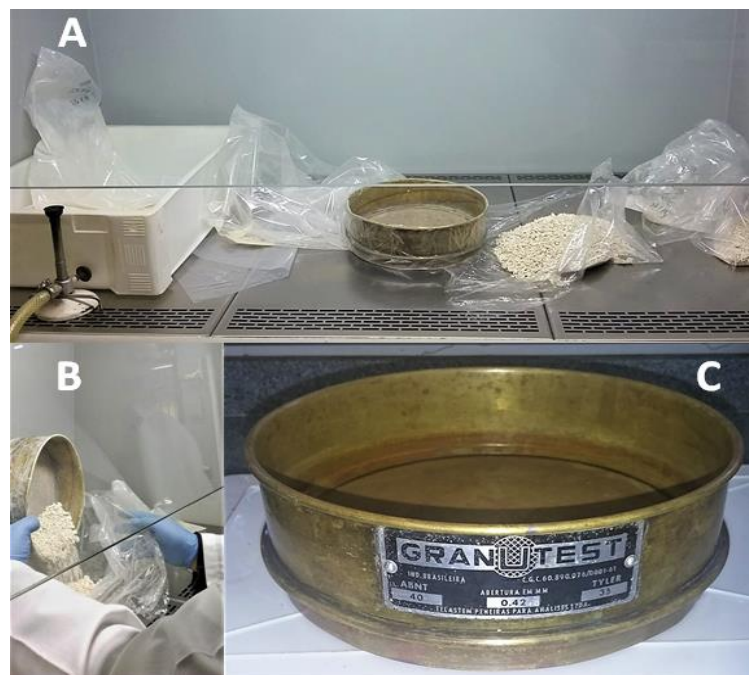
Após a instalação foram identificadas as posições dos pontos cardeais e colaterais, conforme o posicionamento da linha do cafezal para posterior avaliação da interferência da direção do vento. Em relação à altura da colocação dos disseminadores, houve variação entre 1 e 0,80 m, conforme as condições das plantas em campo. Os dados referentes a direção do vento foram obtidos de estação meteorológica instalada no próprio cafezal.

Para a confecção dos sachês foram utilizados os seguintes materiais: gaze de algodão 13 fios 7,5 x 7,5cm, papel filtro com permeabilidade do ar em  $14 \text{ l/m}^2$  e 12,5 diâmetro, papel sulfite branco gramatura  $75/\text{m}^2$  e papel filtro de 12,5 diâmetro furado com alfinete e permeabilidade do ar indefinida (Figura, 28).



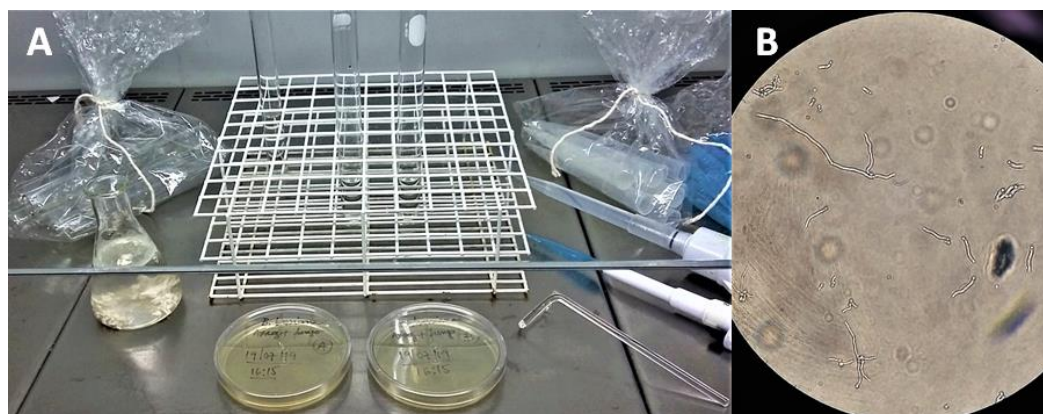
**Figura 28** – Confeção de sachês disseminadores com diferentes materiais: A: sachês de gaze de algodão; B: sachês de papel sulfite; C: sachês de papel filtro; D: sachê de papel filtro sendo furado e pronto para campo. **Fonte:** RMC Pereira, 2019.

Cada material foi considerado um tratamento, sendo T1 a testemunha sem sachê, T2 sachês de gaze de algodão, T3 sachês de papel filtro, T4 sachê de papel sulfite, com a padronização da quantidade de 10 g de arroz + fungo na concentração de  $2 \times 10^9$  conídios/g para cada sachê. Já para T5, sachês feitos com papel filtro furado com agulha entomológica nº3, padronizou-se 1 g de pó de conídios aéreos puros na concentração de  $1 \times 10^{10}$  conídios/g, obtidos do peneiramento do mesmo material por meio de peneira com malha de 0,42 mm de abertura (Figura 29).



**Figura 29** – Processo de extração de conídios aéreos de IBCB66: A: material em fluxo laminar B: peneiramento de arroz+fungo; C: peneira. **Fonte:** RMC Pereira, 2019.

Antes da instalação dos sachês de cada experimento foram realizados testes de viabilidade dos conídios aéreos de IBCB66 (Figura 30).



**Figura 30** – Teste para verificação de viabilidade: A: material em fluxo laminar; B: placa de petri observada durante a contagem dos conídios viáveis, ampliação em microscópio óptico 100x. **Fonte:** RMC Pereira, 2019.

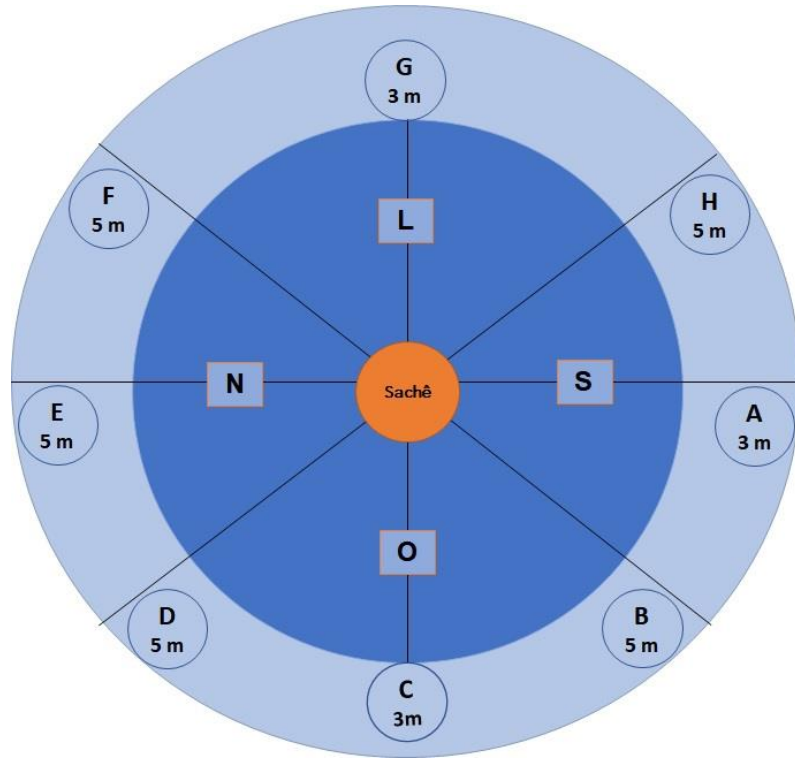
#### 4.6.1 Sachês por 24 horas

Para os tratamentos com sachês, em cada repetição foi colocado no ponto central um sachê disseminador, fixado na planta com barbante, sendo denominados Ps1, Ps2, Ps3, Ps4 e Ps5.

Para cada uma das repetições foram marcados 8 pontos denominados A, B, C, D, E, F, G e H. Para detecção de conídios dispersos, em cada ponto foi fixada uma placa de Petri, com BDA (Batata-dextrose-ágar), fixada ao ramo da planta com fita adesiva e com a face, contendo o meio de cultura, voltada para o ponto central.

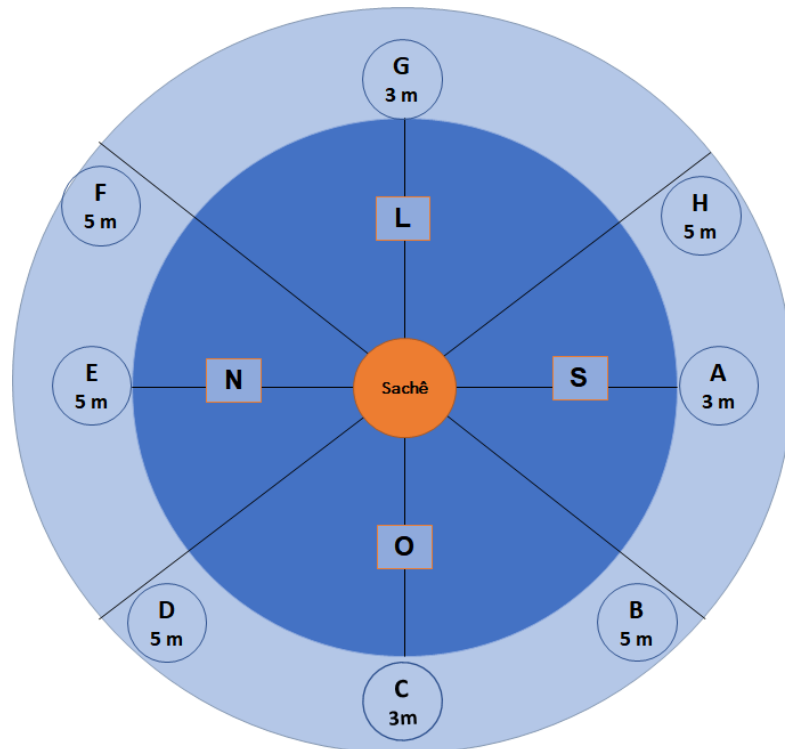
As avaliações e contagem do número de UFC's (Unidades formadoras de colônias) se deram após o material ficar em câmara climatizada tipo B.O.D. ( $26 \pm 1$  °C) entre 3 e 5 dias.

No experimento I, as repetições foram marcadas com dois pontos em 3 m e seis pontos em 5 m (Figura 31).



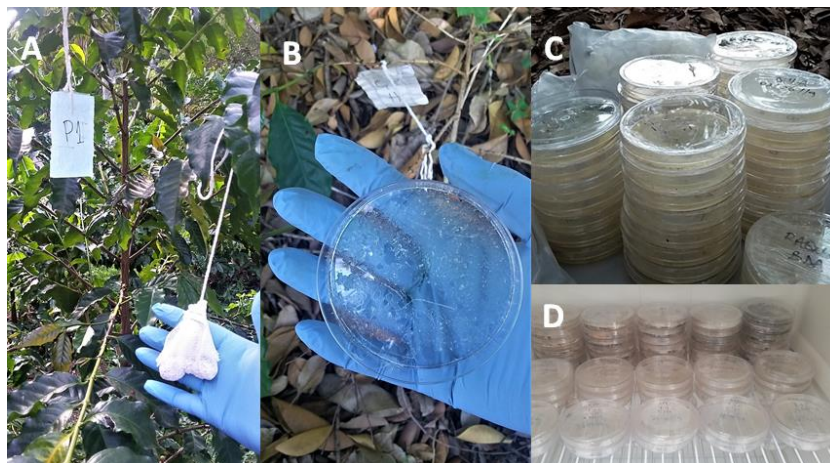
**Figura 31** – Figura sem escala representando a marcação e direção dos pontos para cada repetição do experimento I. **Fonte:** RMCPereira, 2019.

No experimento II, as repetições foram marcadas com quatro pontos em 3 m e quatro pontos em 5 m (Figura 32).



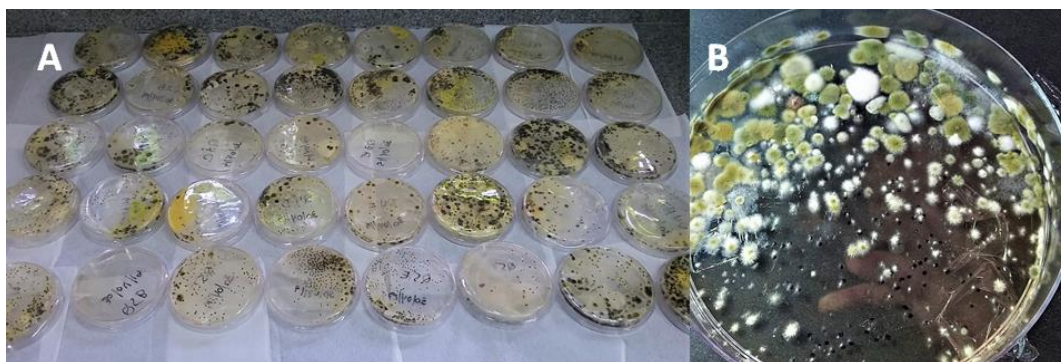
**Figura 32** – Figura sem escala representando a marcação e direção dos pontos para cada repetição do experimento II. **Fonte:** RMCPereira, 2019.

Tanto os sachês quanto as placas de Petri com BDA, permaneceram em campo por 24 horas e após foram retirados. As placas de Petri foram identificadas e lacradas com plástico filme ainda em campo e dispostas em câmara climatizada tipo B.O.D. ( $26 \pm 1$  °C) (Figura 33).



**Figura 33** – A: sachê de gaze de algodão com substrato de arroz+fungo no ponto 1; B: placa de petri após as 24 horas; C: placas de petri de todas as repetições após a retirada de campo; D: placas de Petri dispostas em câmara climatizada tipo B.O.D. **Fonte:** RMC Pereira, 2019.

A avaliação consistiu na contagem do número de UFC's de *B. bassiana*, que foi feita com marcador para retroprojeter simultaneamente ao contador manual, para cada placa retirada de cada ponto e de cada repetição. De cada repetição, a placa que apresentou maior número de UFC para *B. bassiana* foi selecionada para repicagem e constatação do fungo disseminado (Figura 34).



**Figura 34** – A: placas de Petri do experimento I após 4 dias em câmara climatizada tipo B.O.D. e após a contagem das UFC's; B: placa de petri com maior número de UFC de *Beauveria bassiana*. **Fonte:** RMC Pereira, 2019.

#### 4.6.2 Sachês por 15 dias

Com objetivo de verificar a durabilidade do substrato, a viabilidade dos conídios e do material de confecção dos sachês, foram realizados experimentos com os sachês expostos por 15 dias em campo.

Foram instaladas placas de Petri com BDA (Batata-dextrose-ágar) a cada 3, 7, 10 e 14 dias, sendo retiradas de campo em 24 horas. Após cada retirada, as placas foram devidamente lacradas em campo e acondicionadas em câmara climatizada tipo B.O.D. ( $26 \pm 1$  °C) por 3 a 4 dias. O sachê disseminador foi retirado de campo aos 15 dias juntamente com a última bateria de placas com BDA.

Os materiais dos sachês, as concentrações do fungo, o número de tratamentos, o número de repetições e as marcações de campo foram os mesmos utilizados no experimento II com sachês por 24 horas. Houve diferença apenas na ordem da aplicação da testemunha, que neste experimento foi o último tratamento.

Para a constatação da viabilidade dos conídios após ficarem em campo por 15 dias, foi realizado teste de viabilidade do material. Foi retirado de cada sachê 1 g do material arroz+fungo e 0,1 g do conídio pó. As suspensões foram feitas em 100 mL de água destilada autoclavada, seguindo protocolo de diluição seriada em  $10^4$  em seguida o protocolo de inoculação em placa de Petri com BDA (batata-dextrose-ágar) com posterior acondicionamento em câmara climatizada tipo B.O.D. ( $26 \pm 1$  °C) e avaliados após 15 horas (Figura 35).



**Figura 35** – Teste de viabilidade, em fluxo laminar, com o conteúdo dos sachês de papel sulfite após 15 dias em campo. **Fonte:** RMC Pereira, 2019.

#### **4.7 Avaliação de disseminadores de conídios de *B. bassiana* em campo, São Paulo, SP**

Após os experimentos com os sachês disseminadores no cafezal de Campinas - SP, o material que apresentou melhor resultado na disseminação de IBCB66 foi o sachê de papel filtro furado com agulha entomológica e permeabilidade indefinida e foi utilizado para a realização de novo experimento no cafezal de São Paulo. As aplicações foram feitas na área da cultivar Mundo Novo, no cafezal urbano do Instituto Biológico em São Paulo – SP.

##### **4.7.1 Sachês por 30 dias**

Foram realizadas três aplicações com intervalo de 30 dias com duas coletas a cada aplicação em intervalos de 15 dias. Antes da instalação de cada bateria do experimento foram realizados testes de viabilidade dos conídios aéreos de IBCB66.

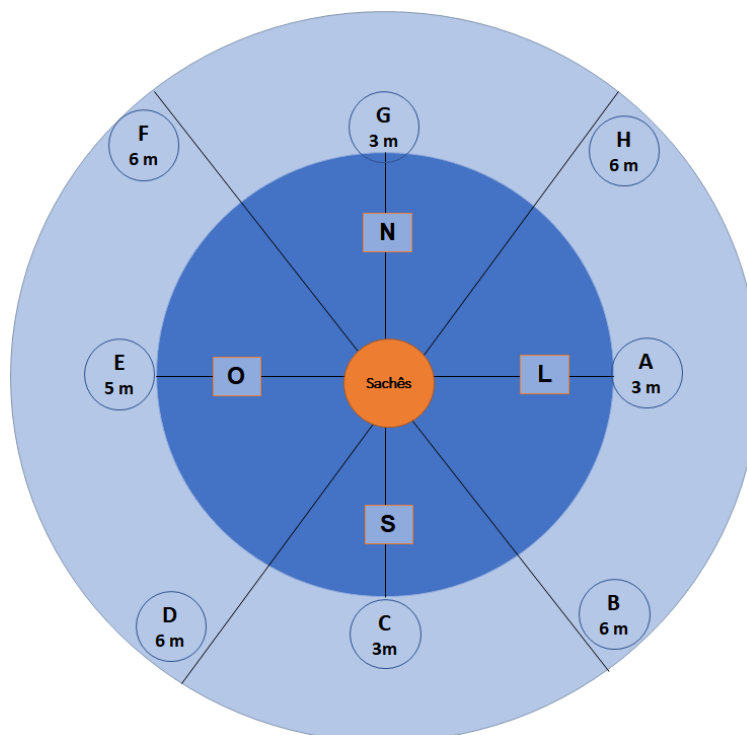
Foi utilizado pó de conídios aéreos obtidos do peneiramento de arroz+fungo por meio de peneira com malha de 0,42 mm de abertura. Padronizou-se a concentração em  $5,98 \times 10^9$  conídios g para as três aplicações.

Foram quatro tratamentos, sendo:

- T1 a testemunha e sem o sachê;
- T2 com um sachê instalado a 0,50 m;
- T3 com dois sachês sendo um em 0,50 m e um em 1,0 m;
- T4 com um sachê em 0,50 m, um sachê em 1,0 m e um sachê em 1,50 m .

Para cada tratamento foram cinco pontos centrais denominados Ps1, Ps2, Ps3, Ps4 e Ps5 e cinco repetições. Os sachês foram fixados na planta com barbante.

Para cada uma das repetições foram marcados 8 pontos denominados A, B, C, D, E, F, G e H, sendo quatro pontos em 3 m e quatro pontos em 6 m (Figura 36).



**Figura 36** – Figura sem escala representando a marcação e direção dos pontos para cada repetição do experimento com sachês disseminadores no cafezal de São Paulo - SP. **Fonte:** RMC Pereira, 2019.

#### 4.8 Estudos econômicos

Para a realização dos estudos econômicos do presente trabalho foram consultados sites de órgãos governamentais, de entidades do setor cafeeiro, de associações na área de controle biológico e fitossanidade e seus respectivos documentos, tais como gráficos, planilhas e informações sobre o aumento dos registros de produtos para controle biológicos bem como a evolução do setor. Também, foram obtidas informações verbais acerca de custos com a produção de fungos entomopatogênicos e gastos com o uso de defensivos agrícolas para o controle biológico na cultura cafeeira.

#### 4.9 Análise estatística

Para os experimentos realizados em laboratório foi aplicada análise de variância (ANOVA), com as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Conforme Ferreira (2000) foi utilizado o software SISVAR<sup>®</sup> da Universidade Federal de Lavras. Para os experimentos de campo, foi aplicada análise de variância (ANOVA), com médias comparadas pelo teste de Duncan (VIEIRA, 2011) com probabilidade de 5%, por meio do software SPSS<sup>®</sup> Statistics versão 12.1.



## 5. RESULTADOS

### 5.1 Mortalidade de fêmeas adultas de *Hypothenemus hampei* em laboratório

A viabilidade dos conídios aéreos e blastosporos de IBCB66 para utilização nos experimentos apresentaram resultados aceitáveis, com médias entre 85,5% e 90% de conídios aéreos viáveis e para os blastosporos a média das unidades formadoras de colônias ficaram entre 207 e 233x10<sup>4</sup> (Tabela 1).

**Tabela 1** - Porcentagem média da viabilidade de conídios aéreos/mL<sup>-1</sup> e de Ufc's de blastosporos de *Beauveria bassiana* IBCB66 para os experimentos realizados em laboratório

Experimento	Conídios aéreos	Blastosporos (*Ufc)
Imersão 1	-	241
Imersão 2	-	236
Imersão 3	-	232
Imersão final	-	246
Pulverização T.P. 1	97,5	-
Pulverização T.P. 2	90	-
Pulverização T.P. 3	92	-
Pulverização T.P. Final	90	-
Caminhamento 1	97,5	-
Caminhamento 2	96	-
Caminhamento 3	90	-
Caminhamento Final	91	-

\*Ufc= unidade formadora de colônia

#### 5.1.1 Aplicação de suspensão por imersão

Nos experimentos realizados em laboratório, a mortalidade média apresentada para os experimentos por imersão em suspensão com blastosporos de *B. bassiana*, mostraram no teste 1 maior eficiência de mortalidade para a concentração 2,4 x 10<sup>9</sup> conídios/mL<sup>-1</sup> com média de 4,60 mortos, para o teste 2, a concentração mais eficiente foi a de 1 x 10<sup>8</sup> conídios/mL<sup>-1</sup> com média de 4,80 mortos e para o teste 3, a concentração mais eficiente foi a de 5 x 10<sup>7</sup> conídios/mL<sup>-1</sup> com média 4,60 mortos (Tabela 2).

**Tabela 2** – Mortalidade de *Hypothenemus hampei* infectada com suspensão de blastosporos de *Beauveria bassiana* aplicados por imersão ( $26 \pm 1^\circ \text{C}$ ; UR  $\pm$  47)

Tratamentos (n=7) <sup>1</sup>	Teste 1	Teste 2	Teste 3
	Média	Média	Média
Testemunha	1,20 $\pm$ 0,7 a	2,00 $\pm$ 0,4 a	1,80 $\pm$ 0,8 a
1 x 10 <sup>7</sup>	1,50 $\pm$ 0,7 a	3,25 $\pm$ 0,4 a b	3,00 $\pm$ 0,4 a b c
1 x 10 <sup>8</sup>	2,80 $\pm$ 0,7 a b	4,80 $\pm$ 0,8 a b	3,80 $\pm$ 0,5 b c
5 x 10 <sup>7</sup>	2,60 $\pm$ 0,8 a b	3,80 $\pm$ 0,2 a b	4,60 $\pm$ 0,5 c
5 x 10 <sup>8</sup>	2,60 $\pm$ 0,5 a b	4,20 $\pm$ 0,4 a b	2,00 $\pm$ 0,5 a b c
1 x 10 <sup>9</sup>	3,60 $\pm$ 0,6 b	3,60 $\pm$ 0,6 b	3,00 $\pm$ 0,2 a b c
2,4 x 10 <sup>9</sup>	4,60 $\pm$ 1,1 b	4,20 $\pm$ 0,6 b	4,00 $\pm$ 0,4 b c
CV (%)	41,02	18,25	28,33

<sup>1</sup>Média seguida de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Dados originais e transformados por raiz quadrada de x + 0,5 na análise.

Esses resultados não devem ser atrelados aos métodos de produção das unidades infectivas dos blastosporos, pois seguiu-se a mesma padronização técnica e sanitária de manipulação e condições climáticas do laboratório em todos os experimentos. Em estudos de Bernardo (2016), foi feita comparação entre a utilização de blastosporos e conídios aéreos de *Metarhizium robertsii* (IP 146), *Metarhizium anisopliae s.l.* (IP 363) e *Beauveria bassiana s.l.* (IP 361 e CG 307) sobre larvas e fêmeas ingurgitadas do carrapato *Rhipicephalus microplus*. As concentrações utilizadas foram 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>, e 10<sup>8</sup> propágulos/mL para as suspensões fúngicas do isolado IP361 de blastosporos de *B. bassiana* aplicadas pelo método de imersão. Os resultados em relação à virulência para larvas de *Rhipicephalus microplus*, foi constatado mortalidade superior a 90 % enquanto conídios do mesmo isolado apresentaram mortalidade em 63,29 %. Entretanto, o autor registrou maior mortalidade na menor concentração aplicada. Esses resultados estão em acordo com os resultados para a menor concentração com maior mortalidade nos testes de imersão do presente trabalho.

Foi possível observar que apesar da eficiência da estrutura blastosporos como agente infectivo no controle biológico mas ainda são escassas pesquisas com tecnologias de aplicação para este tipo de estrutura do fungo.

### 5.1.2 Aplicação de suspensão por pulverização em Torre de Potter

Nos experimentos por pulverização em Torre de Potter, para o teste 1, observou-se que não houve diferença estatística entre as doses aplicadas, somente em relação a testemunha. Para o teste 2, houve elevada variação na análise e mortalidade média entre 1,20 e 4,20 insetos. No teste 3 a média de mortalidade geral foi menor que nos testes anteriores e,

apesar disso, verificou-se média de 3,0 mortos na concentração de  $5 \times 10^7$  conídios/mL<sup>-1</sup> (Tabela 3).

**Tabela 3** – Mortalidade de *Hypothenemus hampei* infectada com suspensão de conídios aéreos de *Beauveria bassiana* aplicados por pulverização em Torre de Potter ( $26 \pm 1$  °C; UR  $\pm 47$ )

Tratamentos (n=7) <sup>1</sup>	Teste 1	Teste 2	Teste 3
	Média	Média	Média
Testemunha	1,60±0,6 a	3,20±0,8 a b	2,60±0,7 a b c
1 x 10 <sup>7</sup>	2,75±0,6 a b	2,80±0,5 a b c	2,60±0,7 a b c
1 x 10 <sup>8</sup>	4,20±0,5 b	2,40±0,2 a b c	2,40±0,5 a b c
5 x 10 <sup>7</sup>	4,20±0,7 b	4,20±0,4 c	3,00±0,4 a
5 x 10 <sup>8</sup>	4,20±0,5 b	1,80±0,5 a b	1,40±0,5 b c
1 x 10 <sup>9</sup>	4,60±0,4 b	1,20±0,4 a	1,20±0,5 c
2,4 x 10 <sup>9</sup>	4,00±0,2 b	2,20±0,6 a b	2,40±0,7 a b c
CV (%)	24,36	29,86	20,50

<sup>1</sup>Média seguida de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Dados originais e transformados por raiz quadrada de  $x + 0,5$  na análise.

Nos três testes realizados por aplicação por meio de pulverização em Torre de Potter com as suspensões fúngicas de conídios aéreos de *Beauveria bassiana*, não apresentaram diferenças estatísticas entre si mesmo com as concentrações utilizadas padronizadas para todos. Os resultados não estão coerentes com os resultados dos testes de viabilidade do material antes do uso, que ficaram acima de 90% de conídios viáveis, além da padronização das condições técnicas de manipulação e climáticas do laboratório. Entretanto, apesar da não ter sido registrada significância estatística, houve registro de maior mortalidade para a concentração  $1 \times 10^9$  com média de mortos em 4,60 besouros.

Semelhantemente aos resultados obtidos nos experimentos desta pesquisa, sobre a mortalidade de *Hypothenemus hampei* por pulverização em Torre de Potter, estudos de Wenzel et al. (2006) com lagartas *Diatraea saccharalis*, as concentrações  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  e  $5 \times 10^8$  conídios/mL<sup>-1</sup> foram estatisticamente iguais e apresentaram índices entre 65 e 89% de mortalidade. Esses resultados corroboram com o presente trabalho em relação a não obtenção de diferenças estatísticas entre as concentrações aplicadas podendo indicar que os conídios aplicados não atingiram as partes mais vulneráveis do inseto.

Diferentemente das suspensões fúngicas utilizadas nos experimentos deste trabalho, nas quais não foram utilizadas adjuvantes, em sua pesquisa de MOTA (2017), fez o uso do adjuvantes Tween 80, Silwet L-77 e Break Thru, e mesmo assim foi observada baixa mortalidade na infecção de *H. hampei* pelo método de pulverização em Torre de Potter. O autor argumenta que esses resultados podem ser justificados tanto pelas características hidrofóbicas

do conídio quanto pela existência um grande número de estruturas quitinosas (setas) na parte dorsal da broca, o que dificultaria a adesão do fungo ao corpo do hospedeiro. Ainda, segundo o autor, existem na literatura vários estudos que apontam mortalidade inferior a 50% na aplicação de *Beauveria bassiana* pelo referido método de aplicação.

### 5.1.3 Aplicação por caminhamento sobre conídios aéreos em pó

Nos experimentos por caminhamento sobre conídios em pó, para o teste 1, não houve diferença estatística entre as concentrações, porém a concentração  $1 \times 10^8$  conídios/g apresentou uma média de 5,00 mortos. Para o teste 2, a concentração de  $1 \times 10^{10}$  conídios/g resultou em uma média de mortos de 4,60 porém houve diferença estatística somente em relação à concentração  $5 \times 10^8$  conídios/g que apresentou 2,40 mortos. Para o teste 3 também a concentração de  $1 \times 10^{10}$  conídios/g apresentou maior eficiência com a média de mortos de 3,80 diferenciando-se dos tratamentos: Testemunha,  $5 \times 10^7$  e  $5 \times 10^8$  conídios/g. (Tabela 4).

**Tabela 4** – Mortalidade de *Hypothenemus hampei* infectada com de conídios aéreos de *Beauveria bassiana* em pó aplicados por caminhamento ( $25 \pm 1^\circ \text{C}$ ; UR  $\pm 47$ )

Tratamentos (n=7) <sup>1</sup>	Teste 1	Teste 2	Teste 3
	Média	Média	Média
Testemunha	2,80 $\pm$ 0,6 a	2,80 $\pm$ 0,2 a b	0,60 $\pm$ 0,4 a
$5 \times 10^7$	3,75 $\pm$ 0,6 a b	4,25 $\pm$ 0,2 a b	1,40 $\pm$ 0,5 a b
$1 \times 10^8$	5,00 $\pm$ 0,5 b	3,40 $\pm$ 0,8 a b	3,20 $\pm$ 0,5 b c
$5 \times 10^8$	4,80 $\pm$ 0,6 b	2,40 $\pm$ 0,5 a	1,40 $\pm$ 0,2 a b
$1 \times 10^9$	4,60 $\pm$ 0,5 b	4,20 $\pm$ 0,7 a b	2,20 $\pm$ 0,6 b c
$5 \times 10^9$	4,60 $\pm$ 0,4 b	3,80 $\pm$ 0,7 a b	3,00 $\pm$ 0,8 b c
$1 \times 10^{10}$	4,80 $\pm$ 0,2 b	4,60 $\pm$ 0,6 b	3,80 $\pm$ 0,6 c
CV (%)	11,12	24,01	49,23

<sup>1</sup>Média seguida de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Dados originais e transformados por raiz quadrada de  $x + 0,5$  na análise.

Observou-se também que a mortalidade de brocas adultas foi maior nos experimentos onde a aplicação de conídios foi em pó seco, em comparação com os experimentos com blastosporos e conídios pulverizados. Ainda, foi possível observar que os blastosporos são infectivos aos adultos da broca, com mortalidade muito próxima aos conídios aéreos pulverizados.

dos três experimentos apresentarem resultados com maior média de mortalidade em relação aos demais métodos utilizados nesta pesquisa, quando avaliados entre si, foi possível observar menor mortalidade no teste 3, com menor mortalidade registrada para

as concentrações  $5 \times 10^7$  e  $5 \times 10^8$ , ambas com 1,40 mortos em média e sem diferenças estatísticas entre si.

Em estudos com tecidos sintéticos impregnados por conídios de *B. bassiana* contra *H. hampei*, Mota (2013) relata que a exposição de fêmeas adultas ao fungo por 5 segundos foi suficiente para a letalidade do inseto. Além disso, o autor afirma que a mortalidade dos insetos podem estar associadas a maior exposição das partes ventrais e estruturas menos quitinosas do besouro ao fungo aplicado.

#### 5.1.4 Experimento com três métodos de aplicação simultâneos

Dos três métodos de aplicação testados de maneira simultânea com a concentração única de  $1 \times 10^8$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ , o método de caminhamento sobre pó de conídios aéreos de *B. bassiana* apresentou melhor resultado, sendo a média de mortalidade de *H. hampei* de 4,0 (Tabela 5).

**Tabela 5** – Mortalidade média de *Hypothenemus hampei* infectada com conídios aéreos de *Beauveria bassiana* e blastosporos por diferentes métodos de aplicação de forma simultânea ( $25 \pm 1$  °C; UR  $\pm$  47)

Tratamentos (n=2) <sup>1</sup>			
	Imersão	Pulverização T.P.	Caminhamento
Testemunha	2,6±0,5 c	2,6±0,5 c	2,6±0,5 c
1 x 10 <sup>8</sup>	2,25±0,3 a	2,25±0,5 a	4,0±0,4 b
CV (%)	NS	NS	NS

<sup>1</sup>Média seguida de mesma, nas colunas, letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Dados originais e transformados por raiz quadrada de  $x + 0,5$  na análise.

A realização do teste final com os três métodos de forma simultânea e com a concentração única em  $1 \times 10^8$ , apresentaram também melhores médias de mortalidade de *H. hampei* para o método de caminhamento sobre pó de conídios aéreos com 4,0 mortos em média em comparação com os métodos de imersão e pulverização em Torre de Potter. Entretanto, não foi observada diferença estatística na testemunha que para os três métodos de aplicação apresentaram 2,6 mortos em média.

Em relação a esporulação na carcaça do inseto infectado após a aplicação pela suspensão de blastosporos, por caminhamento sobre conídios aéreos de IBCB66 em pó puro, não se observou diferença visual após 96 horas. Além disso, a observação de presença de ovos durante a avaliação da mortalidade nesse experimento corrobora com dados da literatura que informam que fêmeas adultas de *H. hampei* emergem dos frutos já copuladas (Figura 37).



**Figura 37 - A:** *Hypothenemus hampei* após 48 horas da pulverização da suspensão fúngica em Torre de Potter; 1 = *H. hampei* viva e ovo em grão da dieta; 2 = *H. hampei* morta e sem esporulação; **B:** *H. Hampei* em esporulação após 96 horas da imersão em suspensão de blastosporos IBCB66; **C:** *H. Hampei* em esporulação após 96 horas do caminhamento sobre pó *Beauveria bassiana*. **Fonte:** RMC Pereira, 2019.

Esses registros estão de acordo com os resultados dos três testes com as diferentes concentrações realizados anteriormente neste trabalho, podendo a mortalidade ser justificada pela exposição das partes menos quitinizadas do inseto ao fungo, ocasionando maior óbito. No geral, para cada um dos métodos de aplicação não houve diferença significativa entre a mortalidade da testemunha, que teve a média de mortes igualmente em 2,6 mortos.

## 5.2 Experimentos de campo, cafezal urbano SP

Os testes de viabilidade realizados para os produtos com conídios aéreos de *B. bassiana*, IBCB66, apresentaram resultados esperados, com médias entre 85,5% e 90% de conídios viáveis e para os blastosporos a média de unidade formadora de colônia (UFC) ficaram entre 207 e 233x10<sup>4</sup> (Tabela 6).

**Tabela 6** - Porcentagem média da viabilidade de conídios aéreos e de unidade formadora de colônia de blastosporos de IBCB66 para os experimentos realizados no cafezal de São Paulo

	2018 Dez	2019 Jan	2019 Fev	2019 Nov	2019 Dez	2020 Jan
PRODUTO	*A 1	*A 2	*A3	*A1	*A2	*A3
Pó molhável Ecobass®	87	94	92,5	-	-	-
Pó arroz + fungo (PS)	85,5	88	90	88,5	89,5	89,5
				**Ufc	**Ufc	**Ufc
Blastosporos	-	-	-	207	231,5	233

\*A= aplicação; \*\*Ufc= unidade formadora de colônia.

Os índices de frutos brocados já se apresentavam altos tanto para a cultivar Mundo Novo, com 17,75% quanto para a cultivar Catuaí, com 34,25%. Esta condição da área de estudos pode estar relacionada com os resultados obtidos em todos os experimentos realizados no cafezal. Além disso, na primeira aplicação do experimento I e II, pode ter ocorrido interferência da temperatura na adesão e germinação do fungo, uma vez que, na data de 17/12/2018 foi registrada temperatura de 34 °C e foi considerada a tarde mais quente da história para a região (INMET, 2018).

### 5.2.1 Experimento I, cultivar Mundo Novo

O experimento I realizado no cafezal urbano de São Paulo-SP, após a avaliação da coleta prévia, as médias de frutos brocados variaram entre 6,11% e 17,75%. (Tabela 7).

**Tabela 7** – Cultivar Mundo Novo. Porcentagem de frutos brocados por *Hypothenemus hampei* em coleta prévia realizada em 10/12/2018, apenas com a demarcação das repetições ( $28 \pm 1$  °C na data da coleta)

Tratamentos (n=5) <sup>1</sup>	Coleta Prévia
	Média
Testemunha	17,75 ± 5,4
Polvilhamento solo	12,13 ± 6,3
Pulverização planta	6,11 ± 1,2
Polvilhamento planta	16,75 ± 7,5
Pulverização solo	13,06 ± 4,7

Após a primeira aplicação do fungo *B. bassiana*, houve pequena variação, mas sem diminuição da porcentagem de frutos brocados. Observou-se que houve diferença estatística entre os tratamentos com pulverização na planta e no solo após 28 dias da aplicação, com menor número de frutos brocados do que a Testemunha e o polvilhamento no solo. Houve pequena variação na porcentagem de frutos brocados, sendo a menor média para o tratamento de polvilhamento na planta para a coleta realizada aos 14 dias que, apresentou 8,10% de frutos brocados. Apesar disso, para este tratamento essa média não diferiu estatisticamente da obtida na testemunha, que foi de 9,40% para a coleta de mesma data (Tabela 8).

**Tabela 8** – Porcentagem de frutos brocados por *Hypothenemus hampei* após a primeira aplicação de conídios de *Beauveria bassiana* para o período de 17/12/2018 a 17/01/2019 ( $34 \pm 1$  °C) na data da aplicação)

Tratamentos (n=5) <sup>1</sup>	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
	Média	Média	Média	Média
Testemunha	13,00 ± 4,7 a	9,40 ± 3,4 a	17,80 ± 3,4 a	15,73 ± 4,0 b
Polvilhamento solo	12,80 ± 5,8 a	11,20 ± 5,3 a b	18,00 ± 3,3 a	19,40 ± 3,7 b
Pulverização planta	9,80 ± 2,2 a	10,60 ± 1,8 a b	10,10 ± 1,4 a	11,70 ± 3,8 a
Polvilhamento planta	14,30 ± 5,5 a	8,10 ± 1,4 a b	15,20 ± 5,0 a	13,40 ± 4,5 a
Pulverização solo	21,80 ± 8,2 a	20,53 ± 4,2 b	16,00 ± 4,1 a	13,10 ± 4,6 a
CV (%)	54,61	40,24	23,50	5,68

<sup>1</sup>Média seguida de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Fisher (LSD) a 5%. Dados originais e transformados por raiz quadrada de  $x + 0,5$  na análise.

Na segunda aplicação, o número de frutos brocados apresentou-se maior que as anteriores. Entretanto há que se considerar que não houve coletas em 7 e 14 dias, e não houve diferenças entre as médias. Dos índices registrados nas testemunhas a maior média foi de 18,10%. Mesmo assim, em comparação com a primeira aplicação, o tratamento de pulverização na planta apresentou menor porcentagem de frutos brocados, com 13,30% na coleta aos 28 dias. (Tabela 9).

**Tabela 9** – Porcentagem de frutos brocados por *Hypothenemus hampei* após a segunda aplicação de conídios de *Beauveria bassiana* para o período de 18/01/2019 a 17/02/2019 ( $28 \pm 1$  °C na data da aplicação)

Tratamentos (n=5) <sup>1</sup>	21 dias	28 dias
	Média	Média
Testemunha	18,10 ± 5,3 a	13,40 ± 5,0 a
Polvilhamento solo	14,40 ± 4,5 a	19,20 ± 4,3 a
Pulverização planta	13,60 ± 4,0 a	13,30 ± 3,3 a
Polvilhamento planta	19,80 ± 5,8 a	14,40 ± 1,6 a
Pulverização solo	21,40 ± 6,1 a	13,00 ± 5,3 a
CV (%)	32,40	34,16

<sup>1</sup>Média seguida de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Fisher (LSD) a 5%. Dados originais e transformados por raiz quadrada de  $x + 0,5$  na análise.

Após a terceira aplicação, a porcentagem média para CV (%) apresentou variação entre 18,24% (7 dias) e 16,15% (14 dias), sendo as demais não significativas. Os índices de porcentagens registrados continuaram altos, sendo os menores apresentados para o tratamento de polvilhamento em solo com 10,10% de frutos brocados, seguido do tratamento de pulverização na planta com 11,50% dos frutos perfurados pela broca. Entretanto, esses valores menores podem estar diretamente ligados as condições de campo registradas na coleta prévia, que apresentou 12,13% de frutos brocados para o tratamento de pulverização no solo e 6,11% de frutos brocados em pulverização na planta (Tabela 10), e não especificamente relacionados com a eficiência da aplicação ou do patógeno empregado no experimento.



**Tabela 10** – Porcentagem de frutos brocados por *Hypothenemus hampei* após a terceira aplicação de conídios de *Beauveria bassiana* para o período de 18/02/2019 a 17/03/2019 ( $27 \pm 1$  °C na data da aplicação)

Tratamentos (n=5) <sup>1</sup>	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
	Média	Média	Média	Média
Testemunha	12,90 ± 3,0 a	14,40 ± 2,1 a	13,99 ± 0,7	14,80 ± 1,8
Polvilhamento solo	10,10 ± 1,0 a	14,60 ± 2,6 a	13,99 ± 0,9	14,80 ± 2,2
Pulverização planta	11,50 ± 1,6 a	16,40 ± 1,7 a	14,66 ± 0,8	20,10 ± 0,7
Polvilhamento planta	15,50 ± 3,7 a	16,20 ± 1,8 a b	13,33 ± 0,8	18,40 ± 1,2
Pulverização solo	16,50 ± 4,6 a	18,40 ± 2,8 b	16,33 ± 0,9	20,30 ± 1,6
CV (%) =	18,24	16,15	NS	NS

<sup>1</sup>Média seguida de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Fisher a 5%. Dados originais e transformados por raiz quadrada de  $x + 0,5$  na análise apenas para a coleta 1.

### 5.2.2 Experimento II, cultivar Catuaí

A área da cultivar apresentou índice maior de infestação na coleta prévia em comparação ao índice registrado para a cultivar Mundo Novo. Enquanto para a cultivar Mundo Novo, foi registrado maior índice em 17,75% de frutos brocados, para a cultivar Catuaí foi registrado 25,06% , ambos na testemunha, seguidos do índice de 34,25% registrado nas parcelas marcadas para o tratamento de polvilhamento na planta (Tabela 11).

**Tabela 11** – Porcentagem de frutos brocados por *Hypothenemus hampei* em coleta prévia em 07/12/2018, apenas com a demarcação das repetições ( $27 \pm 1$  °C na data da coleta)

Tratamentos (n=5) <sup>1</sup>	Coleta Prévia
	Média
Testemunha	25,06 ± 2,0
Polvilhamento solo	25,54 ± 4,3
Pulverização planta	21,19 ± 3,3
Polvilhamento planta	34,25 ± 5,8
Pulverização solo	25,54 ± 4,0
CV (%)	NS

Após a primeira aplicação, verificou-se na coleta aos 7 dias, que o tratamento por meio de pulverização em solo obteve 15,99% e aos 21 dias 11,33% de frutos brocados, sendo este último o menor apresentado para as quatro coletas realizadas. Também, não foi possível observar diferença estatística entre os tratamentos e, ao contrário do que se esperava, não houve diminuição nos índices de porcentagens de frutos brocados. (Tabela 12).

**Tabela 12** – Porcentagem de frutos brocados por *Hypothenemus hampei* após a primeira aplicação de conídios de *Beauveria bassiana* para o período de 17/12/2018 a 17/01/2019 ( $34 \pm 1$  °C na data da aplicação)

Tratamentos (n=5) <sup>1</sup>	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
	Média	Média	Média	Média
Testemunha	26,94 ± 6,5 a b	26,66 ± 5,8 a	21,99 ± 5,4 b	25,33 ± 4,4 b
Polvilhamento solo	29,99 ± 4,8 a b	24,66 ± 7,0 a	18,33 ± 5,8 a b	21,99 ± 6,4 a
Pulverização planta	32,99 ± 7,2 b	25,66 ± 7,1 a	22,66 ± 5,6 a	25,33 ± 6,4 b
Polvilhamento planta	24,66 ± 6,0 a b	25,33 ± 5,5 a	17,99 ± 3,4 a b	27,33 ± 3,2 b
Pulverização solo	15,99 ± 2,8 a	20,66 ± 6,6 a	11,33 ± 2,2 a	21,32 ± 2,0 a b
CV (%)	25,49	38,56	21,66	9,31

<sup>1</sup>Média seguida de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Fisher (LSD) a 5%. Dados originais e transformados por raiz quadrada de  $x + 0,5$  na análise.

Verificou-se que após a segunda aplicação, as médias para as avaliações em 21 e 28 dias, não apresentaram diminuição dos frutos brocados em relação a coleta prévia e não houve diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 13).

**Tabela 13** – Porcentagem de frutos brocados por *Hypothenemus hampei* após a segunda aplicação de conídios de *Beauveria bassiana* para o período de 18/01/2019 a 17/02/2019 ( $28 \pm 1$  °C na data da aplicação)

Tratamentos (n=5) <sup>1</sup>	21 dias	28 dias
	Média	Média
Testemunha	28,66 ± 5,3 a	28,66 ± 4,2 a
Polvilhamento solo	25,33 ± 1,2 a	25,33 ± 2,3 a
Pulverização planta	27,33 ± 4,5 a	27,33 ± 4,0 a
Polvilhamento planta	25,33 ± 7,5 a	25,33 ± 4,3 a
Pulverização solo	26,99 ± 6,3 a	26,99 ± 2,5 a
CV (%)	23,23	23,23

<sup>1</sup>Média seguida de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Fisher a 5%. Dados originais e transformados por raiz quadrada de  $x + 0,5$  na análise.

Após a terceira aplicação a porcentagem de frutos brocados continuou alto sendo registrados 20,66% na testemunha e, as menores médias de porcentagem de frutos brocados foram registradas no tratamento de polvilhamento em solo com 12,66% na coleta aos 14 dias seguida da menor porcentagem na última coleta (28 dias) com 11,99% de frutos brocados. A porcentagem de grãos brocados nesse tratamento permaneceu menor, em relação aos demais, durante as avaliações da terceira aplicação (Tabela 14).

**Tabela 14** – Porcentagem de frutos brocados por *Hypothenemus hampei* após a terceira aplicação de conídios de *Beauveria bassiana* para o período de 18/02/2019 a 17/03/2019 ( $27 \pm 1$  °C na data da aplicação)

Tratamentos (n=5) <sup>1</sup>	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
	Média	Média	Média	Média
Testemunha	20,66 ± 1,9	17,32 ± 0,7 b	13,99 ± 0,6 a	19,33 ± 3,4 c
Polvilhamento solo	15,33 ± 4,6	12,66 ± 1,7 a	13,99 ± 1,2 a	11,99 ± 3,9 a
Pulverização planta	25,99 ± 1,9	17,99 ± 2,5 b	14,66 ± 1,7 a	15,33 ± 2,7 b
Polvilhamento planta	17,99 ± 3,7	17,32 ± 3,6 b	13,33 ± 2,5 a	18,66 ± 2,3 c
Pulverização solo	17,66 ± 2,2	14,66 ± 2,3 b	16,33 ± 2,8 a	21,99 ± 0,8 d
CV (%) =	NS	9,58	15,42	2,91

<sup>1</sup>Média seguida de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Fisher a 5%. Dados originais e transformados por raiz quadrada de  $x + 0,5$ .

Em estudos com delineamento semelhante ao realizado por pulverização neste trabalho, Santinato (2017) realizou experimento em São Pedro da União, MG, em lavoura da cultivar Catuaí Vermelho com índices de infestação por broca entre 3% e 5% e na ausência de fungicida. O autor informa que foi utilizado *Beauveria bassiana* (Boveril/ Koppert®), e após a terceira aplicação também obteve-se resultados altos de infestação com nenhuma diminuição dos frutos brocados.

### 5.2.3 Experimento III, cultivar Catuaí

Após a realização do experimento II com a cultivar Catuaí, o cafezal a área de estudos apresentou infestação acima de 8% e média de 25% de frutos brocados. Essa constatação levou a realização do experimento III entre novembro de 2019 e fevereiro de 2020, com o diferencial de pulverização na planta e solo com calda feita à base de blastosporos de IBCB66 e com coletas a cada 15 dias, ou seja, ao invés de quatro coletas como nos experimentos anteriores, dessa vez apenas duas foram realizadas.

Para o experimento III, realizado com pulverização de suspensão de blastosporos e polvilhamento com pó de arroz+fungo (PS), as menores porcentagens foram constatadas na coleta 1 após a aplicação 1 e foi de 28,0% no tratamento testemunha. Após a aplicação 2, o menor índice de frutos brocados foi registrado no tratamento pulverização com blastosporos na planta, apresentando 38,8%. Após a aplicação 3, o tratamento que apresentou menor índice de frutos brocados foi o de pulverização com blastosporos em solo sendo 34,7% (Tabela 15).

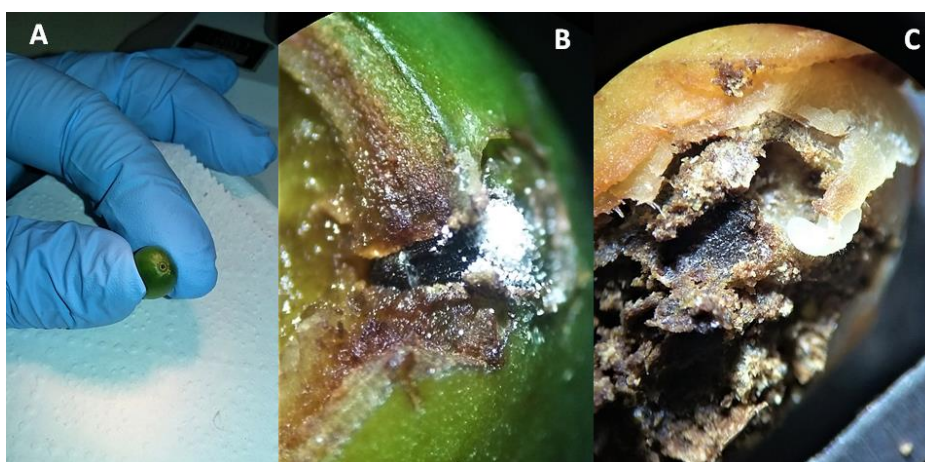
**Tabela 15** - Frutos atacados (%) por broca-do-café, *Hypothenemus hampei*, tratados com pulverização de suspensão de blastosporos de IBCB66 e polvilhamento com conídios de *Beauveria bassiana* em área de café Catuaí (São Paulo-SP)

(n=5) <sup>1</sup> Tratamentos	Aplicação 1 Nov. 2019		Aplicação 2 Dez. 2019		Aplicação 3 Jan. 2020	
	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 1	Coleta 2
Testemunha	28,0 ± 4,9 a	31,0 ± 2,6 a	42,8 ± 2,7 a	52,3 ± 2,5 a	42,0 ± 1,3 b	45,3 ± 2,0 a
Pulv. Bl. Pl.	44,0 ± 9,3 a	41,3 ± 4,9 a	38,8 ± 2,9 a	45,7 ± 1,7 a	40,8 ± 1,3 a b	44,6 ± 2,3 a
Pulv. Bl. So.	30,6 ± 4,5 a	33,2 ± 4,5 a	42,6 ± 3,9 a	50,0 ± 4,0 a	34,7 ± 2,0 a	40,0 ± 1,0 a
Polv. Co. Pl.	36,7 ± 4,9 a	34,0 ± 3,1 a	43,6 ± 2,7 a	50,6 ± 2,5 a	39,7 ± 3,0 a b	45,3 ± 2,2 a
Polv. Co. So.	38,0 ± 4,6 a	38,6 ± 4,4 a	41,5 ± 2,8 a	44,2 ± 1,3 a	41,7 ± 1,9 b	42,0 ± 2,2 a
CV (%)	38	25,2	14,8	14,4	12,3	10,5

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

Ao longo deste experimento, os frutos avaliados apresentaram estágios diferentes a cada aplicação e coleta, com predominância de frutos em estágio chumbão. Nas coletas realizadas em novembro e dezembro de 2019, os estágios de formação dos frutos apresentaram variações com poucos frutos em estágio chumbinho, alguns em fase de embotoamento (flores em transformação de fruto) e ainda ramos com flores.

Nas coletas realizadas entre janeiro e fevereiro de 2020, gradativamente os frutos foram atingindo o estágio de chumbão (fruto ainda aquoso mas já com menor teor de água em seu interior) até os maduros, o que proporcionou a coleta do número de frutos estipulado para cada planta e, apenas nesta fase foi possível encontrar alguns frutos maduros, nos quais pôde-se encontrar, em seu interior, larvas (Figura 38).



**Figura 38** – Experimento III, cultivar Catuaí, imagens das análises da coleta 2 após a segunda aplicação: A: fruto Catuaí brocado; B: broca morta e infectada com *Beauveria bassiana*; C larvas de *Hypothenemus hampei*. **Fonte:** RMCPereira, 2019.

Estudos de Okumura et al. (2003) com a aplicação de *Beauveria bassiana* por pulverização no controle da broca-do-café em terreiros de secagem de café, apresentaram resultados de mortalidade do inseto em 49,72 % para a concentração de  $1 \times 10^{11}$  entretanto foram

também registrados mortalidade de 44,63% de mortalidade por outros motivos tais como o manuseio durante o experimento e pela ocorrência de fungos saprófitas e/ou oportunistas. Embora a concentração utilizada pelo autor seja menor que a utilizada nos experimentos deste trabalho que foi de  $2 \times 10^{13}$ , estes resultados corroboram com este trabalho, tendo em vista que apesar da diferença no local da realização da pesquisa, os índices de frutos brocados registrados foram altos.

O fato da possível migração dos insetos dentro da área total do cafezal, pode estar relacionado com o registro baixo da mortalidade de *H. hampei* por *B. bassiana* no decorrer dos experimentos e relacionados ainda com a porcentagem de frutos brocados. Isso corrobora com os estudos de Neves et al. (2008) que afirmam que o fungo pode matar a broca em um período de 4 a 5 dias, o que permitiria a disseminação do fungo pelo próprio inseto infectado. Tal situação poderia justificar a observação de frutos com a brocas mortas e infectadas com *B. bassiana* tanto em plantas que não necessariamente estavam marcadas quanto as que se encontravam fora da área de estudos (Figura 39).



**Figura 39** – Frutos observados após o experimento III da cultivar Catuaí; A= brocas infectadas em planta não marcada porém dentro da área delimitada; B= brocas infectadas observada em planta fora da área delimitada na pesquisa. Fonte: RMC Pereira, 2020.

### 5.3 Avaliação de disseminadores de conídios aéreos nos cafezais de Campinas, SP e São Paulo, SP

Os testes de viabilidade com os conídios aéreos realizados antes da execução dos experimentos com os disseminadores com conídios aéreos de *Beauveria bassiana* nos cafezais de Campinas – SP e São Paulo - SP, apresentaram médias entre 94% e 97% de conídios viáveis em  $1\text{mL}^{-1}$  (Tabela 16), demonstrando condições padrões para aplicação nos experimentos.

**Tabela 16** - Porcentagem média da viabilidade de conídios aéreos  $\text{mL}^{-1}$  de *Beauveria bassiana*, antes da realização dos experimentos realizados nos cafezais de Campinas – SP e São Paulo – SP

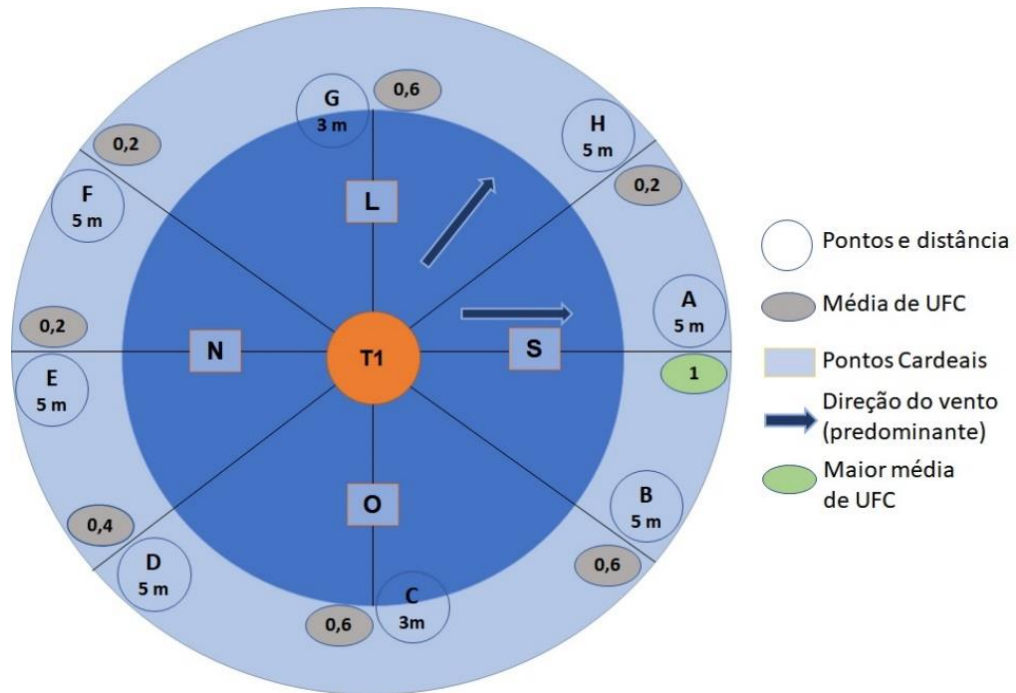
Tratamentos	Campinas 24h Experimentos		Campinas 15 dias Experimento	São Paulo 30 dias Aplicações		
	I	II	I	A1	A2	A3
*Sachê gaze	94	93,5	97	-	-	-
*Sachê papel filtro	94	93,5	91,5	-	-	-
*Sachê papel sulfite	94	93,5	93,5	-	-	-
**Sachê papel filtro furado	94,5	97	95,5	97	97,5	96,5

\* arroz+fungo; \*\*conídios aéreos em pó

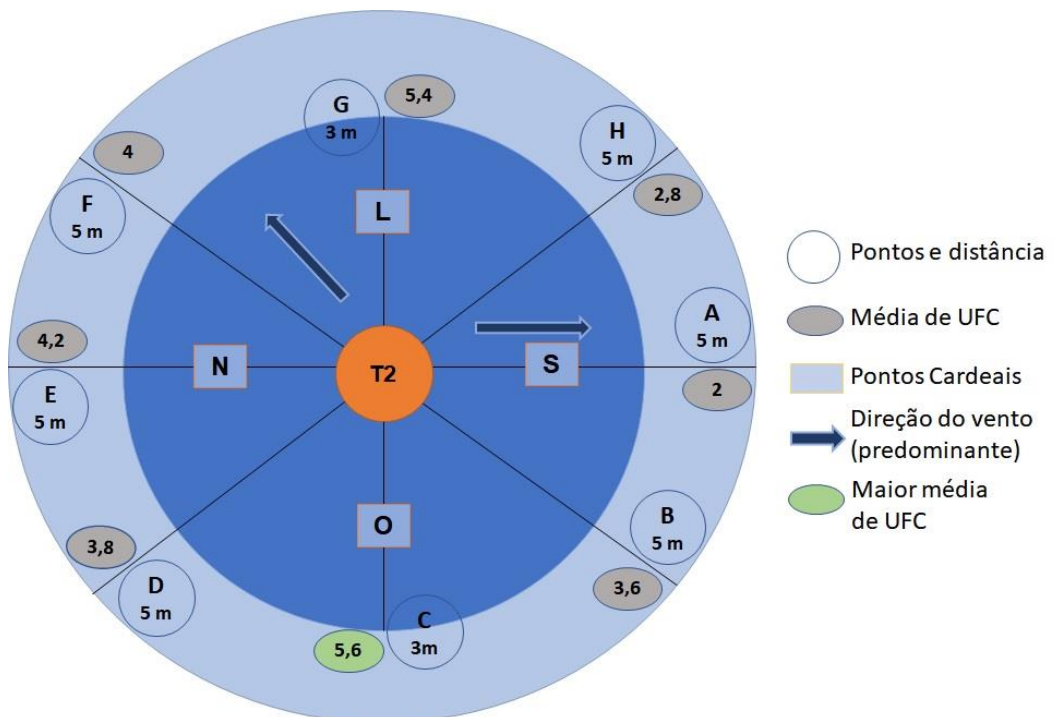
Nos três experimentos com os disseminadores realizados no cafezal de Campinas, após a retirada das placas de Petri da câmara climatizada tipo B.O.D., além das unidades formadoras de colônia de *Beauveria bassiana*, também foram observadas colônias de outros gêneros: *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Lecanicillium* e *Isaria*.

#### 5.3.1 Sachês por 24 horas, experimento I, cafezal Campinas, SP

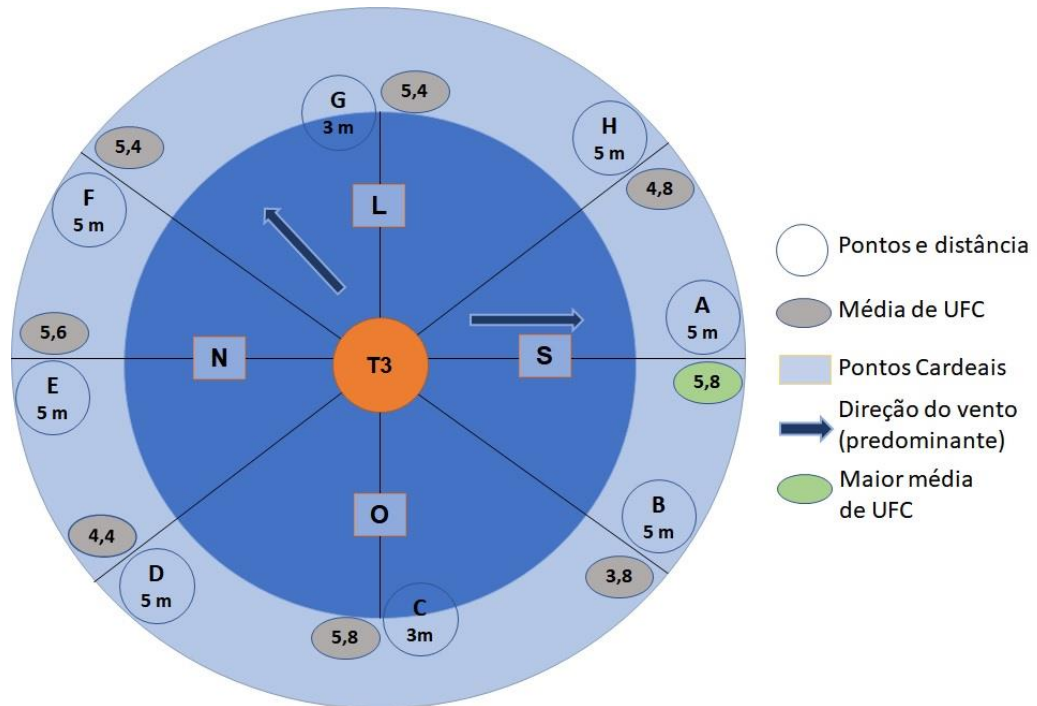
No primeiro experimento com os sachês disseminadores, foi possível observar que a média de UFC (unidade formadora de colônias) na testemunha foi menor que os demais, visto que ainda não havia sido realizado um teste anterior. Porém, de um modo geral, as médias registradas foram muito próximas, com um ligeiro aumento para o sachê feito com papel filtro furado e usando conídios puros de *B. bassiana* (Figuras 40 a 44). As direções Leste e Oeste representam a posição das linhas do cafezal.



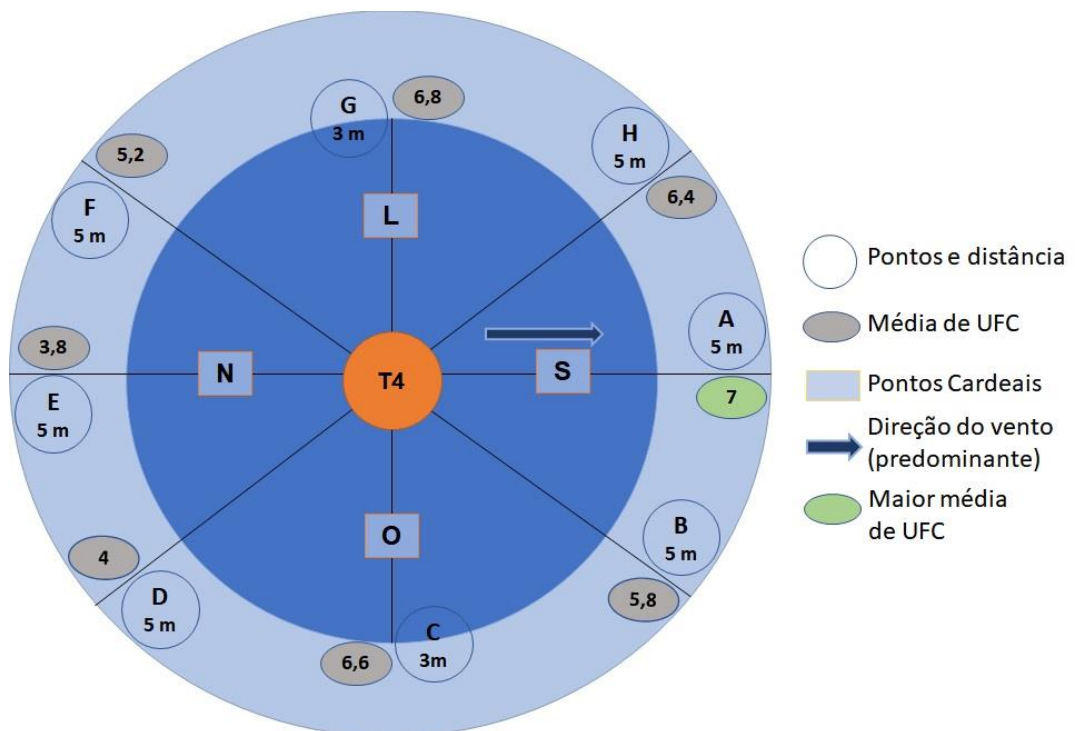
**Figura 40** - Média de UFC de IBCB66 capturadas em placas de Petri contendo BDA, no período de 25 a 26/04/2019, sem sachês. **Fonte:** RMCPereira, 2020.



**Figura 41** - Média de UFC de IBCB66 capturadas em placa de Petri no período de 26 a 27/04/2019. Experimento I, T2, sachês de gaze de algodão contendo 10g de arroz+fungo. **Fonte:** RMCPereira, 2020.

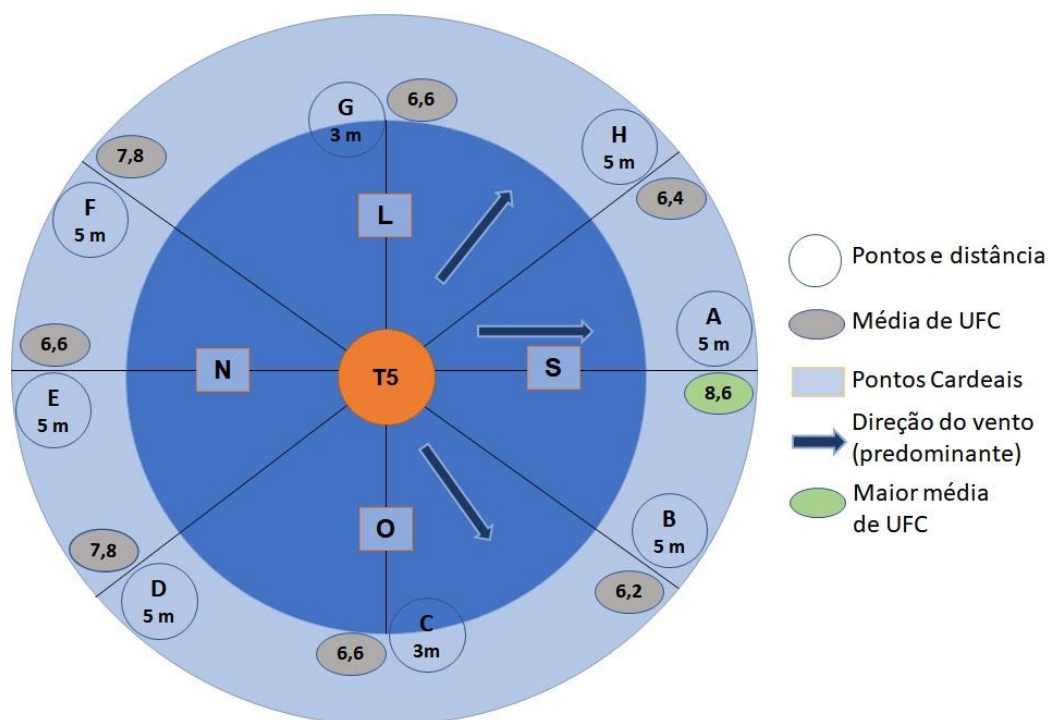


**Figura 42** – Média de UFC de IBCB66 capturadas em placa de Petri no período de 27 a 28/04/2019. Experimento I, T3, sachês de papel filtro contendo arroz+fungo. **Fonte:** RMCPereira, 2020.



**Figura 43** – Média de UFC de IBCB66 capturadas em placa de Petri no período de 28 a 29/04/2019. Experimento I, T4, sachês de papel sulfite contendo arroz+fungo. **Fonte:** RMCPereira, 2020.



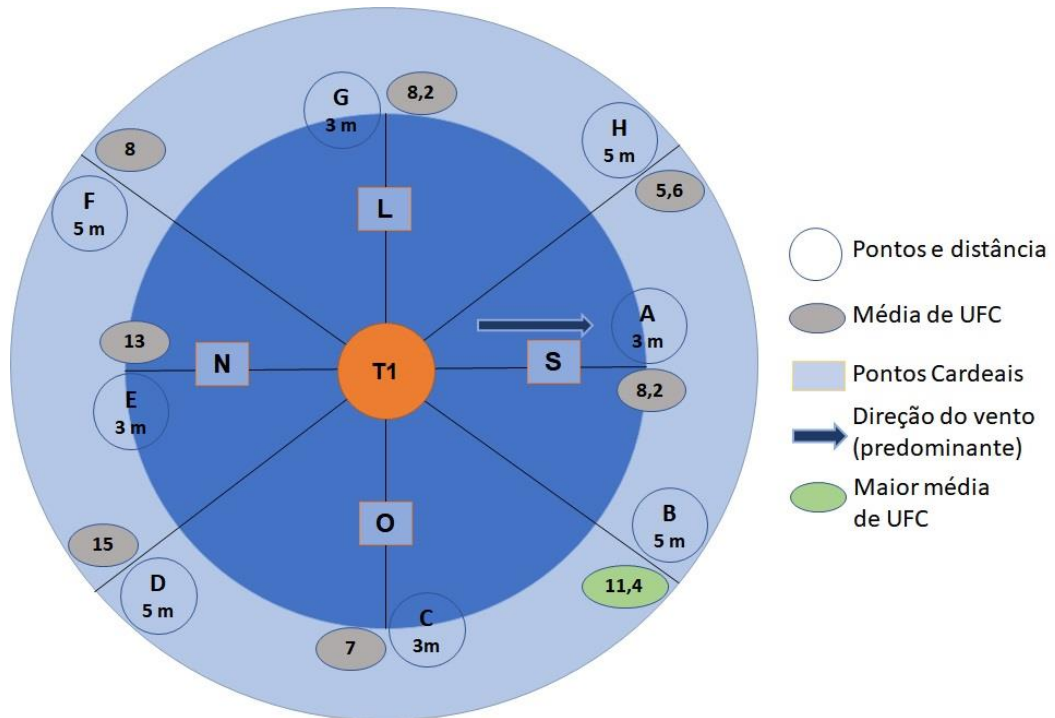


**Figura 44** – Média de UFC de IBCB66 capturadas em placa de Petri no período de 28 a 29/04/2019, Experimento I, T5, sachês de papel filtro furado contendo conídios aéreos puros. **Fonte:** RMC Pereira, 2020.

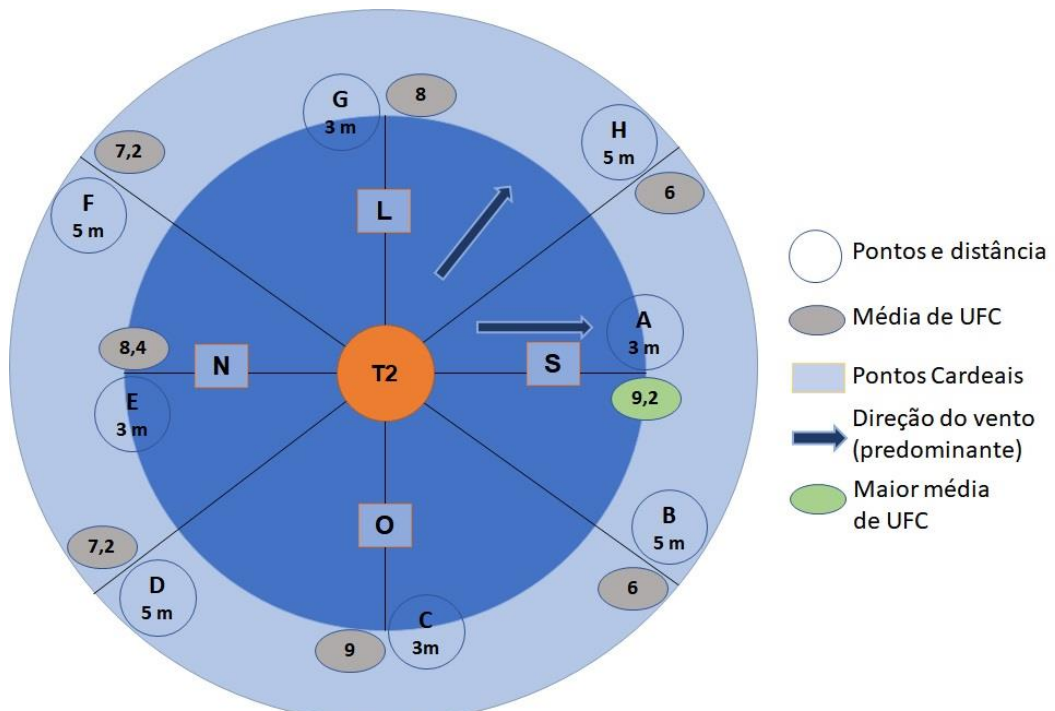
Para este experimento pode-se dizer que houve relação da disseminação do fungo com a direção predominante dos ventos na data do experimento, visto que a maioria das maiores médias foram registradas para o ponto A instalado na direção Sul (S).

### 5.3.2 Sachês por 24 horas, experimento II, cafezal Campinas, SP

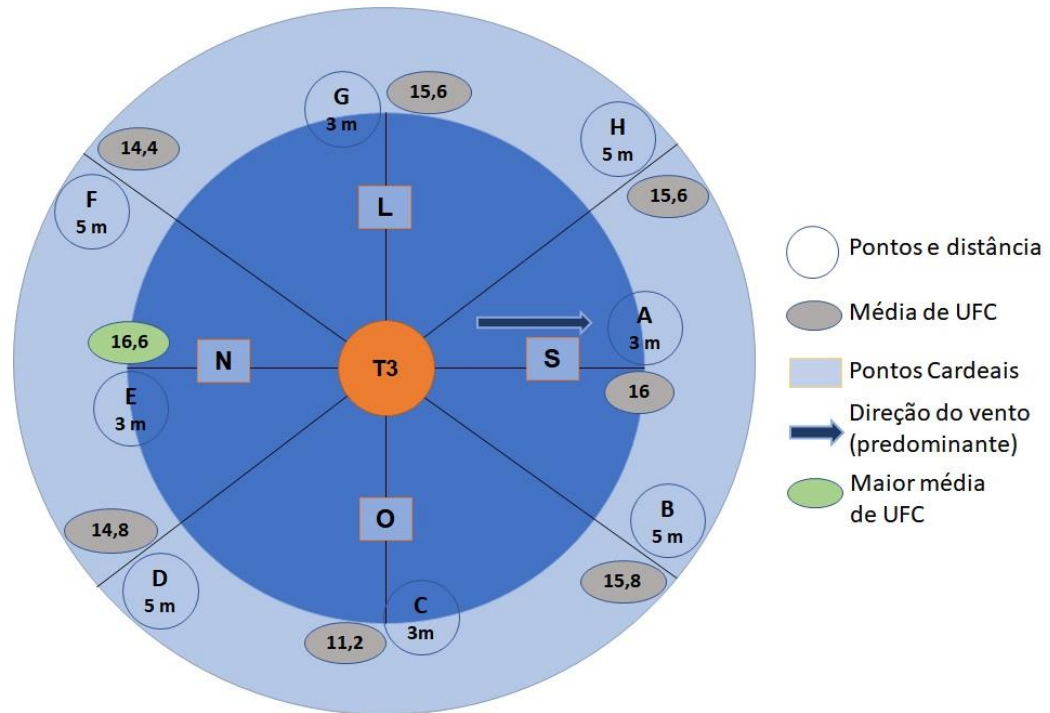
No experimento 2, houve ajuste dos pontos A e E para distâncias em 3 m mantendo-se o método anterior. Foi possível observar maior quantidade de UFC na Testemunha, visto que já havia sido realizado um experimento no mesmo local. Também, da mesma forma, observou-se a mesma tendência do experimento 1, com média de UFC de *B. bassiana* maior no tratamento com sachê de papel de filtro furado, inclusive superando o sachê de gaze de algodão (Figuras 45 a 49).



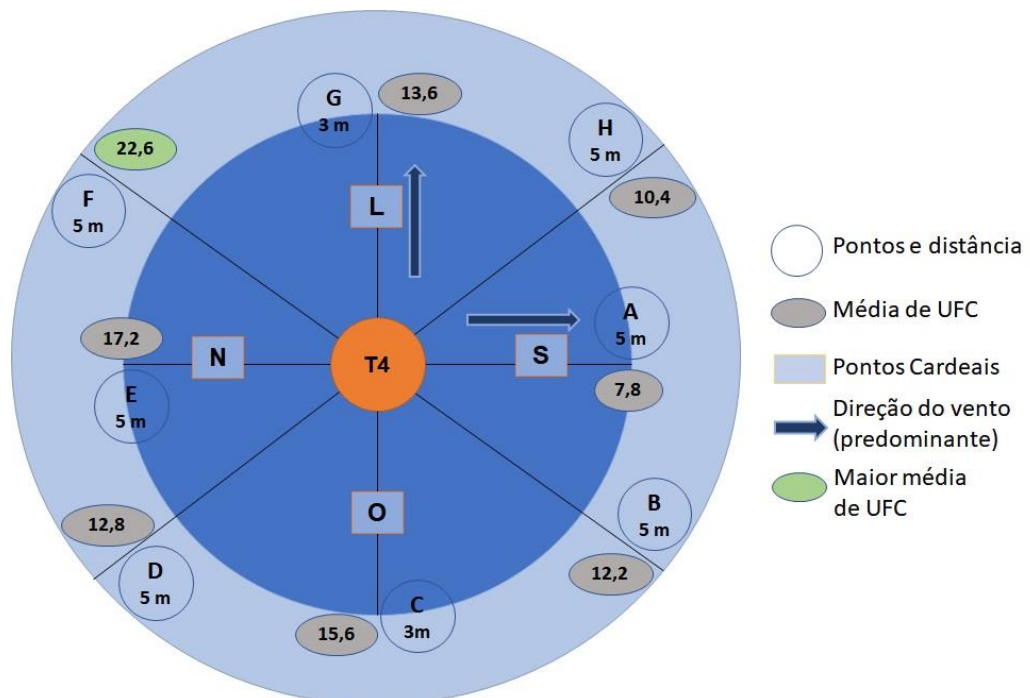
**Figura 45** - Média de UFC de IBCB66 capturadas em placas de Petri contendo BDA, no período de 15 a 16/05/2019. Experimento II, T1 sem sachês. **Fonte:** RMC Pereira, 2020.



**Figura 46** - Média de UFC de IBCB66 capturadas em placa de Petri no período de 16 a 17/05/2019. Experimento II, T2, sachês de gaze de algodão contendo 10g de arroz+fungo. **Fonte:** RMC Pereira, 2020.

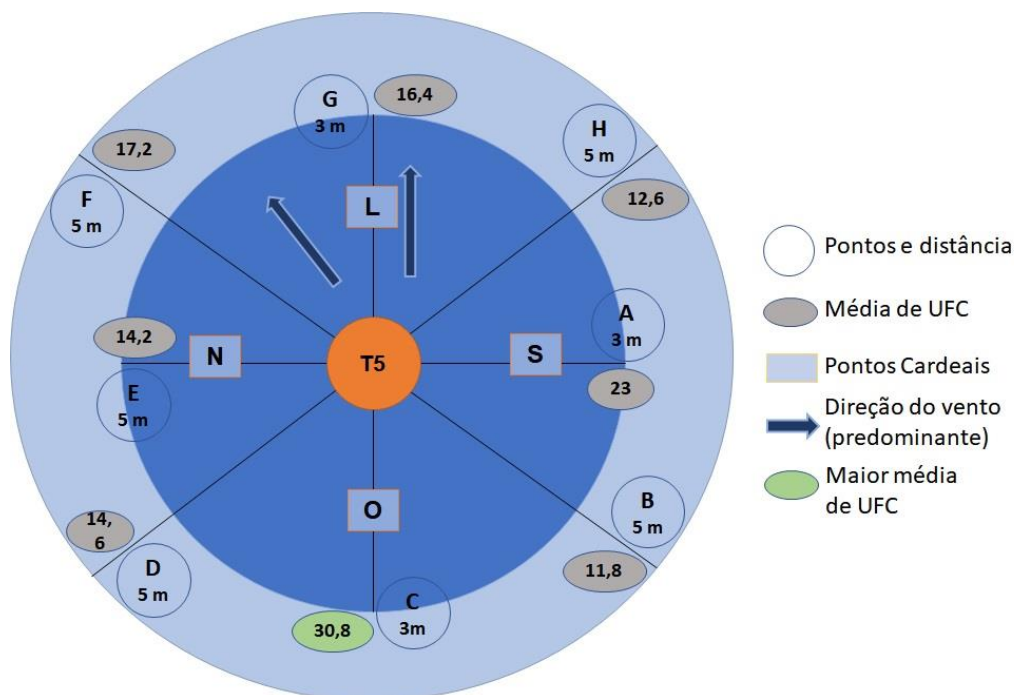


**Figura 47** – Média de UFC de IBCB66 capturadas em placa de Petri no período de 17 a 18/05/2019. Experimento II, T3, sachês de papel filtro contendo arroz+fungo. **Fonte:** RMC Pereira, 2020.



**Figura 48** – Média de UFC de IBCB66 capturadas em placa de Petri no período de 18 a 19/05/2019. Experimento II, T4, sachês de papel sulfite contendo arroz+fungo. **Fonte:** RMC Pereira, 2020.

A maior média de UFC registrada foi de 30,8 para T5 com sachê de papel filtro furado contendo 1 g de conídios pó na concentração de  $1 \times 10^{10}$  e instalado no ponto C (Figura 49). Entretanto, neste caso, não foi possível associar a direção do vento predominante visto que a direção do ponto é Oeste (O) e a direção predominante registrada para a data da pesquisa foi Leste/Nordeste (L/Ne)



**Figura 49** – Média de UFC de IBCB66 capturadas em placa de Petri no período de 19 a 20/05/2019, Experimento II, T5, sachês de papel filtro furado contendo conídios aéreos puros. **Fonte:** RMCPereira, 2020.

Para este experimento, pode-se dizer que apenas o ponto com maior média de UFC registrada não teve relação com a direção predominante do vento registrado na data da pesquisa. Além disso, observou-se que a alteração das distâncias dos pontos A e E não foi significativa uma vez que, o fungo alcançou tanto as distâncias em 5m quanto em 3 m. Ainda, em estudos de dispersão vertical e horizontal de conídios de *Stenocarpella maydes* e *S. macrospora*, Casa et al (2003) verificaram dispersão por até 20 m de distância do ponto com o inóculo.

Nos dois experimentos por 24 horas, na avaliação por meio do teste e Duncan a 5%, foi possível constatar que a maior média de UFC (unidade formadora de colônia) foi para o tratamento com o sachê de papel filtro furado apresentando média de 7,14 UFC, o que corrobora com os resultados obtidos nas médias simples por ponto para o referido tratamento no experimento I, com diferença significativa para os demais tratamentos e 17,19 UFC no

experimento II, sendo maior do que as demais e diferenciando-se estatisticamente de T1 e T2 . (Tabela 17).

**Tabela 17** - Número de Unidades Formadoras de Cólônias (UFC média) de *Beauveria bassiana* aplicados com sachês disseminadores em oito pontos de coleta 24 horas após a aplicação (Campinas-SP)

Tratamentos (n=5) <sup>1</sup>	Experimento 1	Experimento 2
(T1) Testemunha, sem sachê	0,37 ± 0,1 c	9,57 ± 2,7 b c
(T2) Sachê gaze com 10 g arroz+fungo	3,92 ± 0,9 b	7,62 ± 0,9 c
(T3) Sachê papel filtro 14 com 10 g arroz+fungo	5,10 ± 0,3 b	14,90 ± 1,9 a b
(T4) Sachê papel sulfite com 10 g arroz+fungo	5,31 ± 0,3 b	14,02 ± 2,5 a b c
(T5) Satche papel filtro furado com 1g conídios pó	7,14 ± 0,5 a	17,19 ± 2,3 a
CV (%)	11,4	9,0

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

### 5.3.3 Sachês por 15 dias, Cafezal Campinas, SP

Nos experimentos com sachês disseminadores por 15 dias, o tratamento sem sachês, testemunha, foi realizado na última aplicação e foi possível constatar médias baixas de UFC, sendo a menor média 0,00 para o sachê de papel filtro furado aos 7 dias e 0,00 média para a testemunha aos 14 dias. A maior média verificada nesse experimento foi para o tratamento de aplicação por meio dos sachês de gaze e algodão com registro de 21,3 UFC. Além disso, o sachê de gaze apresentou as maiores médias aos 7 e 14 dias com diferenças estatísticas entre eles. Nos demais tratamentos, apenas para T2, sachê com papel filtro, não houve diferença significativa para as médias obtidas durante o experimento (Tabela 18).

**Tabela 18** - Número de Unidades Formadoras de Cólônias (UFC média) de *Beauveria bassiana* aplicados com sachês disseminadores, em cinco repetições com oito pontos cada, avaliados a cada 3, 7, 10 e 14 dias. UFC capturadas em Placas de Petri por 24 horas em campo na data (Campinas-SP).

Tratamentos (n=5) <sup>1</sup>	3 dias	7 dias	10 dias	14 dias
(T1) Sachê gaze	21,3 ± 5,7 a A	6,7 ± 0,7 a B	0,9 ± 0,5 d C	10,7 ± 0,7 a B
(T2) Papel filtro	2,0 ± 0,5 b A	3,3 ± 0,8 b A	2,3 ± 0,3 c A	4,0 ± 0,8 b A
(T3) Papel Sulfite	2,3 ± 0,6 b B	2,8 ± 0,9 b B	7,7 ± 0,7 a A	5,3 ± 0,7 b A
(T4) Papel filtro furado	5,8 ± 1,1 b A	0,0 ± 0,0 c B	5,1 ± 0,5 b A	5,5 ± 1,3 b A
(T5) Testemunha	1,7 ± 0,9 b A	0,4 ± 0,2 c B	0,1 ± 0,1 d B	0,0 ± 0,0 c B
CV (%)	59	50	47,6	43

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% . Dados originais, transformados por Raiz quadrada  $x = 0,5$  na análise.

Os testes de viabilidade realizados com o restante dos fungos contidos nos sachês de cada tratamento e após a retirada dos disseminadores de campo, apresentaram médias

entre 14,3% e 91,1%, com o maior valor para os sachês confeccionados com papel filtro (Tabela 19).

**Tabela 19** - Porcentagem média da viabilidade de conídios aéreos/mL<sup>-1</sup> de *Beauveria bassiana*, após a retirada de campo. Cafezal Campinas, SP

Material	Teste após 15 dias
*Sachê gaze	14,3
*Sachê papel filtro	91,1
*Sachê papel sulfite	62,2
**Sachê papel filtro furado	64,8

\* arroz+fungo; \*\*conídios aéreos em pó

Assim, para este experimento, as diferenças registradas tanto na eficiência da dispersão dos conídios quanto na durabilidade dos materiais e substratos utilizados em relação aos experimentos com sachês por 24 horas, sugerem a necessidade de repetição do mesmo.

Ademais, houve interferência de formigas, que consumiram parte do meio de cultura exposto em campo o que pode também ter ocasionado diferença no registro das unidades formadoras de colônias de *B. Bassiana*. Ainda, a interferência da umidade e chuvas, podem também estarem relacionadas com a diminuição da dispersão dos conídios, pois o substrato úmido tem menor propensão à propagação pelo vento

Também, foi possível observar que a durabilidade dos materiais utilizados na confecção dos disseminadores não sofreram grandes alterações mantendo sua função em campo. Isso permitiu a avaliação geral dos resultados e a escolha do material e substrato para realização de novo experimento no cafezal de São Paulo.

#### 5.3.4 Sachês por 30 dias, Cafezal São Paulo, SP

Para o experimento com sachê por 30 dias, a avaliação foi de diminuição da porcentagem dos frutos brocados e no número de brocas mortas e infectadas pelo entomopatógenos IBCB66. Foi registrado menor índice após a segunda aplicação e coleta em T3 com 32,9% de frutos brocados. Este resultado não condiz com a maior média de brocas mortas e infectadas registradas em 0,6 em T2 após a segunda e última coleta após a terceira aplicação. Entretanto, este índice de besouros infectados, apesar de baixo em relação a porcentagem de frutos brocados, está coerente com a data da observação que foi após a finalização do experimento, ocasião em que se esperava ser maior o registro de insetos infectados.

Das três aplicações de conídios aéreos de IBCB66 no cafezal de São Paulo, foi possível verificar a menor porcentagem de frutos brocados na coleta 2, após a segunda aplicação, 32,6% dos frutos brocados para o tratamento em 0,50 m de altura com um sachê disseminador por ponto.

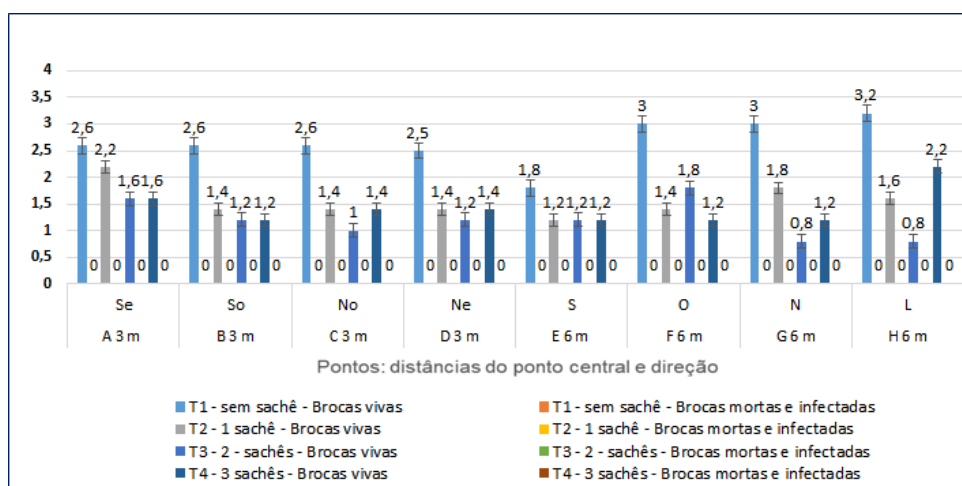
Para a aplicação um e coleta um, estatisticamente foi registrada diferença significativa apenas em T1 em relação aos demais tratamentos. Na segunda aplicação e primeira coleta, houve diferença significativa apenas entre T1 e T4 permanecendo os demais tratamentos e segunda coleta sem diferenças. Na terceira aplicação foi registrada maior porcentagem de frutos brocados em T1 na primeira coleta. Já na segunda coleta houve diferença entre T1 e T3 (Tabela 20).

**Tabela 20** - Frutos atacados (%) por broca-do-café, *Hypothenemus hampei*, trata dos conídios de *Beauveria bassiana* aplicados por meio de sachê disseminadores (São Paulo-SP).

Tratamento	Aplicação 1 - Nov. 2019		Aplicação 2 - Dez. 2019		Aplicação 3 - Jan. 2020	
	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 1	Coleta 2
(T1) Testemunha	59,0 ± 12,9 b	39,2 ± 10,3 a	38,1 ± 2,0 b	43,5 ± 3,7 a	41,5 ± 1,6 c	38,7 ± 2 b
(T2) 1 sachê	46,8 ± 12,5 a	40,2 ± 8,6 a	35,6 ± 2,1 a b	32,6 ± 2,1 a	37,7 ± 0,5 a b	38,0 ± 1,1 a
(T3) 2 sachês	35,9 ± 3,2 a	46,8 ± 6,0 a	35,6 ± 4,5 a b	36,2 ± 2,8 a	36,2 ± 1,2 a	40,0 ± 1,0 a b
(T4) 3 sachês	39,1 ± 7,1 a	47,5 ± 3,9 a	32,9 ± 2,3 a	34,0 ± 2,9 a	38,7 ± 1,6 b	35,5 ± 2,0 a
CV (%)	4,6	4,2	1,8	1,9	0,8	1,1

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

Após as análises em laboratório, o número de brocas infectadas por conídios aéreos de IBCB66 registrados após as três aplicações foi baixo. Apesar disso, foi possível observar aumento nos registros de brocas infectadas, com a maior média registrada de 0,6 em T3 após a terceira aplicação e última coleta (Figuras 50 a 55).



**Figura 50** – Aplicação 1, coleta 1, novembro 2019. Média de brocas-do-café vivas e mortas infectadas por *B. bassiana* por ponto e por tratamento.

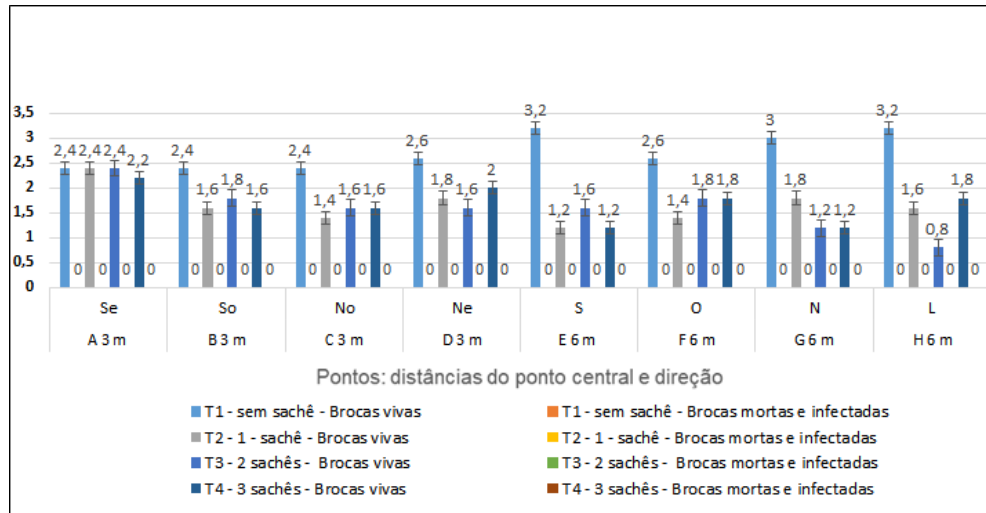


Figura 51 – Aplicação 1, coleta 2, dezembro 2019. Média de brocas-do-café vivas e mortas infectadas por *B. bassiana* por ponto e por tratamento.

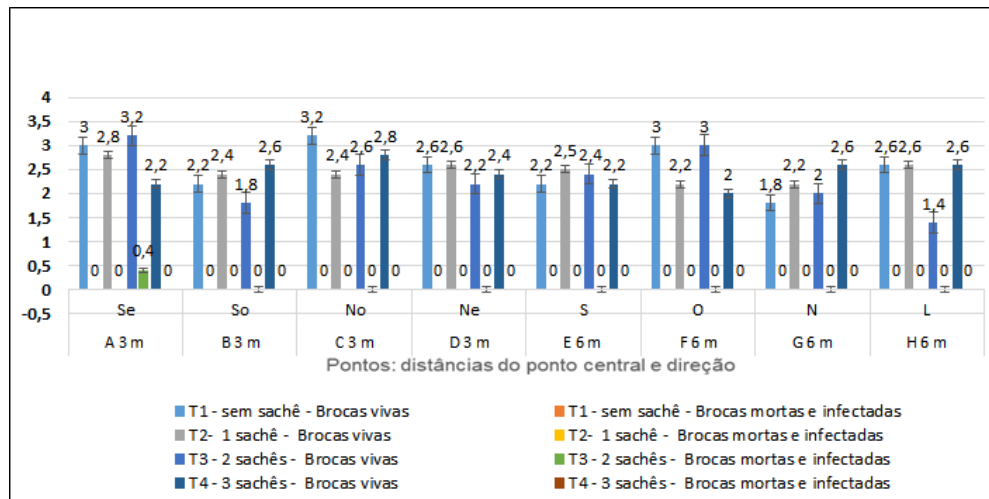


Figura 52 – Aplicação 2, coleta 1, dezembro 2019. Média de brocas-do-café vivas e mortas infectadas por *B. bassiana* por ponto e por tratamento.

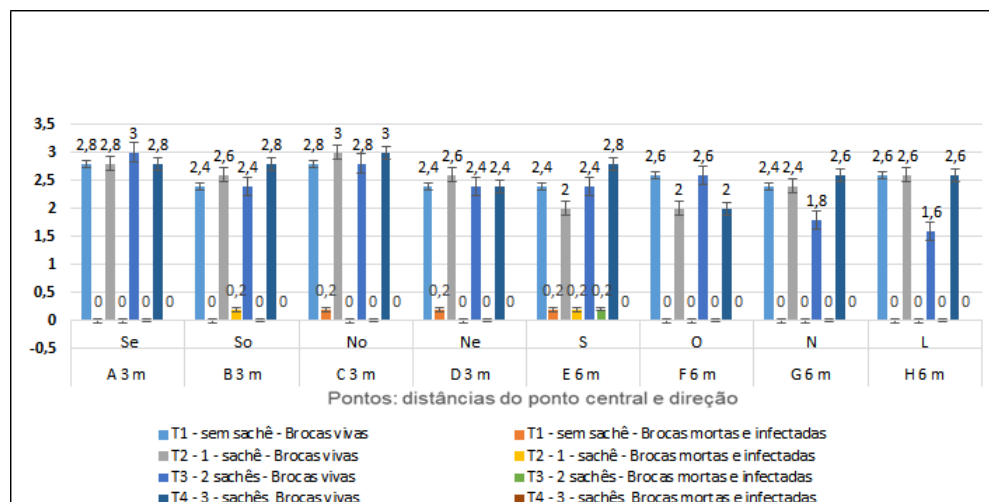
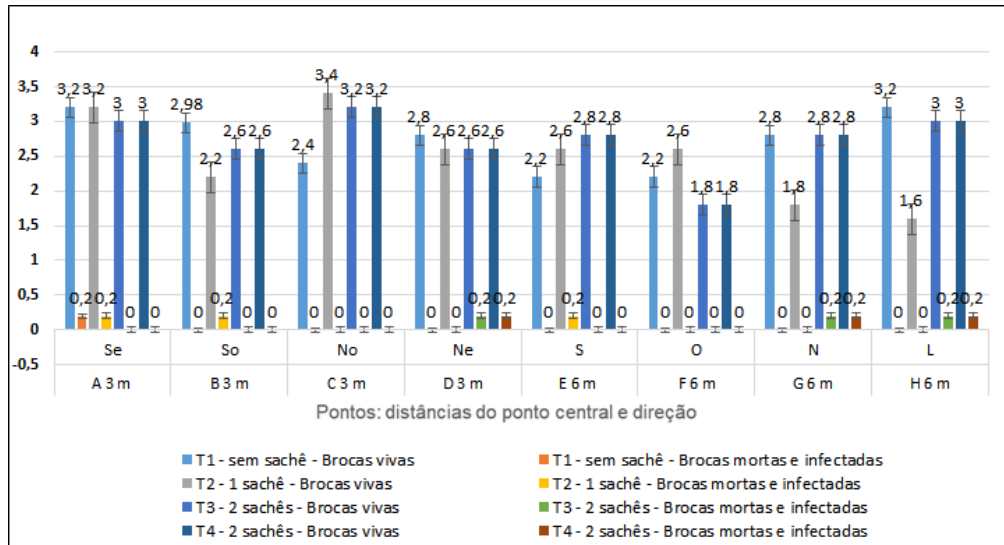
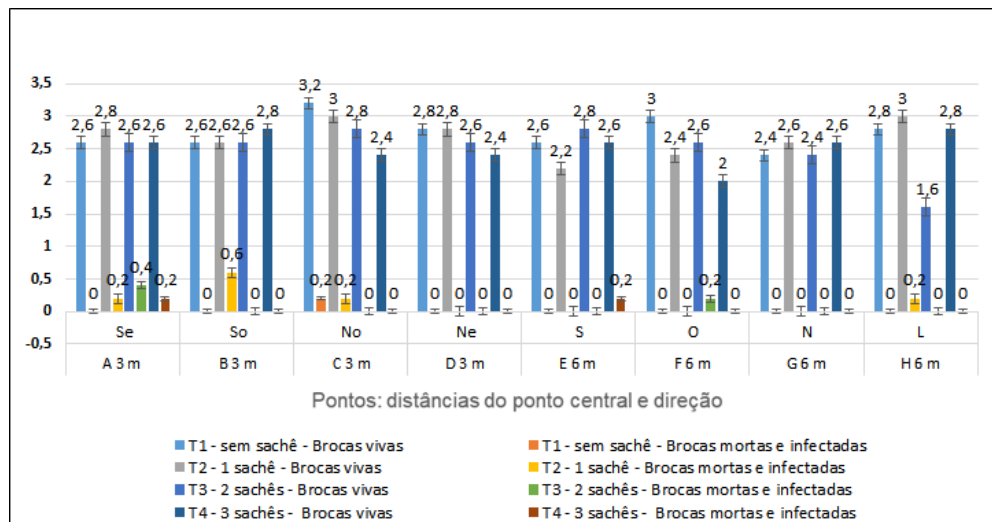


Figura 53 – Aplicação 2, coleta 2, janeiro 2020. Média de brocas-do-café vivas e mortas infectadas por *B. bassiana* por ponto e por tratamento.





**Figura 54** – Aplicação 3, coleta 1, janeiro 2020. Média de brocas-do-café vivas e mortas infectadas por *B. bassiana* por ponto e por tratamento.



**Figura 55** – Aplicação 3, coleta 2, fevereiro 2020. Média de brocas-do-café vivas e mortas infectadas por *B. bassiana* por ponto e por tratamento.

Em relação a durabilidade dos materiais em campo, tanto os utilizados para a confecção dos sachês apresentaram pouca variação na degradação após 30 dias em campo. Apesar da diminuição do volume de conídios/g, os sachês não apresentaram muita alteração na decomposição geral do material utilizado em sua confecção (Figura 56).



**Figura 56** – A: sachês de papel filtro furado com pouca alteração no material de confecção e com o restante dos conídios aéreos em pó após 30 dias em campo; B: pesagem do conteúdo restante de conídios aéreos do sachê do tratamento 2 ponto 1. **Fonte:** RMCPereira, 2020.

Além disso, a porcentagem de conídios viáveis após 30 dias de exposição em campo foi boa, com registro da maior média de 91,3% em T2 após a aplicação três e na altura de 0,50 m e as demais com registros acima de 89% de conídios viáveis (Tabela 21).

**Tabela 21** - Porcentagem média da viabilidade de conídios aéreos de *Beauveria bassiana* restantes nos sachês de papel filtro furado após a retirada de campo. Cafezal São Paulo, SP

Tratamentos (n=5) <sup>1</sup>	Altura (m)	Teste após 30 dias		
		Apl. 1	Apl. 2	Apl. 3
(T1) Testemunha	0	0	0	0
(T2) 1 sachê	0,50	90,4 ± 3,2	88,2 ± 3,8	91,3 ± 2,6
(T3) 2 sachês	0,50	71 ± 2,3	89,6 ± 1,8	88 ± 2,8
	1	89,4 ± 3,4	90 ± 2,6	88,5 ± 2,1
(T4) 3 sachês	0,50	89,4 ± 3,4	82,1 ± 2,3	89,1 ± 2,4
	1	90,1 ± 2,5	83,1 ± 3,2	90 ± 3,1
	1,50	90,2 ± 2,7	88,3 ± 3,1	89,4 ± 2,8

Ainda, as diferenças entre as quantidades iniciais de cada sachê foram diferentes das quantidades finais, o que confirma a dispersão dos conídios. Foi possível observar diminuição do peso final dos sachês em relação ao peso inicial após todas as aplicações realizadas, mesmo considerando as diferenças iniciais de cada aplicação. A maior média restante foi observada em T4 com 0,53 g e altura em 0,50m e a menor em T2 com 0,26 g e altura em 1,50 m (Tabela 22).

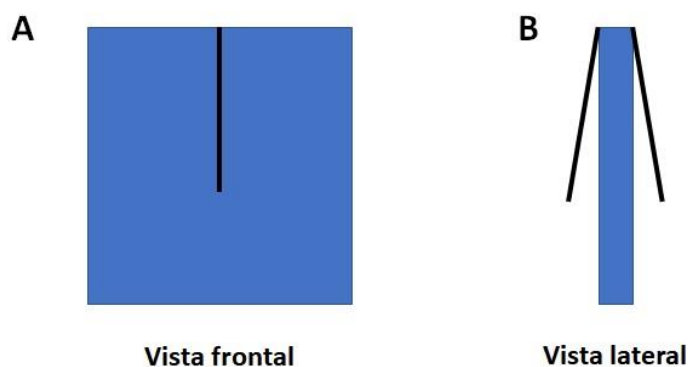
**Tabela 22** – Média (g) de peso final dos sachês de papel filtro furado após a retirada de campo. Cafezal São Paulo, SP

Tratamentos (n=4) <sup>1</sup>	Altura (m)	Peso inicial (g)	Peso (g) após 30 dias		
			Apl. 1	Apl. 2	Apl. 3
(T1) Testemunha	0	0	0	0	0
(T2) 1 sachê	0,50	1	0,43 ± 1,2	0,27 ± 1,8	0,39 ± 1,6
(T3) 2 sachês	0,50	0,93	0,45 ± 1,8	0,44 ± 1,9	0,29 ± 2,1
	1	0,93	0,48 ± 1,6	0,46 ± 1,7	0,31 ± 2,5
(T4) 3 sachês	0,50	0,60	0,53 ± 1,3	0,32 ± 2,7	0,32 ± 2,7
	1	0,60	0,49 ± 1,7	0,37 ± 1,9	0,32 ± 2,7
	1,50	0,60	0,52 ± 0,8	0,37 ± 1,9	0,26 ± 1,4

Em relação a boa viabilidade dos conídios após os 30 dias de exposição, pode estar relacionada ao índices de albedo do papel filtro furado, bem como estar relacionado a constatação de temperaturas mais amenas para o período de primavera/verão e maior índice de chuvas no período da pesquisa.

Também, foram encontradas brocas infectadas na área da testemunha. Isso corrobora com os resultados apontados nos estudos de Neves et al. (2008) que afirmam que o fungo pode matar a broca em um período de 4 a 5 dias, o que poderia justificar a infecção fora da área de estudos e com as observações feitas na área do experimento III (área de Catuaí) do presente trabalho.

Durante as instalações dos experimentos bem como nas ocasiões de retirada dos materiais de campo, foi observado que os dispositivos disseminadores ‘sachês’, ao serem tocados disseminavam os conídios com mais facilidade. Dessa forma, cabe sugestão de nova pesquisa que inclua nos atuais disseminadores testados, dispositivos auxiliares para potencializar a disseminação dos fungos (Figura 57).



**Figura: 57** – Sachê com dispositivo auxiliar para potencialização da disseminação de conídios aéreos em pó.  
Fonte: RMCPereira, 2019.

## 5.4 Estudos econômicos

Os danos causados pela broca-do-café, em âmbito mundial, foi estimado em 500 milhões de dólares (NEVES;HIROSE, 2005).

No Brasil, desde que o organoclorado endosulfan teve seu uso proibido na agricultura pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2013, os custos com o controle de *H. hampei* em cafezais de diversas regiões do país teve registro de aumento.

De acordo com dados da Confederação Nacional da Agricultura e Pecuária (CNA), por meio do Projeto Futuro realizado na região de Monte Carmelo, no Estado de Minas Gerais, em 2018, os custos com o controle da broca-do-café tiveram aumentos expressivos. Segundo a pesquisa, em 2013, esses custos eram de cerca de R\$ 87,50 por hectare, saltando para R\$ 648,00 por hectare em 2018. Para o ano de 2019, os custos foram ainda maiores e chegaram a ultrapassar R\$ 2.000,00 por hectare (<sup>1</sup>Informação pessoal). Esses valores são referentes ao uso geral de produtos no controle de infestações por *H. hampei*, incluindo aplicação de químicos, semioquímicos e biológicos.

Em relação aos produtos químicos, a identificação e registro de uma nova molécula para defensivos agrícolas com modo de ação diferente dos já existentes são baixas. Além disso, os altos custos com a identificação de uma nova molécula e o extenso período até a colocação de um novo produto no mercado (MCDUGALL, 2016; IRAC, 2017) favorecem a adoção do controle biológico.

A alternativa do uso de produtos que tenham fungos entomopatogênicos como princípio ativo é viável, pois além de menor custo, promove aumentos significativos na produtividade (mantém equilíbrio ecológico da lavoura) e consequentemente nos lucros. O Brasil tem conseguido competitividade positiva no segmento do controle biológico em âmbito mundial. O país tem boas chances para aumentar sua produção de bioativos em compatibilidade com produtos químicos convencionais (MASCARIN; PAULI, 2010; ABCBIO, 2019; BRASIL,2019).

Cerca de 90% das empresas brasileiras e 75 biofábricas que produzem produtos de controle biológico, utilizam a cepa IBCB66 como microorganismos ativos (DOMICIANO, 2019). Na produção de conídios aéreos de *Beauveria bassiana* IBCB66 em arroz+fungo os custos gerais, já incluindo uso de equipamentos e mão de obra, são da ordem de R\$ 10,00 kg e para os conídios puros os custos podem chegar a R\$ 180,00 kg podendo variar em função da

---

<sup>1</sup> Informação pessoal pelo pesquisador Dr. Alexandre de Sene Pinto, durante a avaliação da banca de qualificação, outubro, 2019.

quantidade produzida e concentração final, o que também promove a variação nos custos de aplicação por hectare (<sup>2</sup>Informação pessoal).

Os custos gerais para a tecnologia de aplicação por meio de disseminadores utilizada nesta pesquisa, incluindo a produção dos conídios e confecção dos sachês feitos de papel filtro furado contendo 1g de conídios em pó puro, na concentração  $1 \times 10^{10}$ , foi estimado em R\$ 0,27 e, na concentração  $5,98 \times 10^9$  ficou em R\$ 0,26. Os demais materiais utilizados para a confecção dos sachês também apresentaram baixos valores de custo (Tabela 23). Os custos para aplicação por hectare teve variação entre R\$ 15,36 e R\$ 34,56 (Tabela 24).

**Tabela 23** – Custos individuais estimados para os materiais de confecção dos sachês disseminadores e do substrato arroz+fungo e conídio pó puro de *B. bassiana*

Material	Valor unitário	Valor 1 g	Valor 10 g
Gaze de algodão 13 fios, 7,5 x 7,5 cm	R\$ 0,01	-	-
Papel sulfite 75 g	R\$ 0,04	-	-
Papel filtro 12 cm $\varnothing$	R\$ 0,08	-	-
Papel filtro furado 12 cm $\varnothing$	R\$ 0,15	-	-
Barbante de algodão cru	R\$ 0,07	-	-
Grampo galvanizado	R\$ 0,001	-	-
Conídio pó puro $1 \times 10^{10}$	-	R\$ 0,18	-
Conídio pó puro $5,98 \times 10^9$	-	R\$ 0,19	-
Arroz+fungo $2 \times 10^9$	-	-	R\$ 0,04
Arroz+fungo $5 \times 10^9$	-	-	R\$ 0,01

**Tabela 24** – Custos gerais para a confecção de sachês disseminadores de conídios aéreos de IBCB66 com diferentes materiais contendo arroz+fungo ou 1g de conídio puro e custo por hectare considerando um alcance de disseminação de conídios em um raio de 5 m

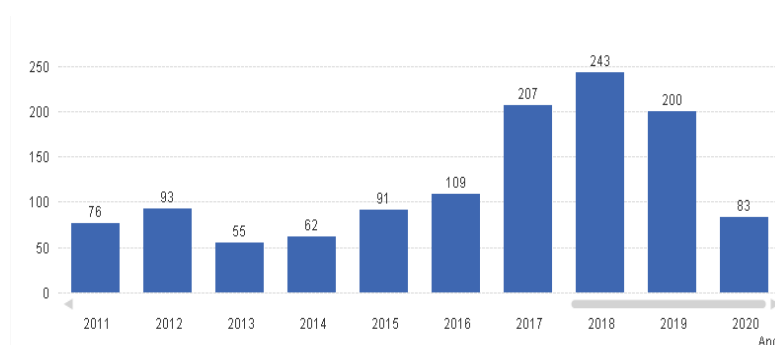
Material	Conídios g	Custo por sachê	Custo por hectare
Gaze de algodão 13 fios, 7,5 x 7,5 cm com 10 g de arroz+fungo	* $2 \times 10^9$	R\$ 0,14	R\$ 17,92
Papel filtro 12 cm $\varnothing$ com 10 g de arroz+fungo	* $2 \times 10^9$	R\$ 0,23	R\$ 29,44
Papel sulfite 75 g com 10 g de arroz+fungo	* $2 \times 10^9$	R\$ 0,12	R\$ 15,36
Papel filtro furado 12 cm $\varnothing$ com 1 g conídios pó puro	* $1 \times 10^{10}$	R\$ 0,27	R\$ 34,56
Papel filtro furado 12 cm $\varnothing$ com 1 g conídios pó puro	** $5,98 \times 10^9$	R\$ 0,26	R\$ 33,28

\*concentrações usada nos experimentos realizados no cafezal de Campinas, SP; \*\* Concentração utilizada no experimento realizados no cafezal de São Paulo, SP.

<sup>2</sup> Informação pessoal fornecida pelo pesquisador Dr. José Eduardo Marcondes de Almeida, durante aula de controle biológico ministrada na Unidade Laboratorial de Referência em Controle Biológico – Campinas – SP, janeiro, 2019.

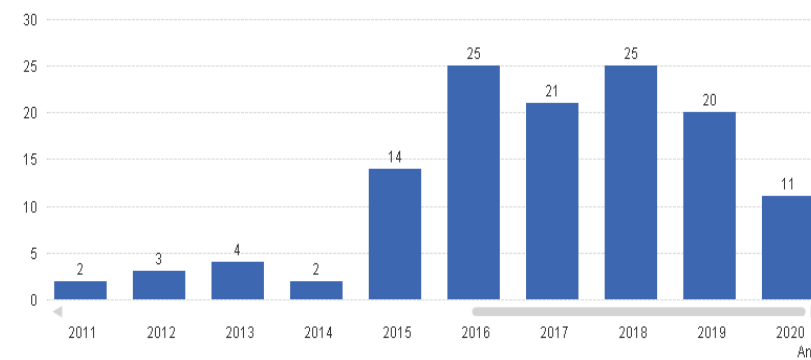
A alternativa do uso de produtos que tenham fungos entomopatogênicos como princípio ativo é viável pois além de menor custo, promove aumentos significativos na produtividade (mantém equilíbrio ecológico da lavoura) e conseqüentemente nos lucros. O Brasil tem conseguido competitividade positiva no segmento do controle biológico em âmbito mundial. O país tem boas chances para aumentar sua produção de bioativos em compatibilidade com produtos químicos convencionais (MASCARIN; PAULI, 2010; ABCBIO, 2019; BRASIL,2019).

O mercado agrícola nacional tem poucos produtos registrados à base de fungo entomopatogênico e, ainda que o mercado de produtos para controle biológico de pragas esteja em crescimento essa quantidade de produtos ainda está muito aquém da demanda de mercado. De acordo com dados do Ministério da Agricultura e Agropecuária (MAPA, 2019), 2018 foi o ano de maior índice de registros de inseticidas para diferentes culturas (Figura 58).



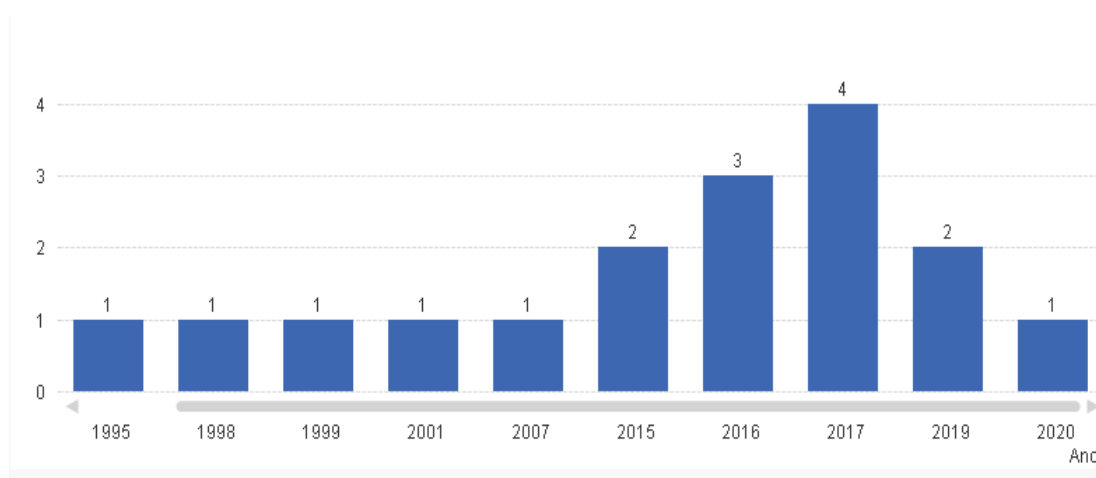
**Figura 58** – Registros por ano, dos inseticidas para diferentes culturas. **Fonte:** imagem adaptada de Sistema Agrotóxico e Fitossanitário – MAPA, 2019.

Já para os registros relacionados aos inseticidas microbiológicos, em 2011 foram 2 registros, e em 2018 foram 25 (Figura 59). Pode parecer pouco, mas estes dados representam um crescimento de 1.250%.



**Figura 59** – Registros por ano, dos inseticidas para diferentes culturas. **Fonte:** imagem adaptada de Sistema Agrotóxico e Fitossanitário – MAPA, 2019.

Mais especificamente, os índices de registros de inseticidas microbiológicos para a cultura cafeeira são tímidos tendo destaque para o ano de 2017 (Figura 60).



**Figura 60** – Registros por ano, dos inseticidas microbiológicos para a cultura cafeeira. **Fonte:** imagem adaptada de Sistema Agrotóxico e Fitossanitário – MAPA, 2019.

Para produtos que tenham fungo entomopatogênico como princípio ativo, faz-se necessário maiores estudos e pesquisas com vistas a se resolver questões que estão relacionadas melhorias nos métodos de aplicação visando maior viabilidade do fungo em campo, principalmente entre as plantas de cafés pois locais onde há maior adensamento e sombreamento pois são mais propícios ao desenvolvimento da broca-do-café (SILVA; NEVES, 2016).

Conforme dados do IRAC (2017), tanto os altos custos quanto a demora na identificação de nova molécula para que um produto chegue ao mercado, corroboram com o resultado da pesquisa feita durante este trabalho e que, apesar de pequena, obteve índice de 100% de aceitação para produto biológico de boa eficiência, com características de seus componentes vinculados a uma produção sustentável e menos impactante ao meio ambiente para controle da broca-do-café.

Considerando os custos com os sachês disseminadores desta pesquisa, o valor estimado de R\$ 34,56/ha para aplicação de conídios puros do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* IBCB66 no controle de *Hypothenemus hampei* pode ser considerado, inicialmente, promissor para o mercado. Essa condição também pode ser favorecida pelo fato de não ser necessário o registro do agente microbiológico ativo, ou seja, os gastos para colocação no mercado seriam com as pesquisas e processos para a obtenção da proteção intelectual e patente.

Além disso, o Brasil é líder mundial em tecnologias de controle biológico (EMBRAPA, 2019), o que pode indicar maior facilidade na busca de parcerias para continuidade de desenvolvimento deste trabalho sendo possível até a formação de Startup.



## 7. CONCLUSÕES

Nos experimentos em laboratório, o método de aplicação de conídios aéreos de *Beauveria bassiana* em pó seco por caminhamento é o mais eficiente na mortalidade de adultos de *H. hampei*.

A aplicação de *B. bassiana* por polvilhamento de conídios em pó no solo e na planta tem potencial de controle da broca do café, assim como a pulverização com calda à base de blastosporos.

A metodologia de aplicação de conídios aéreos em pó por meio de disseminadores sachês de papel filtro furado mostra-se mais eficiente na dispersão do fungo no cafezal de Campinas, SP.

A metodologia de aplicação de fungos aéreos de *B. Bassiana* em pó por meio de disseminadores sachês de papel filtro furado permite viabilidade acima de 89% dos conídios aéreos, mesmo após 30 dias consecutivos em campo.

Todos os métodos de aplicação utilizados neste trabalho apresentaram eficiência no controle da broca-do-café e a tecnologia de aplicação por meio de sachês disseminadores é promissora apesar da necessidade de continuidade da pesquisa.

## 8. REFERÊNCIAS

- ABC BIO, Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico. **A biodefesa na agricultura brasileira.** Disponível em: < <http://www.abcbio.org.br/abcbioa-biodefesa-na-agricultura-brasileira/>>. Acesso em: 18 de jul. 2019.
- ABC BIO, Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico. **Startup de fungos e bactérias recebe R\$6 milhões.** Disponível em: < <http://www.abcbio.org.br/conteudo/noticias/startup-de-fungos-e-bacterias-recebe-r6-milhoes/>>. Acesso em: 18 de jun. 2018.
- ABIC, Associação Brasileira da Indústria de Café. **CNA alerta produtores de café sobre monitoramento de lavoura contra a broca.** Disponível em: <<http://abic.com.br/cna-alerta-produtores-de-cafe-sobre-monitoramento-de-lavouras-contra-broca/>>. Acesso em: 13 jun. 2018.
- ABIC, Associação Brasileira da Indústria de Café. **História do café.** Disponível em: <<http://abic.com.br/cafe-com/historia/>>. Acesso em: 12 mar. 2019.
- ACUÑA, R.; et al. **Adaptative horizontal transfer of a bacterial gene to an invasive insect pest of coffee.** PNAS Early edition. 2012, p 1-6. Disponível em:<<https://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1121190109>>. Acesso em: 20 fev. 2019.
- AGÊNCIA FAPESP. **Brasil terá que desenvolver modelo próprio de controle biológico, 2016.** Disponível em: < <http://agencia.fapesp.br/brasil-tera-que-desenvolver-modelo-proprio-de-controle-biologico/22753/> >. Visualizado em: 22 jun. 2018.
- AGROANALYSIS, **Incentivos aos produtos biológicos.** Conteúdo especial ABC BIO, 30-31 p. São Paulo, 2016. Disponível em:<<http://www.agroanalysis.com.br/storage/2016/9/index.html#page=28>>. Acesso em: 10 dez. 2019.
- AGROFIT, Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. **Consulta de pragas, doenças e produtos indicados.** Ministério da Agricultura, pecuária e abastecimento. Disponível em: < [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 18 jul. 2019.
- ALMEIDA, J. E. M.; BATISTA FILHO, A. **Controle Biológico da Cigarrinha-da-Raiz da Cana-de-Açúcar com o Fungo *Metarhizium anisopliae*.** Boletim Técnico do Instituto Biológico, n.16, São Paulo: Instituto Biológico, 2006, 19 p.
- ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. *In. Controle Microbiano de Insetos*, Alves, S.B. (ed). FEALQ, Piracicaba, SP, p. 289-381. 1998.
- ALVES, S. B. Perspectivas para a utilização de fungos entomopatogênico no controle de pragas no Brasil. **Pesquisa agropecuária**, Brasília, 27, S/N; 77- 86, abril, 1992.

AMOND, C. LÓPEZ-VA; MOORE, DAVE, Developing Methods for Testing Host Specificity of *Phymastichus coffea* LaSalle (Hym.: Tetrastichinae), a Potential Biological Control Agent of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Col.: Scolytidae) in Colombia. **Biocontrol Science and Technology**, 1998. (8), p. 397-411.

APqCNOTÍCIAS, **Pesquisador do IB comenta o crescimento do controle biológico na agricultura brasileira**. Disponível em:

<<https://apqcnoticias.com/?s=Dr.+Jos%C3%A9+Eduardo+Marcondes+de+Almeida+>>. Visualizado em: 14 maio 2019.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Índice Monográfico B40 *Beauveria bassiana*. Disponível em:

<<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/B40%2B%2BBeauveria%2BBassiana.pdf/7f3b672d-bd3e-4628-95dd-3b905bcb6569>>. Acesso em 25 jun. 2019.

BATISTA-FILHO, A. Inimigos Naturais – Fungos Entomopatogênicos. **Guia de Sanidade Vegetal.16/04/2016** Disponível em:<

[http://www.sica.bio.br/guiabiologico/busca\\_inimigos\\_resultado\\_ok.php?Id=9&Vlt=11&busca=Fungos%20Entomopatog%C3%AAnicos](http://www.sica.bio.br/guiabiologico/busca_inimigos_resultado_ok.php?Id=9&Vlt=11&busca=Fungos%20Entomopatog%C3%AAnicos)>. Acesso em: 16 maio 2019.

BATISTA FILHO, A.; CRUZ, B. P. B.; ABRAHÃO, J., Manifestação Tardia da Broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (FERRARI, 1867), (Coleoptera: Scolytidae). **Biológico**, São Paulo, 55 (1/2): 23-24, jul/dez, 1989.

BENASSI, V.L.R.M. Levantamento dos inimigos naturais da Broca-do-Café *Hypothenemus hampei* Ferr. (Coleoptera: Scolytidae) no Norte do Espírito Santo. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 24, p. 635-638, 1996.

BENASSI, V. L. R. M. Aspectos biológicos da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (F., 1867) (Coleoptera: scolytidae), em frutos de açaí, Euterpe oleraceae.2000. In: **Simpósio de pesquisas dos cafés do Brasil**, 1., 2000, Poços de Caldas, MG. Resumos expandidos. Brasília, DF: Embrapa Café; Minasplan, 2000.

BERNARDO, C.C. **Conídios E blastosporos de *Metarhizium spp.* E *Beauveria bassiana*: virulência para *Rhipicephalus micropulus* e resposta ao calor e à radiação UV-B.**

Goiânia, 2016, 97 p. Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação da Universidade Federal de Goiás. Disponível em: <

<repositorio.bc.ufg.br/tede/bitstream/tede/5993/5/Tese%20-%20Cíntia%20das%20Chagas%20Bernardo%20-%202016.pdf>>. Acesso em: 12 abr. 2020.

BEZERRA, C. A. **Plantas de café GM para resistência à broca-do-café: avaliação de biossegurança alimentar**. Brasília, 2013.139 p. Tese (Doutorado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) – Universidade Católica de Brasília, 2013.

BOLETIM TÉCNICO DO INSTITUTO BIOLÓGICO. Controle Biológico da Cigarrinha-da-raiz da Cana-de-açúcar com o Fungo *Metarhizium anisopliae*. n.16, São Paulo; **Instituto Biológico**, 2006, p 1-19.

BOLETIM TÉCNICO DO INSTITUTO BIOLÓGICO. Manejo de Pragas de Pastagens. n.21, São Paulo; **Instituto Biológico**, 2007, p 1-25.

BORSARI, A. P.; CLAUDINO, M. Biodefensivos: Mercado e percepção do produtor brasileiro. **Agroanalysis**, 32 – 37p., 2018. Disponível em: <file:///C:/Users/gesta/Downloads/agroanalysis\_abcbio%20(3).pdf>. Visualizado em: 10 jan. 2020.

BOTERO, C. E. G., Respuesta a preguntas frecuentes sobre el hongo *Beauveria bassiana* y el control de la broca-del-café. Centro Nacional de Investigaciones de Café – Cenicafé Manizales, Caldas, Colombia. Gerencia Técnica, Programa de Investigación Científica Fondo Nacional del Café, **Avancios técnicos** 493, julho 2018. ISSN - 0120 – 0178.

Brasil, Ministério da Agricultura e Agropecuária - MAPA, **Sistema de Agrotóxico e Fitossanitário**. Disponível em: < <http://indicadores.agricultura.gov.br/agrofit/index.htm>>. Acesso em: 20 maio 2020.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. **Notícias: Mesmo com o aumento do registros de defensivos agrícolas, venda caiu nos últimos anos**. Disponível em: < <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/mesmo-com-aumento-do-registro-de-defensivos-agricolas-venda-do-produto-caiu-nos-ultimos-anos>>2019. Acesso em: 15 jul. 2019.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA. **Café no Brasil**. 2018. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/politica-agricola/cafe/cafeicultura-brasileira>>. Acesso em: 08 mar. 2019.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA, **Lei Nº 7.802, de 11 de julho de 1989**. Disponível em: < [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/Leis/L7802.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L7802.htm)>. Acesso em: 04 jun. 2018.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA. **Registro Nacional de Cultivares**. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/guia-de-servicos/registro-nacional-de-cultivares-rnc>>. Acesso em: 04 jun. 2018.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente, **Agrotóxico endosulfan será banido do Brasil**. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/informma/item/7020-agrotoxico-endosulfan-sera-banido-do-brasil>>. Acesso em: 06 jun. 2018.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. **Produtos fitossanitários aprovados para agricultura orgânica Brasil**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-tematicas/agricultura-organica/anos-anteriores/produtos-fitossanitarios-embrapa-27.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2019.

CAFEICULTURA, **Conheça os prejuízos causados e os fatores que favorecem a broca-do-café**, 13/09/2017. Disponível em: <<http://revistacafeicultura.com.br/?mat=65354>>. Acesso em: 03 abr. 2019.

CANAL RURAL, **Mercado de defensivos agrícolas no Brasil**. Disponível em: <<http://www.canalrural.com.br/noticias/agricultura/mercado-defensivos-brasil-deve-cair-106-2017-diz-adama-70013>>. Acesso em: 04 jun. 2018.

CARVALHO, A. **Histórico do desenvolvimento do cultivo do café no Brasil**. (Ed.) Alcides Carvalho. 8 p. (Documentos IAC, 34), 2007.

CEJA-NAVARRO, J. A. et al. Gut microbiota mediate caffeine detoxification in the primary insect pest of coffee. **Nature Communications**. 6:7618 DOI: 10.1038/ncomms8618. 9 p., 2015.

CIIAGRO – Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas. **Fenologia do Café**. Disponível em: <<http://www.ciiagro.sp.gov.br/monitoramentocafe/Fenologia.htm>>. Acesso em: 23 abr. 2018.

CNA – Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. **12 Fatos importantes sobre o Manejo Integrado da Broca-do-café (*Hypothenemus hampei*)**. Disponível em: <[http://www.cnabrazil.org.br/sites/default/files/sites/default/files/uploads/monitoramento\\_broca\\_do\\_cafe\\_2018.pdf](http://www.cnabrazil.org.br/sites/default/files/sites/default/files/uploads/monitoramento_broca_do_cafe_2018.pdf)>. Acesso em: 16 mar. 2018.

CNA – Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. **Café: Custos com o controle da Broca-do-Café tiveram aumento expressivo em 2018**. Disponível em: <<https://www.cnabrazil.org.br/boletins/cafe-custos-com-o-controle-da-broca-do-cafe-tiveram-aumento-expressivo-em-2018>>. Acesso em: 18 jul. 2019.

CNI - Confederação Nacional da Indústria. **Uso econômico da biodiversidade pela indústria no Brasil**. / Confederação Nacional da Indústria. Brasília: CNI, 2016. 136 p.: il. Disponível em: <[https://www.ibnbio.org/novo-site/wp-content/uploads/2017/02/Uso-Econ%C3%B4mico-da-Biodiversidade\\_CNI\\_2016.pdf](https://www.ibnbio.org/novo-site/wp-content/uploads/2017/02/Uso-Econ%C3%B4mico-da-Biodiversidade_CNI_2016.pdf)>. Acesso em: 10 abr. 2019.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Custos de produção culturas permanentes**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/custos-de-producao/planilhas-de-custo-de-producao/itemlist/category/405-planilhas-de-custos-de-producao-culturas-permanentes?start=10>>. Acesso em: 01 ago. 2019.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Safra Brasileira de Café**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/index.php/info-agro/safras/cafe>>. Acesso em: 23 maio 2018.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira, café, v. 4 Safra 2017**, n.1 - Primeiro Levantamento, Brasília, p. 1-98, jan.2017.

CONAB, Companhia nacional de Abastecimento. **A cultura do café: análise dos custos de produção e da rentabilidade nos anos-safra 2008 a 2017**. Compêndio de estudos Conab V.12, 2017. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/noticias/lavoura-produtiva-foi-o-principal-fator-de-aumento-da-renda-do-produtor-de-cafe/copy\\_of\\_ConabAculturadoCafAnlisedosCustosdeProduoedaRentabilidadenosanosafra2008a2017.pdf](http://www.agricultura.gov.br/noticias/lavoura-produtiva-foi-o-principal-fator-de-aumento-da-renda-do-produtor-de-cafe/copy_of_ConabAculturadoCafAnlisedosCustosdeProduoedaRentabilidadenosanosafra2008a2017.pdf), ISSN: 2448-3710>. Acesso em: 18 jul. 2019.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Safra Brasileira de Café**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/index.php/info-agro/safras/café>>. Visualizado em: 23 maio 2018.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira, café, v. 6 - **Safra 2020**, n.1 – Primeiro Levantamento, Brasília, p. 1-62, janeiro 2020. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cafe>>. Acesso em: 12 fev. 2020. ISSN 2318-7913.

CONSORCIO PESQUISA CAFÉ, **Consumo mundial de café supera produção**. Disponível em: < <http://www.consorcioquesquisacafe.com.br/index.php/imprensa/noticias/971-2020-03-25-17-57-42#:~:text=A%20produ%C3%A7%C3%A3o%20de%20caf%C3%A9%20em,em%20rela%C3%A7%C3%A3o%20a%202018%2D2019.&text=Para%20a%20Organiza%C3%A7%C3%A3o%2C%20o%20ano,per%C3%ADodo%20de%20outubro%20a%20setembro.>>. Acesso em: 20 abr. 2020.

COSTA, J. N. M.; TEIXEIRA, C. A. D.; TREVISAN, O.; SANTOS, J. C. F., Principais Pragas do Cafeeiro em Rondônia: Características, Infestação e Controle. Rondônia: **EMBRAPA Café**. nov. 2002, 12 p. (Circular Técnica 59).

CURE, J. R.; RODRIGUEZ, D.; GUTIERREZ, A. P.; PONTI, L. The Coffee agroecosystem: bio-economic analysis of coffee berry borer control (*Hypothenemus hampei*). *Nature*, (2020) 10:12262. Disponível em:< <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68989-x>>. Acesso em: 27 jul. 2020.

D'AGOSTINI, S.; REBOUÇAS, M. M.; VITIELLO, N. **Análise Café: O sucesso de uma cultura. Sua história consolidada**. Revista Páginas do Instituto Biológico, vol. 4 – n. 1, 2008. Disponível em:<[http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/pag/v4\\_1/reboucas.htm](http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/pag/v4_1/reboucas.htm)>. Acesso em: 17 abr. 2018.

DALZOTO, P. R.; UHRY, K. F. Controle Biológico de Pragas no Brasil, por meio de *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL. **Biológico**, São Paulo, v.71, n.1, p.37-41, 2009.

DAVIS, A.P., GOVAERTS, R., BRIDSON, D.M., STOFFELEN, P., An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). **Bot. J. Linn. Soc.** 152, 465–512; 2006.

DOMICIANO, F., Cepas para controle biológico selecionadas pela Secretaria de Agricultura são usadas por 90% das empresas brasileiras. **Revista Attalea Agronegócios**, set. 2019. Disponível em:< <https://revistadeagronegocios.com.br/cepas-para-controle-biologico-selecionadas-pela-secretaria-de-agricultura-sao-usadas-por-90-das-empresas-brasileiras/>>. Acesso em: 10 jun. 2020.

EHLER, L. E. Perspective Integrated pest management (IPM): definition, historical development and implementation, and the other IPM. **Pest Manag Sci** 62:787–789 (2006) DOI: 10.1002/ps.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias. **Alternativas para o controle da broca-do-café.** Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/52115273/artigo---alternativas-para-o-controle-da-broca-do-cafe>>. Acesso em: 15/07/2020.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias Café. **Processo que aumenta vida de prateleira de bioinseticida à base de fungo é a mais nova patente da Embrapa. Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação Transferência de Tecnologia Manejo Integrado de Pragas.** Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/36613557/processo-que-aumenta-vida-de-prateleira-de-bioinseticida-a-base-de-fungo-e-a-mais-nova-patente-da-embrapa> > visualizado em: 13 fev. 2020.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias. **Brasil é líder mundial em controle biológico.** Pesquisa, desenvolvimento e Inovação. Manejo Integrado de Pragas, 2019. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/46366490/brasil-e-lider-mundial-em-tecnologias-de-controle-biologico>>. Acesso em: 20 fev. 2020.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias Café. **Consumo mundial de Café.** Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/40814481/consumo-mundial-de-cafe-atinge-165-milhoes-de-sacas-no-ano-cafeeiro-2018-2019> > visualizado em: 13 mar. 2019.

EMBRAPA NOTÍCIAS, **Controle biológico: ciência a serviço da sustentabilidade.** Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/16154268/control-biologico-ciencia-a-servico-da-sustentabilidade>>. Acesso em: 21 jun. 2018.

EMBRAPA NOTÍCIAS, Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias Café. **Notícias sobre o Café.** Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/29107305/cafes-diferenciados-geram-us-682-milhoes-de-receita-cambial-de-janeiro-a-setembro-de-2017>> visualizado em: 20 jun. 2018.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias. **Boletim de Pesquisas e Desenvolvimento 03. Produção Massal de Fungos Entomopatogênicos I, Beauveria bassiana (Vuill).** Disponível em: <[http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes\\_2003/BP03.pdf](http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2003/BP03.pdf)>. Acesso em: 07 jul. 2019. ISSN: 1678-1961, 2004.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Científica Symposium**, Lavras, v. 6, n. 2, p. 36-41, jul./dez, 2008.

FERREIRA, R. R.; MARTINS, R. A. Primórdios da moderna teoria dos germes: Agostino Bassi e a doença dos bichos-da-seda. **Epistême**. Filosofia e História das Ciências em Revista 2 (3): 55-71, 1997.

FUNDACCER, Fundação de desenvolvimento do Cerrado Mineiro. **Manual de prevenção e combate a broca-do-café.** Minas Gerais, FUNDACCER/EPAMIG, 2016. Disponível em: <[http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/publicacoes\\_tecnicas/manual-combate-a-broca.pdf](http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/publicacoes_tecnicas/manual-combate-a-broca.pdf)>. Acesso em: 18 abr. 2019.

GAMA, F. C.; TEIXEIRA, C. A. D.; GARCIA, A.; COSTA, J. N. M.; LIMA, D. K. S. Influência do ambiente na diversidade de fungos associados a *Hypothenemus hampei*, (FERRARI) (COLEOPTERA: SCOLYTIDAE) e frutos de *Coffea canephora*. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.72, n.3, p.359-364, 2005.

GAMA, F. C.; TEIXEIRA, C. A. D.; GARCIA, A.; COSTA, J. N. M.; LIMA, D. K. S. Diversidade de Fungos Filamentosos Associados a *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) e suas Galerias em Frutos de *Coffea canephora* (Pierre). **Neotropical Entomology**, 35(5):573-578, 2006.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. **Os insetos: um resumo de entomologia**. 4 ed. São Paulo: Roca, 2012. 480 p.

HIROSE, E.; NEVES, P. M. O. J. Técnica de criação e manutenção da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae), em laboratório. Scientific Note. **Neotropical Entomology**. 31:1. p. 161-164, 2002.

IB, Instituto Biológico. **Programa de inovação e transferência de tecnologia em controle biológico (PROBIO)**. Disponível em: <<http://www.biologico.sp.gov.br/page/produtos-e-servicos/probio>>. Acesso em: 10 abr. 2019.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Dinâmica Territorial da Produção Agropecuária, **A Geografia do café**. Rio de Janeiro: IBGE, 2016. 136 p. Disponível em: <<https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv99002.pdf>>. Acesso em: 11/04/2020.

INMET, Instituto Nacional de Meteorologia, **Consulta a estação de dados convencionais**. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/sim/sonabra/dspDadosCodigo.php?ODM3ODE=>>>. Acesso em: 17 abr. 2020.

INCAPER, Instituto Capixaba de Pesquisas, Assistência Técnica e Extensão Rural. **Atenção produtor: hora de fazer o controle da principal praga dos cafezais**. Disponível em: <<https://incaper.es.gov.br/Not%C3%ADcia/atencao-produtor-hora-de-fazer-o-controle-da-principal-praga-dos-cafezais>> 12/11/2018. Acesso em: 20 dez. 2018.

INFANTE, F<sup>a</sup>., PEREZ, J.; VEGA, F. E., The Coffee berry borer: the centenary of a biological invasion in Brazil. **Braz. J. Biol.**, 2014, vol. 74, no. 3 (suppl.), p. S125-S126.

IRAC, Comitê de Ação à Resistência a Inseticidas – Brasil. **Em busca de novas estratégias**. Disponível em: <<http://www.ira-br.org/single-post/2017/06/07/Em-busca-de-novas-estrat%C3%A9gias>>. Acesso em: 23 jun. 2018.

JARAMILLO, J.; BORGEMEISTER, C.; BAKER, P.S. Coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae): searching for sustainable control strategies. **Bulletin of Entomological Research**, v.96, p.223-233, 2006. DOI: 10.1079/BER2006434.

JARAMILLO, J.; CHABI-OLAYE, A.; POEHLING, H. M.; KAMONJO, C.; BORGEMEISTER, C. Development of an improved laboratory production technique for the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*, using fresh coffee berries. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 130: 275–281, 2008. DOI: 10.1111/j.1570-7458.2008.00820.x



KROHLING, C. A.; MATIELO, J. B.; MENDONÇA, P. L. P., **Controle da Broca-do-café com o inseticida VERISMO® em café arábica**. Disponível em: <<https://biblioteca.incaper.es.gov.br/digital/bitstream/123456789/3207/1/58-43-CBPC-2017.pdf>>. Acesso em: 01 abr. 2019.

LAURENTINO, E.; COSTA, J. N. M. **Descrição e caracterização biológica da broca-do-café (*Hypothenemus hampei*, Ferrari 1867)**. Rondônia. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2004. 26 p. (Documento Técnico 90).

LEITE et al., **Produção de Fungos Entomopatogênicos**. Ribeirão Preto: A. S. Pinto, 2003. 92p. :il.

LEITE, M. O. G. **Voláteis de flores de café com etanol e metanol são sinérgicos para a atração de *Hypothenemus hampei* (Ferrari) em cafezais**. Dissertação para obtenção do título de mestre em ciências, área de concentração: entomologia. Piracicaba, 2016.

LOPES, B. R., Produção e comercialização de *Beauveria bassiana* para o controle da broca-do-café no Brasil. *In: Manejo da Broca-do-café*, 28 de novembro a 2 de dezembro de 2004. Londrina, Paraná, Brasil. **Anais manejo da Broca-do-café** 249 – 254 p., 2004.

LUZ, E. C. A. et al. Estudo da eficiência de inseticidas no controle da broca-do-café. *In: X Simpósio de pesquisa dos Cafés do Brasil*. 8 a 11 de outubro de 2019, Vitória, ES, 2019.

MACHADO, P. B., Biogeografia y aspectos genéticos de la Broca del café, *Hypothenemus hampei*. *In: Manejo da Broca do Café – Workshop Internacional*, Londrina, 28 de novembro a 02 de dezembro 2004. **Anais Manejo da broca do café**. Paraná: IAPAR. p. 11-36, 2004.

MARTINS, A. L. História do café. São Paulo: **Contexto**, 2008. 316 p.

MASCARIN, G.M.; PAULI, G. **Bioprodutos à base de fungos entomopatogênicos**. *In: Madelaine Venzon; Trazilbo José de Paula Júnior; Angelo Pallini. (Org.). Controle Alternativo de Pragas e Doenças na Agricultura Orgânica*. 1 ed. Viçosa: U.R. EPAMIG ZM, 2010, v. 4, p. 169-195. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/profile/Gabriel\\_Moura\\_Mascarin/publication/274374886\\_Bioprodutos\\_a\\_base\\_de\\_fungos\\_entomopatogonicos\\_Fungal\\_biopesticides\\_in\\_portuguese/links/551c6f220cf2909047bc92ef.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Gabriel_Moura_Mascarin/publication/274374886_Bioprodutos_a_base_de_fungos_entomopatogonicos_Fungal_biopesticides_in_portuguese/links/551c6f220cf2909047bc92ef.pdf)>. Acesso em: 12 jan. 2020.

MATHIEU, F.; GAUDICHON, V.; BRUN, L. O.; FRÉROT, B. Effect of physiological status on olfactory and responses of female *Hypothenemus hampei* during host plant colonization. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 26, n. 3, p. 189-193, 2001.

McDOWGALL, P. **The cost of new agrochemical product discovery, development & registration and research & development predictions for the future**. A Consultancy Study for Crop Life America and the European Crop Protection Association. United Kingdom, R&D March, 2016. Disponível em: <<https://croplife.org/wp-content/uploads/2016/04/Cost-of-CP-report-FINAL.pdf>>. Acesso em: 20 maio 2020.

MENDONÇA, P. L. P., **Avaliação do manejo e controle da broca- do-cafeeiro (*Hypothenemus hampei*, Ferrari, 1867) efetuado pelos produtores brasileiros**. Disponível em: [http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/123456789/9306/12\\_43-CBPC-2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/123456789/9306/12_43-CBPC-2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y). Acesso em: 18 maio 2018.

MESQUITA, C. M. et al. Manual do café: distúrbios fisiológicos, pragas e doenças do cafeeiro (*Coffea arábica* L.). Belo Horizonte: **EMATER-MG**, 2016. 62 p. il.

MOREIRA, M. F.; MANSUR, J. F.; FIGUEIRA-MANSUR, J. **Resistência e Inseticidas: Estratégias, Desafios e Perspectivas no Controle de Insetos**. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular 1–23 (2012).

MOTA, L. H. C. **Desenvolvimento de armadilha de auto-inoculação para o controle de *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Curculionidae) com *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil (Ascomycota: Hypocreales) em tecido sintético**. Piracicaba, 2013. 84p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação – USP, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2013.

MOTA, L. H. C. **Estratégias de utilização de *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) para o manejo de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae)**. Piracicaba, 2017. 116p. Tese (doutorado em ciências). Programa de Pós-graduação – USP, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2017.

NEVES, P. M. O. J. et al. Controle biológico da broca do cafeeiro *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) com o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *In: VI Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil (2009)*. Disponível em: <<http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/123456789/2629/268.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 20 jan. 2020.

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** 34(1):077-082 (2005).

OIC - Organização Internacional do Café. **Relatório sobre o mercado de café dezembro 2018**. Disponível em: <[http://consorcioquesquisacafe.com.br/arquivos/consorcio/publicacoes\\_tecnicas/relatorio\\_oic\\_dezembro\\_2018.pdf](http://consorcioquesquisacafe.com.br/arquivos/consorcio/publicacoes_tecnicas/relatorio_oic_dezembro_2018.pdf)>. Acesso em: 20 mar. 2019.

OKUMURA, A. S. K.; NEVES, P. M. O. J.; POSSAGNOLO, A. F. ; CHOCOROSQUI, V. R.; SANTORO, P. H. Controle da Broca-do-café (*Hypothenemus hampei*) FERRARI em terreiros de secagem de café. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 2, p. 277-282, jul./dez. 2003.

OTTATI-DE-LIMA, et al. Produção semissólida de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em diferentes substratos e efeito da radiação ultravioleta e temperatura sobre propágulos desses entomopatógenos. **Arq. Inst. Biológico**, v. 77, n. 4, p. 651-659, 2010.

PARDEY, A. E. B., Compendium of Coffee diseases and pests. Coffee Insects Pests: Damage Caused by Arthropods. **National Center for Coffee Research**. Colombia: Cenicafé. 2015, 63p. Part II.

PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. **Controle Biológico: uma revisão inter e multidisciplinar**. *Controbiolog*, cap. 8, p. 125-142, 2002. Disponível

em: <[https://www.researchgate.net/profile/Jose\\_Mauricio\\_Bento/publication/318826649\\_Control\\_Biologico\\_Uma\\_Visao\\_Inter\\_e\\_Multidisciplinar\\_in\\_portuguese/links/5980804baca272ebd41cc037/Controle-Biologico-Uma-Visao-Inter-e-Multidisciplinar-in-portuguese.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Jose_Mauricio_Bento/publication/318826649_Control_Biologico_Uma_Visao_Inter_e_Multidisciplinar_in_portuguese/links/5980804baca272ebd41cc037/Controle-Biologico-Uma-Visao-Inter-e-Multidisciplinar-in-portuguese.pdf)>.

Acesso em: 16 abr. 2019.

PARRA, J. R. P.; et al. **Controle Biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. [Ed. Parra *et al.*]. São Paulo: Manole, 2002. 635p.

PARRA, J. R. P., Controle Biológico no Brasil: ficção ou realidade? *In: Simpósio Científico sobre Oceanografia e Defesa Sanitária Animal e Vegetal*. São Paulo, 2011. FAPESP, São Paulo, 2011. Disponível em:

<[http://www.fapesp.br/eventos/2011/09/bunge/Jose\\_Roberto.pdf](http://www.fapesp.br/eventos/2011/09/bunge/Jose_Roberto.pdf)>. Acesso em: 14 jul. 2019.

PARRA, J. R. P., **Situação do Controle Biológico no Brasil**. Disponível em: [http://www.fapesp.br/eventos/2016/02/cb/Jose\\_Roberto.pdf](http://www.fapesp.br/eventos/2016/02/cb/Jose_Roberto.pdf)>. Acesso em: 22 jun. 2018.

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

POMELLA, A. Controle Biológico: entraves e perspectivas. *Agroanalysis*, 37 – 41, 2014. Disponível em: <

<http://bibliotecadigital.fgv.br/ojs/index.php/agroanalysis/article/viewFile/41194/39956>>.

Acesso em: 13 abr. 2020.

RAETANO, C.G. **Condições operacionais de turboatomizadores na distribuição e deposição da pulverização em citros**. 1996. 93f. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba. Disponível em: < <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11146/tde-20191220-115853/publico/RaetanoCarlosGilberto.pdf>>. Visualizado em: 20 fev. 2020.

REBOUÇAS, M. M. et al. Instituto Biológico e seu acervo documental. *Cad. hist. ciênc.*, São Paulo, v. 5, n. 1, jun. 2009.

REBOUÇAS, M. M. Instituto Biológico: 90 anos inovando o presente / Márcia M. Rebouças, Antonio Batista Filho. 1. ed. São Paulo: **Narrativa Um**, 2017. 160 p.

REIS, P. R. Avanços no controle da broca do café. *Revista Cultivar*, Pelotas, v. 27, n. 211 p. 42-44, 2016.

REVISTA CAFEICULTURA, **A História do Café no Brasil**. Disponível em: < <http://revistacafeicultura.com.br/?mat=40384>>2011. Acesso em: 20 maio 2018.

REVISTA CAFEICULTURA, **Controle Biológico da Broca-do-café, História, 2006**. Disponível em: < <http://revistacafeicultura.com.br/index.php?tipo=ler&mat=6819>>. Acesso em: 20 jun. 2018.

RODRIGUES, A. A. F.; ALMEIDA, G. R. R.; DUARTE, T. R. Tecnologias de aplicação de defensivos na cultura do cafeeiro. v. 1 n. 1 (2019): **Revista Agroveterinária do Sul de Minas** v. 1 n. 1, 2019. Disponível em:<<https://periodicos.unis.edu.br/index.php/agrovetsulminas/article/view/268>>. Visualizado em: 18 jan. 2020.

SAES, M. S. M.; NAKAZONE, D. Estudo da competitividade de cadeias integradas no Brasil: impactos das zonas de livre comércio. Cadeia: Café. Campinas: **UNICAMP-IE-NEIT/MDIC**, 2002.

SANTINATO, R. et al. *Beauveria bassiana* Koopert aplicada em lavoura de café, na ausência de fungicidas, para controle da broca-do-café, nas condições de sul de Minas e cerrado. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS**, 43., 2017, Poços de Caldas. Anais... Brasília, DF: Embrapa Café, 2017. (1 CD-ROM), 2 p.

SANTOS, J. M. F.; Aspectos críticos na aplicação de defensivos agrícolas. In: **Anais da XI Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico**, 2005a Disponível em:<<http://www.biologico.agricultura.sp.gov.br/uploads/files/rifib/XIII%20RIFIB/santos.pdf>>. Acesso em: 20 abr. 2020.

SANTOS, J. M. F.; Tecnologia de Aplicação de Agroquímicos como Fator de Sucesso na Lavoura Agrícola In: **Anais da XI Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico**, 2005b. Disponível em:<<http://www.biologico.agricultura.sp.gov.br/uploads/files/rifib/XIII%20RIFIB/santos.pdf>>. Acesso em: 20 abr. 2020.

SFAGRO, Successful Farming, **Bioinseticida da Koppert avança no controle da broca-do-café**. Disponível em: <<https://sfagro.uol.com.br/biologico-da-koppert-avanca-no-controle-da-broca-do-cafe/>>. Acesso em: 23 jun. 2018.

SILVA, A. B.; BRITO, J. M. Controle biológico de insetos-pragas e suas perspectivas para o futuro. **Agrotec**. ISSN 0100-7467 V.36: 248-258, 2015.

SILVA, A. F. C. da: A campanha contra a broca-do-café em São Paulo (1924-1927). **História, Ciências, Saúde – Manguinhos**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 4, p. 957-93, out.-dez. 2006.

SILVA, B. S. O. et al. Distribuição Espacial do Ataque da Broca-do-café no Café Conilon. **Coffee Science**, Lavras, v. 12, n. 4, p. 526 - 533, out./dez. 2017.

SILVA, E. A. R. et al Seleção de isolados de fungos entomopatogênico para o controle de *Leptopharsa heveae* (Hemiptera: Heteroptera, Tingidae). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias, Botucatu, SP, Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 79, n.4, p. 549 – 556, 2012.

SILVA, R. A. et al. Influência das condições climáticas na flutuação populacional da broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera – Scolytidae) no sul de Minas Gerais. In: **VIII Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, Bahia, 25 a 28 de novembro de 2013, Salvador, BA. Consórcio Pesquisa Café. p. 1-4, 2013.

SILVA, R. Z.; NEVES, P. M. O. J. Estabilidade de conídios de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. acondicionados em diferentes embalagens. **Arq. Inst. Biol.**, v.83, 1-7, e0362014, 2016. DOI: 10.1590/1808-1657000362014. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/aib/v83/1808-1657-aib-83-e0362014.pdf>>. Visualizado em: 12 fev. 2020.

SNA – Sociedade Nacional de Agricultura. **Especialistas alertam: 2017 já é o pior em níveis de infestação de broca-do-café**. Disponível em: <<https://www.sna.agr.br/especialistas-alertam-2017-ja-e-o-pior-em-niveis-de-infestacao-de-broca-do-cafe/>>. Acesso em: 18 jun. 2018.

SOARES, A. L. et al. Eficiência dos bioinseticidas *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* no controle biológico de *Cosmopolitus sordidus* (Germar, 1824) (Coleoptera: Curculionidae). **Cerrado Agrociências**, Pato de Minas, UNIPAM, (3); 10-20, nov. 2012.

SOUZA, J. C.; REIS, P. R. **Broca-do-café; histórico, biologia, prejuízos, monitoramento e controle**. 2. Ed. Belo Horizonte: EPAMIG, 1997. 40p.

SOUZA, J. C. et al. Controle químico da broca do café com Cyantraniliprole. **Coffee Science**, Lavras, v. 8, n.4, p 404-410, out/dez, 2013.

STÜRMER, A. T.; ITO, E. T.; PEREIRA, G. V.; MIYAGUI, D. T. Estabilidade de proteases produzidas pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. **UNOPAR Cient., Ciênc. Biol. Saúde**, Londrina, v. 5/6, n. 1, p. 85-88, out. 2003/2004.

TAGLIARI, C. V. et al. Caffeine degradation by *Rhizopus delemar* in packed bed column bioreactor using coffee husk as substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**. 2003, 34 (Supl.1):102-104 ISSN 1517-8382.

TAMAI, M. A. et al. Toxicidade de produtos fitossanitários para *Beauveria Bassiana* (BALS.) VUILL. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 69. p. 89-96, 2002.

VEGA, F. E. et al. The coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae): a short review, with recent findings and future research directions. **Terr. Arthropod. Rev.** 2: 129-147, 2009.

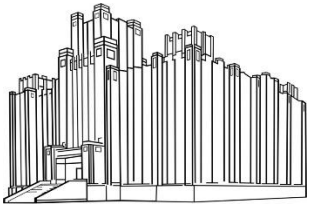
VEGA, F. E., INFANTE F., JOHNSON A. J. The genus *Hypothenemus*, with emphasis on *H. hampei*, the coffee berry borer. In F. E. Vega and R. Hofstetter [eds.], *Bark Beetles: Biology and Ecology of Native and Invasive Species*. Elsevier, Netherlands, 2015.

VIEIRA, S. Bioestatística: tópicos avançados. 4 ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 345p.

WAQUIL, J. M. **Manejo integrado de pragas: revisão história e perspectivas**. Sete Lagoas, MG: [s.n.]. Disponível em:<<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/34902/1/Palestra-Manejo-integrado.pdf>>. Acesso em: 16 abr. 2019.

ZANETTI, R. Entomologia Florestal: Manejo integrado de pragas florestais. **Notas de aula**. UFLA. 2013.

## ANEXO I

 <b>INSTITUTO BIOLÓGICO</b>	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO</b>	POP nº 01
	<b>Projeto: TECNOLOGIA DE APLICAÇÃO DE <i>Beauveria bassiana</i> (Hypocreales: Cordycipitaceae) NO CONTROLE DE <i>Hypothenemus hampei</i> (Coleoptera: Curculionidae)</b>	Palavras Chave:  Dieta, tubos, gaiola, frutos, umidade
	<b>Unidade Laboratorial de Controle Biológico do Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde Animal - CAPSA – CAMPINAS - SP</b>	
Elaborado por: RMCP	<b>CRIAÇÃO E MANUTENÇÃO DE HYPOTHENEMUS HAMPEI EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO</b>	Data de elaboração: 10/05/2018

Esta técnica tem como base o trabalho de Hirose & Neves (2002). Tem como objetivo a criação e manutenção de *Hypothenemus hampei*, a broca-do-café e, a finalidade de obtenção de insetos adultos para bioensaio, de forma prática e com baixo custo.

1- Materiais: coleta, gaiolas, caixa de criação e manuseio:

- a) Coleta: sacos plásticos com furos ou potinhos plásticos com tampa;
- b) Para cada gaiola: usar tubo de pvc branco, com 10 cm  $\varnothing$  x 25cm de comprimento, tampa de conexão para cada extremidade; tela em nylon com 3mm de abertura em uma das extremidades presas por tiras elásticas. Cada gaiola pode suportar entre 350 e 400 grãos de frutos brocados. Entretanto, melhor utilizar no máximo 100 grãos por gaiola para facilitar o manuseio e para facilitar o trânsito dos insetos para o fundo da gaiola;
- b) Caixa de criação: caixa plástica comum, com dimensões aproximadas de 26 x 37 x 13 cm, papel toalha;
- c) Para manuseio: pincel chato, funil, peneira com malha de 5 mm ou bandejas para seleção manual, papel toalha, solução de hipoclorito de sódio a 5%, bandejas para higienização, bandejas para secagem, gaiolas para transporte, grãos sadios. As bandejas de secagem devem ter dimensões que permitam arejamento dos grãos de maneira uniforme. Preferencialmente deixar em ambiente com baixa RU.

2 - Coleta, higienização, manutenção e utilização:

- a) Coleta: escolher a área e coletar grãos brocados maduros na quantidade desejada.
- b) Higienização: após a coleta, proceder a higienização dos grãos mergulhando os mesmos em água com hipoclorito de sódio a 5% por um minuto e em seguida lavar em água corrente. Após,

dispor em bandejas por 48 horas para secagem. Transferir os grãos para a gaiola, com o volume máximo de 350/400 grãos por gaiola.

c) Manutenção:

\* Dieta: deve ser natural pois além de baixo custo, não deixa resíduos de componentes comuns em dietas artificiais, o que poderia interferir nos resultados dos bioensaios. Deve-se selecionar grãos sadios, realizar a higienização com água e hipoclorito de sódio a 5%, deixando-os mergulhados por um minuto e após lavados em água corrente. Deixar secar em bandejas por 48 horas. Após, dispor ao fundo da caixa de criação já forrada com papel toalha, sendo um grão para cada duas brocas. Os grãos recém brocados deverão ser transportados para as gaiolas (cerca de 7 dias após o fornecimento da dieta).

\* Gaiolas e caixas de criação: a cada dois ou três dias, as gaiolas devem ser monitoradas. Deve-se observar a sanidade dos grãos e as condições da emergência dos insetos, se existem larvas de outros insetos ou outros organismos e eliminá-los. Selecionar os besouros agitando suavemente o tubo com a finalidade de separá-los em maior número através da tela. Abrir a tampa e transferir os insetos para o tubo de vidro; separar os detritos dos organismos por peneira de malha 5 mm ou manualmente com pincel, dispor em bandeja forrada com papel toalha. Transferir para a caixa de criação que deve estar forrada com papel toalha com intuito de equilibrar a umidade. A tampa deve ficar fechada, em caso de observação de água livre, deixar entreaberta ou criar orifícios que permitam arejamento. A temperatura do ambiente deverá ser em torno de 25° C e RU 60. Novos adultos deverão emergir entre 30-40 dias após infestação. Na medida em que os insetos das gaiolas forem utilizados, os grãos devem ser eliminados, a gaiola limpa com hipoclorito de sódio a 5% e devidamente seca e após fazer a reposição de grãos recém infestados da caixa de criação.

d) Utilização:

O ciclo de criação permite a utilização dos insetos diretamente das gaiolas. Para cada gaiola, deve-se elaborar etiqueta contendo: número da gaiola, local da coleta, data de coleta, data da higienização e data do início do ciclo de criação e anotados em planilha de controle de uso. Cada gaiola com 400 grãos permite a coleta de aproximadamente 22 besouros/dia.

Observação: os grãos deteriorados também podem ser acondicionados em caixas plásticas com as mesmas características das caixas de criação, com bom aproveitamento de adultos que continuam emergindo diariamente. O ideal é colocar até 70 grãos por gaiola com a finalidade de manter menor índice de umidade e minorar a velocidade da degradação dos grãos.

Após cada manejo, deve-se manter a higienização dos utensílios e das bancadas de acordo com as normas do laboratório.

### **Referência**

HIROSE, E.; NEVES, P. M. O. J. Técnica de criação e manutenção da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae), em laboratório. *Scientific Note. Neotropical Entomology*. 31:1. p. 161-164, 2002.