

Estudo da fungitoxidade de compostos extraídos da cutícula e da glândula metatorácica do percevejo-do-colmo (*Tibraca limbativentris*) sobre o fungo entomopatogênico (*Metarhizium anisopliae*)

¹Rodrigo Alves da SILVA; ¹Luciano Moraes LIÃO; ²Eliane Dias QUINTELA; ¹Pedro Henrique FERRI

¹Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química, Goiânia – GO; ²Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Santo Antônio de Goiás – GO.

Email: alvessilva@cnpaf.embrapa.br

Palavras-chave: Controle biológico, (E)-2-decenal, (E)-2-hexenal, halomônios.

Introdução

O percevejo-do-colmo, *Tibraca limbativentris* Stal (Heteroptera: Pentatomidae), ocorre na maioria das regiões orizícolas do Brasil (Ferreira et al., 1986), sendo mais comum em cultivos irrigados. O nível de dano econômico causado por essa praga é significativo, podendo ocasionar perdas de até 80% da produção (Costa & Link, 1992; Ferreira et al., 1986). Nos arrozais, o inseto localiza-se preferencialmente na base das plantas, próximo ao solo saturado por água (Martins et al., 2004).

Mesmo o inseto habitando um ambiente com condições micrometeorológicas de umidade e temperatura ideais ao desenvolvimento e disseminação do fungo entomopatogênico *M. anisopliae*, sendo o fungo com maior potencial de infectar o *T. limbativentris* (Martins et al., 2004), o índice de infecção desse inseto por este fungo é baixo, não sendo capaz de afetar significativamente a população a níveis que não possam causar danos econômicos (Rampelotti et al., 2007; Martins et al., 2004).

Segundo a literatura, (Sosa-Gomez et al., 1997; Borges et al., 1992) a baixa susceptibilidade dos pentatomídeos por fungos entomopatogênicos é atribuída a aldeídos voláteis presentes na cutícula dessa família de percevejos.

Nesse contexto, este trabalho tem como objetivo isolar e identificar os compostos voláteis da glândula metatorácica de adultos e da cutícula de ninfas do *T. limbativentris* e avaliar a fungitoxidade desses compostos ao *M. anisopliae*.

Materiais e Métodos

Insetos

Os insetos foram adquiridos de matrizes providas de criatório localizado na Embrapa Arroz e Feijão. Os insetos foram alimentados unicamente de planta de

arroz da cultivar BR-IRGA-409 isenta de qualquer agroquímico.

Extração dos compostos químicos do T. limbativentris

A extração dos compostos de ninfas de primeiro ao quinto instar foi feita por maceração de 50 mg exúvia de cada instar, com no máximo três dias após ecdise, em hexano grau cromatográfico por três dias. Nos insetos adultos, os compostos foram extraídos da glândula metatorácica, onde se retirou o tecido quitinoso abdominal de doze machos e doze fêmeas utilizando um bisturi, deixando a vista uma estrutura ovóide de cor alaranjada, a glândula metatorácica. Com um tubo capilar de vidro a glândula foi perfurada, extraída a mistura de substâncias e adicionada a 2mL de hexano grau cromatográfico.

Elucidação estrutural dos compostos químicos

Parte de cada extrato foi concentrada para 0,5mL com fluxo de N₂ gasoso, desidratado com Na₂SO₄ e 1µL de cada extrato injetado em GC-MS (Shimadzu; coluna cb5; 30m; 0,25 mm diâmetro; 5% polissiloxina; espessura de 0,2 µm; temperatura do injetor 220 °C; temperatura inicial da coluna 60 °C; gradiente de aquecimento de 3 °C/min; gás de arraste hélio, com Ø = 1mL/min; volume injetado de 0,3 µL; temperatura do detector de 80°C por ionização de chama e MS modelo QP5050A com ionização por impacto de elétrons (70 eV); varredura de 60 minutos).

Os espectros de massas obtidos e os índices de kovats calculados foram comparados com a literatura (Moraes et al., 2008; Marques et al., 2007; Adams 2007). Para confirmar a elucidação dos compostos, foram injetados os padrões analíticos comerciais (E)- 2-hexenal, (E)-2-decenal, heptanal, dodecano, undecano, tridecano e d-limoneno, todos da marca Sigma-Aldrich®.

Bioensaios.

Numa placa de Petri de 6cm de diâmetro contendo meio de cultura batata, dextrose e ágar (BDA) mais antibiótico tetraciclina, foram inoculados 2µL de uma suspensão de *M. anisopliae* 5x10⁷ conídios/mL. No mesmo ponto da inoculação foram aplicados 30µL do extrato. Este procedimento foi realizado separadamente para cada extrato, totalizando seis repetições por extrato, seis para a testemunha e seis para o controle do solvente. Todas as placas foram lacradas com parafilme e colocadas em incubadora do tipo BOD a 26 ± 1°C, UR 70 ± 10% e 12 horas de fotofase. Após 12 dias foram avaliadas se houve crescimento micelial do fungo.

Os compostos elucidados via GC-MS, foram testados por meio dos padrões comerciais (E)-2-decenal, (E)-2-hexenal, heptanal, decano, undecano e tridecano

(Sigma-Aldrich®). Os compostos foram diluídos para 0,1% com hexano de grau cromatográfico. O bioensaio com os compostos puros foi conduzido conforme procedimento descrito anteriormente para o bioensaio do extrato bruto, acrescentando a avaliação do crescimento vegetativo, que é a medida do diâmetro da colônia.

A concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos que inibiram totalmente o desenvolvimento do fungo foi testada nas concentrações de 0,1, 0,05, 0,025, 0,012, 0,003 e 0,0015%. O tratamento estatístico foi realizado com o software ASSISTAT® versão 7.5 beta (2008), através da análise ANOVA e as médias comparadas por teste de Tukey, experimento inteiramente casualizado.

Resultado e Discussões

Os compostos elucidados foram: d-limoneno, apenas em ninfas de primeiro instar; tridecano e tetradecanal em todas as ninfas; (E)-2-hexenal, em ninfas de segundo a quinto instar e adultos; undecano, dodecano, 4-oxo-(E)-2-hexenal, 4-oxo-(Z)-2-hexenal, (E)-2-decenal e heptanal apenas em adultos. Os compostos tetradecanal, 4-oxo-(E)-2-hexenal e 4-oxo-(Z)-2-hexenal não foram confirmados por padrões analíticos, no entanto, seus fragmentos de massa foram comparados com a literatura, sendo compostos comuns nos pentatomídeos (Moraes et al., 2008; Pareja et al., 2007; Borges et al., 1992).

Todos os extratos de adultos e ninfas, exceto de primeiro instar, não apresentaram crescimento micelial após 12 dias da inoculação do fungo.

Os tratamentos com os hidrocarbonetos apresentaram resultados semelhantes ao controle (Tabela 1). O heptanal não impediu a germinação do fungo, porém o crescimento micelial diferiu significativamente da testemunha ($gl = 7,51$; $F. Krit (1\%) = 2,3813$; $f = 373,7681$ e $p < 0,001$). No entanto, os aldeídos insaturados (E)-2-hexenal e (E)-2-decenal apresentaram maior toxicidade inibindo totalmente a germinação do *M. anisopliae*. Resultado que corroboram com Soza-Gomez et al. (1997) e Borges et al. (1993).

O ensaio de CIM demonstrou que o (E)-2-hexenal e o (E)-2-decenal inibiram o crescimento dos fungos, respectivamente nas concentrações de 0,012% e 0,003%, demonstrando alto potencial fungitóxico desses compostos (Tabela 2).

De acordo com os dados espectrais, os aldeídos insaturados não foram detectados em ninfas de primeiro instar, fato que pode justificar a maior

susceptibilidade do inseto nesse estágio. Rampelotti et al. (2007) observou que mais de 80% de uma população de ninfas de primeiro instar de *T. limbativentris* infectadas por *M. anisopliae* não alcançaram o segundo instar. Constatou ainda que os adultos desse inseto são consideravelmente menos susceptíveis ao *M. anisopliae* comparado com os outros estágios de desenvolvimento do inseto. Isto pode ser atribuído ao fato do (E)-2-decenal estar presente apenas em adultos, sendo este composto o mais fungitóxico.

Tabela 1 – Crescimento vegetativo do *M. anisopliae*.

Tratamentos	Diâmetro da colônia (mm) (n = 6)	Tratamentos	Diâmetro da colônia (mm) (n = 6)
Testemunha	34,02 ± 2,0a	Testemunha	34,02 ± 2,0a
Controle do solvente ¹	30,91 ± 2,8 a	Controle do solvente ¹	30,91 ± 2,8 a
Decano	29,85 ± 4,9 ab	Heptanal	21,50 ± 7,2b
Undecano	31,00 ± 2,9 a	(E)-2-hexenal	0 c
Tridecano	35,03 ± 1,8 a	(E)-2-decenal	0 c

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. ($gl = 7,51$; $F\text{-Krit}(1\%) = 2,3813$; $F = 373,7681$ e $p < 0,001$).

Tabela 2 - Resultados da CIM

Tratamento ¹	Diâmetro da colônia	Tratamento ¹	Diâmetro da colônia
Testemunha	29,20 ± 1,82 a	Testemunha	29,20 ± 1,82 a
Controle solvente ²	28,32 ± 2,98 a	Controle solvente ²	28,32 ± 2,98 a
H 0,1%	0 c	D 0,1%	0 b
H 0,05%	0 c	D 0,05%	0 b
H 0,025%	0 c	D 0,025%	0 b
H 0,012%	0 c	D 0,012%	0 b
H 0,006%	25,68 ± 1,02 b	D 0,006%	0 b
H 0,003%	27,80 ± 0,94 a	D 0,003%	0 b
H 0,0015%	28,22 ± 1,43 a	D 0,0015%	27,19 ± 3,79 a

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. ²O solvente utilizado foi hexano grau cromatográfico; H = (E)-2-hexenal, D = (E)-2-decenal. ¹($gl = 15,64$; $F\text{-Krit}=2,6685$; $F = 404,2216$; $p < 0,001$).

A identificação de substâncias fungitóxicas nos pentatomídeos, abre oportunidade para novas pesquisas com interesse de induzir a isolados eficientes do fungo *M. anisopliae* maior resistência a estes compostos. Podendo assim, estabelecer um programa mais eficiente de controle biológico dessa praga,

reduzindo as aplicações de agrotóxicos nos agroecossistemas.

Conclusão

Concluimos que a baixa mortalidade do *T. limbativentris* por *M. anisopliae* em experimentos de laboratório pode ser atribuída a compostos fungitóxicos presente na cutícula do percevejo. Os compostos (E)-2-hexenal e (E)-2-decenal apresentaram alto potencial fungitóxico ao *M. anisopliae*, podendo esses compostos ser responsáveis pela baixa infecção em ninfas de segundo ao quinto instar e adultos do percevejo-do-colmo ao fungo.

Referências

- ADAMS, R. P. **London: Allured Pub. Corp.**, 2007.
- BORGES, M. & ALDRICH, J.R. **Experientia**. 48: 893-896, 1992.
- BORGES, M.; LEAL, S.C.M.; TIGANO-MILANE, M.S.; VALADARES, M.C.C. **Anais da sociedade entomológica brasileira**. 22: 505-512, 1993.
- COSTA, E.C. & LINK, D. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. 21: 187-195, 1992.
- FERREIRA, E.; MARTINS, J.F. da S.; RANGEL, P.H.N.; CUTRIN, V. dos A. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 21:5, 565-569, 1986.
- MARQUES, F.A.; WENDELER, E.P.; MAIA, B.H.L.N.; VENTURA, M.U.; ARRUDAGATI, I.C. **Journal of Brazilian Chemical Society**. 18:6, 1242-1246, 2007.
- MARTINS, J.F. da S.; BOTTON, M.; CARBONARI, J.J.; QUINTELA, E.D. **Ciência Rural**. 34:6, 1681-1688, 2004.
- MORAES, M.C.B.; PAREJA, M.; LAUMANN, R.A.; BORGES, M. **Neotropical Entomology**. 37:5, 489-505, 2008.
- PAREJA, M.; BORGES, M.; LAUMANN, R.A.; MORAES, M.C.B. **J. Insect Physiol.** 53: 639-648, 2007.
- RAMPELOTTI, F.T.; FERREIRA, A.; PRANDO, H.F.; GRÜTZMACHER, A.D.; MARTINS, J.F. da S.; TCACENCO, F.A.; MATTOS, M.L.T. **Arquivo Instituto Biológico**. 74:2, 141-148, 2007.
- RAMPELOTTI-FERREIRA, F.T.; FERREIRA A.; PRADO, H.F.; TCACENCO F.A.; GRÜTZMACHER, A.D.; MARTINS, J.F.S. **Ciência Rural**. 40:4, 745-751, 2010.
- SOSA-GOMEZ, D.R.; BOUCIAS, D.G.; NATION, J.L. **Journal of Invertebrate Pathology**. 69: 31-39, 1997.