

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

Produção de *Cordyceps fumosorosea*, viabilidade econômica, patogenicidade e influência de metabólitos frente à *Euschistus heros*

Kenya Martins Faggioni Floriano

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

São Paulo

2021

Kenya Martins Faggioni Floriano

Produção de *Cordyceps fumosorosea*, viabilidade econômica, patogenicidade e influência de metabólitos frente à *Euschistus heros*

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

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Orientador:

Dr. Antonio Batista Filho

São Paulo

2021

Eu, **Kenya Martins Faggioni Floriano**, 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.

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

Floriano, Kenya Martins Faggioni.

Produção de *Cordyceps fumosorosea*, viabilidade econômica, patogenicidade e influência de metabólitos frente à *Euschistus heros*. / Kenya Martins Faggioni Floriano. - São Paulo, 2021.

48 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA.2021D.KF010

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: *Cordyceps fumosorosea* production, economic viability, pathogenicity and influence of metabolites against *Euschistus heros*.

1. Controle biológico 2. Entomopatogênicos 3. Cultivo sólido 4. Cultivo líquido 5. Beauvericina I. Floriano, Kenya Martins Faggioni II. Batista Filho, Antonio III. Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

IB/Bibl./2021/010

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Kenya Martins Faggioni Floriano

Título: Produção de *Cordyceps fumosorosea*, viabilidade econômica, patogenicidade e influência de metabólitos frente à *Euschistus heros*

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.

Aprovado em: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Ricardo Faggioni e Keila Faggioni** por sempre incentivarem à me dedicar aos estudos e na construção de minha carreira profissional. Todas as minhas conquistas são deles também pois é fruto de uma educação com muito amor e dedicação para que pudesse concretizar meus objetivos.

Ao meu marido **Junior Floriano**, por além de me incentivar estar sempre me apoiando em todos os momentos e decisões.

À **Koppert**, por acreditar em meu potencial e permitir a concretização de me tornar Mestre.

Á **Deus** por me dar saúde e sabedoria para poder finalizar esse trabalho, pois foi um caminho com muitos desafios, porém de muito aprendizado.

AGRADECIMENTOS

Em especial à **Inajá Marchizeli Wenzel Rodrigues** que me ajudou em todos os momentos para que esse trabalho se concretizasse.

Ao **Dr. José Eduardo Marcondes de Almeida** por todo suporte dado durante o desenvolvimento desse trabalho.

Ao **Dr. Antônio Batista Filho** pela orientação.

Ao **Luciano Zapellini** por ter apoiado e incentivado a realização desse trabalho.

À **Juliana Longatto** por todo apoio, incentivo e amizade.

À toda equipe de **Pesquisa e Desenvolvimento** de Microbiológicos da Koppert do Brasil por toda a ajuda prestado durante os Bioensaios (Nathalia Felipe Chagas, Thiago Castro, Lara, Tais.).

À toda equipe de **Controle de Qualidade** de Microbiológicos da Koppert do Brasil por toda ajuda prestada durante o desenvolvimento do projeto, que mesmo na minha ausência trabalharam para manter o laboratório funcionando (Bruna Teixeira, Carla Zambon, Daniela Farias, Fabiano Nascimento e Paulo Cesar).

Ao **Gustavo Rodrigues Alves** pelo auxílio na metodologia e análise estatística dos ensaios de patogenicidade.

Ao **Laboratório de Microbiologia Agrícola** e ao **Instituto de Química de São Carlos** que em parceria realizaram as análises de cromatografia e metabôlômica, principalmente à Professora Simone Possedente Lira e à aluna Naydja Moralles Maimone.

Ao **Instituto Biológico** pela oportunidade de realizar a projeto.

À **Koppert do Brasil** por ceder toda estrutura para realização desse trabalho, bem como permitir dispor do meu tempo para realização do mesmo.

À toda minha **família** por terem me apoiado e incentivado nessa jornada.

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

RESUMO

FAGGIONI, Kenya. **Produção de *Cordyceps fumosorosea*, viabilidade econômica, patogenicidade e influência de metabólitos frente à *Euschistus heros*** 48f. 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, 2021.

A cultura da soja é uma das commodities de maior importância no Brasil sendo responsável por 22% de todo produto agrícola exportado no país. Entretanto a cultura é acometida por diversos insetos pragas, dentre eles o percevejo *Euschistus heros* que ataca desde as plantas até os grãos podendo causar prejuízos de até 30% na cultura. O controle da praga tem sido realizado com agentes químicos e microbiológicos à base dos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*. A produção desses agentes microbianos no Brasil de uma maneira geral é realizada em cultivo sólido, sendo o escalonamento desses microrganismos dificultoso devido a demanda de espaço físico e mão de obra. Com base nessas informações, o objetivo do trabalho foi estudar a eficácia de *C. fumosorosea* frente a *E. heros*, estabelecer um meio de cultura líquido que otimize o processo produtivo do fungo e melhore a performance sob a praga, verificar a presença do metabólito beauvericina e comparar o custo de produção dos cultivos. A produção dos fungos foi realizada por fermentação líquida em biorreatores com três tratamentos, sendo meio de cultura A, B e C; além de um controle realizado na metodologia de produção Koppert (substrato sólido – arroz). Durante a fermentação foram quantificadas as UFCs (Unidades Formadoras de Colônia), a concentração de células infectivas em câmara de Neubauer no final do processo; identificação da beauvericina nos meios líquidos, ensaios de eficácia, onde foram aplicados o produto bruto da fermentação e o produto isolado em parte sólida e líquida, a fim de avaliar a influência dos metabólitos no controle da praga em diferentes estágios de desenvolvimento (ovo, ninfa e adulto), além disso foi avaliado o custo para produção de cada um dos métodos de cultivo. A concentração de células infectivas produzidas em ambos os tratamentos não diferiram estatisticamente, não foi detectada a produção de beauvericina nos meios analisados, porém o tratamento composto pelo meio de cultura A, onde foram aplicadas as células infectivas e os metabólitos houve colonização de 95% das ninfas eclodidas dos ovos o que sugere que exista algum metabólito que influencie na colonização e morte desses insetos. O cultivo sólido foi três vezes mais caro que o líquido além de levar cinco dias a mais para produzir a mesma quantidade de células.

PALAVRAS-CHAVE: Percevejo da soja, controle biológico, entomopatogênicos, cultivo sólido, cultivo líquido, Beauvericina.

ABSTRACT

FAGGIONI, Kenya. *Cordyceps fumosorosea* production, economic viability, pathogenicity and influence of metabolites against *Euschistus heros* 48f. 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, 21.

Soybean culture is one of the most important commodities in Brazil, accounting for 22% of all agricultural products exported in the country. However, the crop is affected by several pest insects, including the bug *Euschistus heros*, which attacks from plants to grains, can cause damages of up to 30% in the crop. The pest control was carried out with chemical and microbiological agents based on the fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. The production of these microbial agents in Brazil, in general, is carried out in solid cultivation, and the scaling of these microorganisms is difficult due to the demand for physical space and labor. Based on this information, the objective of this work was to study the effectiveness of *C. fumosorosea* against *E. heros*, establish a liquid culture medium that optimizes the production process of the fungus and improves performance under the pest, verifying the presence of the metabolite beauvericin and crop production cost. The production of fungi was carried out by liquid fermentation in bioreactors with three treatments, being culture medium A, B and C; in addition to a control carried out in the Koppert production methodology (solid substrate - rice). During fermentation, the CFUs (Colony Forming Units) were quantified, the concentration of infective cells in a Neubauer chamber at the end of the process; identification of beauvericin in liquid media, successful trials, where the crude product of fermentation and the solid and liquid part alone were identified, in order to assess the influence of metabolites on pest control at different stages of development (egg, nymph and adult), in addition, the cost of production of each of the cultivation methods was evaluated. The concentration of infective cells produced in both treatments did not differ statistically, the production of beauvericin was not detected in any of the media, but the treatment consisted of culture medium A, where the infective cells were applied and the metabolites had colonization of 95% of the nymphs hatch from the eggs, which confirms the existence of some metabolite that influences the colonization and death of these insects. Solid culture is three times more expensive than liquid and it takes five days longer to produce the same amount of cells.

KEYWORDS: Soybean bug, biological control, entomopathogenics, solid culture, liquid culture, Beauvericin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Câmara de Neubauer e demarcações dos campos observados durante a contagem	25
Figura 2: Média de produção de biomassa (g/L de meio) de <i>Cordyceps fumosorosea</i> , coletada em três ensaios, avaliada em intervalos de 24 horas partir do tempo zero do processo de cultivo líquido.	32
Figura 3: Média de três ensaios realizados para determinação das Unidades Formadoras de Colônia com amostras coletadas em quatro tempos distintos durante o processo de cultivo líquido do fungo entomopatogênico <i>Cordyceps fumosorosea</i>	33
Figura 4: Gráficos de análise em HPLC para Meio B (A- Branco; B-Padrão; C-1ªRepetição; D-2ªRepetição).....	34
Figura 5: Gráficos de análise em HPLC para Meio A (A- Branco; B-Padrão; C-1ªRepetição; D-2ªRepetição).....	34
Figura 6: Gráficos de análise em HPLC para Meio C (A- Branco; B-Padrão; C-1ªRepetição; D-2ªRepetição).....	35
Figura 7: Análise molecular para detecção de beauvericina	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição dos tratamentos dos ensaios de Patogenicidade	28
Tabela 2: Custo da mão de obra para produção de 2.000 Kg de cultivo sólido (grãos de arroz) e de 2.000 L de cultivo líquido de <i>Cordyceps fumosorosea</i>	29
Tabela 3: Custo de 2.000 Kg de cultivo sólido (arroz), de 2.000 L de cultivo líquido (meios A, B e C), custo de mão de obra para produção de 2.000 Kg/L de cada tipo de cultivo e custo final para produção de cada cultivo de <i>Cordyceps fumosorosea</i> levando em consideração o custo de mão de obra.....	29
Tabela 4: Concentração média de conídios submersos/blastosporos <i>Cordyceps fumosorosea</i> ($\times 10^8$) produzidos ao final de 72 horas de cultivo para os meios de cultura testados nos três bioensaios realizados.....	30
Tabela 5: Concentração média das células infectivas de <i>Cordyceps fumosorosea</i> (blastosporos/conídios submersos), obtida de 3 ensaios, após 72 horas de cultivo para os três meios de cultura distintos.....	31
Tabela 6: Média de biomassa (g/L) de <i>Cordyceps fumosorosea</i> produzida nos três meios de cultura durante as 72 horas de cultivo, coletada e avaliada em intervalos de 24 horas após a inoculação e antes do início do cultivo.....	31
Tabela 7: Média de Unidades Formadoras de Colônia de <i>Cordyceps fumosorosea</i> mantidas em incubadora à $27\pm 1^\circ\text{C}$ por 6 dias, coletadas em intervalos de 24 horas no decorrer do processo nos três meios de cultura avaliados.....	32
Tabela 8: Percevejos (%) <i>Euschistus heros</i> colonizados por fungos entomopatogênicos, 18 dias após aplicação e metabólitos, para cada um dos tratamentos analisados e para cada fase de desenvolvimento avaliada (Incubação em B.O.D, temperatura $25\pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas).	36
Tabela 9: Concentração média de estruturas infectivas ($\times 10^8$) determinadas em câmara de Neubauer produzidas ao final do cultivo para os meios de cultura A, B e C (conídios submersos/blastosporos) e para o método produtivo Koppert em arroz (conídio aéreo) em três bioensaios realizados.	37

Tabela 10: Custo de produção e concentração de células infectivas (conídios aéreos-arroz e blastosporos/conídios submersos-Meios A, B e C) para cada um dos meios de cultivo em seu respectivo tempo de produção. 37

Tabela 11: Custo dos insumos para produção de *Cordyceps fumosorosea* em meio de cultivo líquido e sólido, redução de custo e porcentagem de economia dos meios líquidos em relação ao sólido. 41

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	7
RESUMO	8
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVO	17
2.1. GERAL.....	17
2.2. ESPECÍFICOS	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1. CULTURA DA SOJA.....	18
3.2. CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS PARA AS GRANDES CULTURAS	19
3.3. PRODUÇÃO DE AGENTES MICROBIANOS POR FERMENTAÇÃO LÍQUIDA	20
3.4. PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM FERMENTAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGENICOS.....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1. ISOLADO.....	23
4.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	23
4.3. PREPARO E FERMENTAÇÃO DOS MEIOS LÍQUIDOS	24
4.4. PARÂMETROS AVALIADOS	24
4.4.1. METODOLOGIA ANÁLISE – LEITURA DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA (UFC)	24
4.4.2. METODOLOGIA DE ANÁLISE DE CONCENTRAÇÃO EM NEUBAUER	25
4.4.3. METODOLOGIA ANÁLISE – BIOMASSA.....	25
4.4.4. METODOLOGIA ANÁLISE – METABÓLITOS	26
4.4.4.1. (IQSC/USP). EXTRAÇÃO E ANÁLISE UPLC-ESPECTOFOTOMETRIA DE MASSAS 26	
4.4.4.2. ANÁLISE MOLECULAR.....	27
4.4.5. ENSAIO DE PATOGENICIDADE.....	27
5. ANÁLISE DE CUSTO DE PRODUÇÃO	29

6.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
7.	RESULTADOS	30
7.1.	CONCENTRAÇÃO DE CONÍDIOS SUBMERSOS/BLASTOSPOROS	30
7.2.	BIOMASSA	31
7.3.	UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA (UFC)	32
7.4.	METABÓLITOS	33
7.5.	PATOGENICIDADE	36
7.6.	CUSTO DE PRODUÇÃO.....	37
8.	DISCUSSÃO	38
9.	CONCLUSÃO/CONCLUSÕES	42
10.	REFERÊNCIAS	43

1. INTRODUÇÃO

A cultura da soja, *Glycine max* (L.) Merrill, é uma das mais importantes commodities produzidas no Brasil, sendo representada por 22,64% das exportações de produtos agropecuários brasileiros (BRASIL, 2017). Entretanto, a produtividade do cultivar pode ser afetada pelo ataque de diferentes insetos-pragas, dentre esses, o complexo de pentatomídeos se destaca e, nos últimos anos o percevejo-marrom da soja, *Euchistus heros* (Fabricius, 1794) (Heteroptera: Pentatomidae) tem sido o maior causador de danos na cultura (SILVA et al. 2011; BUENO et al. 2012, 2015; SOUSA-GOMEZ et al. 2014; TUELHER et al. 2016).

Para o controle desse inseto tem sido realizado apenas o controle químico (GHIMIRE-WOODWARD 2013; GUEDES 2017). Porém recentemente vários produtos biológicos foram registrados, tendo como componente os fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*; além do parasitoide *Telenomos podisi* (AGROFIT, 2003).

Os entomopatógenos são grandes aliados do manejo integrado de pragas, pois são agentes capazes de causar doenças em insetos, englobando os vírus, fungos, bactérias e nematoides (ALVES, 1986). Os fungos foram os primeiros agentes de controle microbiano utilizados no controle de insetos. Esses organismos têm uma grande variabilidade genética o que é considerado uma grande vantagem para o controle de insetos pois, isso traz uma alta virulência e especificidade (ALVES, 1998). Além disso os entomopatógenos são mais bem aceitos pelos produtores devido à compatibilidade/facilidade de uso em equipamentos utilizados na aplicação dos químicos.

A estrutura dos fungos mais utilizadas no combate aos insetos são os conídios, que aderem ao tegumento do inseto, onde germinam e penetram através de ação de enzimas e/ou pela pressão mecânica exercida pelo tubo germinativo e apressório. As hifas se desenvolvem por dentro do inseto, extrapolam o tegumento do mesmo onde irão entrar em contato com o ar atmosférico e formarão novos conídios, dispersando-se no ambiente (ALVES, 1998).

Os conídios podem ser produzidos em meio sólido ou meio líquido. Os conídios produzidos em meio sólido geralmente são mais tolerantes ao dessecamento quando comparado aos conídios submersos. Entretanto a produção de conídios aéreos apresenta uma gama de dificuldades que vão desde à esterilização do substrato ao controle ambiental durante seu desenvolvimento e, esses desafios vão se intensificando conforme se escalona a produção. Dessa maneira, o conhecimento de estruturas produzidas em fermentação líquida é importante para que seja possível e viável o escalonamento da produção desses agentes de controle biológico (JACKSON, 1997).

Em 2018, a comercialização de biopesticidas no Brasil registrou crescimento de 70% em relação ao ano de 2017, já no cenário mundial o setor cresceu 17% (MAPA, 2019). Para os anos de 2019, 2020 e 2021 o comércio de produtos biológicos no Brasil cresceu e ainda deve crescer em torno de 14,4% por ano (em milhões de dólares), e esse incremento se deve principalmente a adoção dos bioinseticidas nas maiores culturas do país como soja, milho e cana (CROPLIFE, 2021).

Juntamente com o crescimento do setor o número de produtos registrados também sofreu aumento, atualmente com 433 produtos autorizados pelo MAPA sendo que em 2013 havia apenas 107 produtos registrados. Dentre todos os produtos biológicos registrados 65% são representados por microrganismos (CROPLIFE, 2021).

A otimização de processos produtivos desses microrganismos bem como a inovação no setor se faz necessária para que seja possível atender a demanda, uma vez que o interesse e as vendas destes produtos estão em constante crescimento.

2. OBJETIVO

2.1. GERAL

- Avaliar a eficiência do fungo entomopatogênico *Cordyceps fumosorosea*, produzido em meio de cultura líquido, e os subprodutos desse sistema de fermentação, no controle de *Euschistus heros* em diferentes fases de seu desenvolvimento (ovo, ninfa e adulto).

2.2. ESPECÍFICOS

- Otimizar a produção do fungo *C. fumosorosea*, através da fermentação líquida, bem como torná-la mais sustentável substituindo o uso do arroz e consequentemente diminuindo o resíduo final da produção;
- Verificar via cromatografia líquida a presença e a concentração do metabólito beauvericina produzidos durante o processo fermentativo;
- Validar o produto mais infectivo e virulento frente ao alvo testado, comparando as estruturas produzidas no processo de fermentação sólida “conídios” e as estruturas produzidas na fermentação líquida “blastosporos/conídios submersos” e, os metabólitos isolados da parte sólida;
- Comparar o custo de produção das estruturas infectivas em ambos os tipos de cultivo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. CULTURA DA SOJA

A soja é uma cultura de extensa área plantada, representada por 35,1 milhões de hectares com produção de 119,28 milhões de toneladas. É também uma das principais commodities exportadas, colocando o país em segundo lugar no ranking mundial de produção com aproximadamente 114,8 milhões de toneladas produzidas na safra 2019/2020, sendo o estado de Mato Grosso o maior produtor nacional, responsável por 32,4 milhões de toneladas (CONAB, 2019; EMBRAPA, 2020).

Tanto a soja quanto os produtos derivados dela são muito utilizados na alimentação humana e animal. A torta, a farinha e o óleo de soja são utilizados na indústria para fabricação de óleos de cozinha, maioneses, margarinas, massas, pães, biscoitos, produção de cereais, proteínas substitutas da carne, além de ser utilizada como matéria-prima na fabricação de biodiesel. Além disso, o farelo de soja é amplamente utilizado na criação de gado, aves domésticas, suínos e peixes como suplemento alimentar (MISSÃO, 2006).

Entretanto, esse cultivo intensivo de monoculturas em grandes áreas, favorece o ataque de pragas desde a germinação até a colheita; sendo os insetos-pragas responsáveis por aproximadamente 15% das perdas de tudo o que é produzido na agricultura, pois com o aumento das áreas cultivadas, há como consequência o aumento da disponibilidade de alimentos favorecendo a proliferação de pragas agrícolas (ERTHAL JUNIOR, 2011; GALLO et al., 2002; HOFFMANN-CAMPO et al., 2000).

Dentre as diversas pragas que acometem a cultura da soja os percevejos fitófagos são considerados os de maior importância. Esses insetos alimentam-se das vagens, deixando-as com aspectos murchos, e dos grãos, podendo causar má formação, afetando diretamente a produtividade, o peso, o vigor e a capacidade de germinação (CORRÊA-FERREIRA; PANIZZI, 1999).

O complexo de pentatomídeos se destaca e, nos últimos anos o percevejo-marrom da soja, *Euschistus heros* (Fabricius, 1794) (Heteroptera: Pentatomidae) tem sido o maior causador de danos na cultura (SILVA et al. 2011; BUENO et al. 2012; SOUSA-GOMEZ et al. 2014; TUELHER et al. 2016). Os danos causados por *E. heros* afetam exclusivamente as vagens, grãos e as hastes da planta. Os insetos sugam a seiva das hastes e injetam toxinas durante a alimentação o que provoca a retenção foliar conhecida como “soja louca”, sendo que esse efeito pode gerar distúrbios na maturação e amadurecimento dos grãos (GALLO et al., 2002).

Além de afetar a planta através da sucção da seiva os percevejos atacam as vagens e os grãos, podendo gerar prejuízos de até 30%. Os ataques aos grãos podem deixá-los com aspecto “chocho”, influenciando sua qualidade reduzindo os teores de óleo e proteína; já os ataques às plantas geram

aberturas no tecido vegetal que podem ser uma porta de entrada para várias doenças (KURTZMAN, 1995).

Atualmente para o controle do percevejo marron (*E. heros*) tem sido utilizado controle por meio da aplicação de produtos químicos que nem sempre apresenta o resultado desejado na supressão do inseto. Por essas razões, existe uma necessidade de implementar um manejo dessa praga, assim como avaliar novos métodos e ferramentas para seu controle (GHIMIRE-WOODWARD 2013; GUEDES 2017).

3.2. CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS PARA AS GRANDES CULTURAS

O termo “controle biológico” foi utilizado pela primeira vez em 1919 pelo pesquisador Harry S. Smith para referir-se ao controle de insetos-praga através do uso de inimigos naturais (PARRA et al. 2002). Segundo Gallo et al., 2002, o controle biológico é um fenômeno de ocorrência natural no meio ambiente que consiste no controle de um determinado organismo por inimigos naturais dos quais se constituem como agentes de mortalidade biótica.

O controle biológico é uma importante estratégia do manejo integrado de pragas, que eleva ou mantém a população de inimigos-naturais e, como em geral são específicos a seus alvos reduzem o nível populacional dos insetos-praga de forma que eles não atinjam o nível populacional de dano-econômico na cultura. Os inimigos naturais são atóxicos aos seres humanos e não deixam resíduos prejudiciais ao meio ambiente, por isso tem sido amplamente empregados no setor agrícola como alternativa para o controle de pragas (ERTHAL JUNIOR, 2011; SIMONATO; GRIGOLLI; OLIVEIRA, 2010).

Os inimigos naturais podem ser: vírus, bactérias, fungos, nematóides, artrópodes, peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos (inclusive o homem), porém existem três tipos de inimigos naturais com maior representatividade de uso no controle biológico de pragas: os parasitoides, os predadores e os entomopatógenos. Dentre os métodos de controle biológico, os entomopatógenos representados principalmente pelos fungos, vírus e bactérias são os mais utilizados por haver a possibilidade de serem formulados como bioinseticidas, assim como, possuem uma certa estabilidade de armazenamento (GALLO *et al.*, 2002; ALVES, 2011; OLIVEIRA et al., 2006).

Os fungos entomopatogênicos são os principais causadores de epizootias nos insetos. Eles possuem um amplo espectro de hospedeiros, além de terem capacidade de controlar os diferentes estádios de desenvolvimento dos insetos como ovo, larvas, pupas e adultos. Outra vantagem do uso de fungos no controle de pragas é que a infecção se dá pelo contato físico não sendo necessária a ingestão do patógeno (ERTHAL JUNIOR, 2011; ALVES, 1998).

A estrutura mais utilizada dos fungos são conídios cuja ação patogênica se inicia quando o mesmo adere a cutícula do inseto. O esporo germina formando o apressório e o grampo de penetração, onde enzimas de degradação como lipases, quitinases e proteinases possibilitam o rompimento da cutícula do inseto e, conseqüentemente a colonização do fungo sobre ele. O inseto morre por infecção e após sua morte inicia a formação de hifas que dará início a outro ciclo de infecção (ALVES, 1998; OLIVEIRA et al., 2006).

A comercialização de produtos biológicos vem crescendo anualmente e, de 2013 para 2021 teve se aumento de 107 para 433 produtos registrado pelo MAPA, sendo 35% de produtos microbiológicos (CROPLIFE, 2021). Apesar desse crescimento o uso de produtos à base de microrganismos para controle do complexo de percevejos fitófagos, sobretudo sobre pentatomídeos são bem escassos. Entretanto, ensaios de laboratório com o produto comercial BotaniGard® à base de *Beauveria bassiana*, proporcionou 85% de mortalidade sobre o percevejo *Halyomorpha halys* nove dias após a aplicação (GOULI et al., 2012).

3.3. PRODUÇÃO DE AGENTES MICROBIANOS POR FERMENTAÇÃO LÍQUIDA

Fungos com ação entomopatogênica são muito utilizados no controle microbiano de pragas tanto que vários produtos com estes agentes de controle vem sendo registrados no mundo todo. Dentre os produtos registrados destacam se as espécies: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Cordyceps fumosorosea* (Wize) (anteriormente *Isaria fumosorosea*, Kepler et al. 2017), (Hypocreales: Cordycipitaceae), (anteriormente *Paecilomyces fumosorosea*, Wize, 1904). (FARIA;WRAIGHT, 2007).

A produção e comercialização de produtos à base de fungos entomopatogênicos vem sendo realizada por empresas públicas e privadas, sendo a estrutura mais empregada o conídio aéreo produzido a partir da fermentação sólida em arroz.

Para que a produção em escala industrial desses fungos seja economicamente viável, são necessárias técnicas de produção de baixo custo, alta produtividade e qualidade do material coletado (alta viabilidade, alta concentração, bem como virulência). Desta forma, se faz necessário o estudo de novas tecnologias de produção desses fungos (ALVES, 1998; TANZINI, 2002).

Atualmente as empresas que comercializam esse tipo de produto, utilizam o método de fermentação sólida que consiste na inoculação dos organismos em sacos plásticos contendo em sua maioria, arroz como substrato. O sistema bi-fásico também vem sendo bastante empregado, onde o inóculo cresce inicialmente em cultura líquida submersa e é posteriormente transferido para o substrato sólido onde ocorre a produção de conídios aéreos (VIMALA DEVI & PRASAD, 1994).

Os conídios produzidos em meio sólido são mais tolerantes à dessecação e mais estáveis em formulações secas, comparativamente aos conídios formados em cultura submersa. Contudo, os meios sólidos apresentam várias limitações nomeadamente no processo de *scale-up* da produção. As mais graves são as dificuldades na esterilização do substrato, o controle da temperatura, a manutenção da cultura pura, o controle das trocas gasosas, o tempo de fermentação, a extração do produto, a mecanização dos processos dependendo de muita mão-de-obra e os custos do processo (JACKSON, 1997).

A utilização de fermentadores possui um papel bastante importante na otimização das condições de cultura, simplificando a produção e reduzindo o tempo da fermentação em meios de cultura líquidos. Este tipo de sistema permite obter um meio de crescimento homogêneo, além de permitir controlar todos os fatores que afetam o processo produtivo, tais como, temperatura, aeração, agitação e pH. Estes fatores juntamente com uma fácil coleta do produto traduzem-se numa produção em massa facilitada e em custos de produção reduzidos (JACKSON, 1997; LOZANO-CONTRERAS *et al.*, 2007).

Uma outra forma de fermentação líquida é a chamada cultivo estacionário onde os fungos formam um micélio superficial que pode esporular na sua parte superior (CARLILE *et al.*, 2001). A parte superficial do inóculo fica exposto à atmosfera enquanto a parte inferior fica em contato direto com o meio nutritivo, fazendo com que o crescimento celular não seja homogêneo (GOTTLIEB & ETEN, 1966). O micélio superficial origina uma barreira que leva a criação, entre a superfície do líquido e o micélio, de uma zona rica em CO₂ e pobre em O₂, o que dificulta o desenvolvimento do fungo (NEIDLEMAN, 1989).

Este sistema apresenta algumas vantagens em relação à cultura líquida submersa, em fermentador, como por exemplo o fato de não haver formação de espuma no meio e nem perturbação das células miceliais através de forças mecânicas. Contudo, também apresenta desvantagens, como, períodos de incubação muito prolongados e produções reduzidas que tornam o processo caro, mais trabalhoso e com maior risco de contaminação. O controle da temperatura, a heterogeneidade do meio por falta de agitação, o reduzido contato entre as células e os nutrientes, a reduzida razão superfície/volume de líquido e a necessidade de áreas de grandes dimensões, são outros problemas deste tipo de fermentação (NEIDLEMAN, 1989).

3.4. PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM FERMENTAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

O tegumento dos insetos é formado por uma barreira físico-química composta de nanofibras de quitina cristalina integrada a uma matriz de proteínas, polifenóis, água e pequenas quantidades de lipídios, que pode ser degradado por proteases e quitinases (VINCENT e WEGST, 2004).

Os fungos entomopatogênicos são capazes de sintetizar diversos compostos os mais importantes são o grupo das enzimas hidrolases e os metabólitos secundários. As enzimas hidrolases mais comuns são as lipases, proteases, quitinases e glucanases, já os metabólitos secundários mais comuns são os depsipeptídeos, destruxinas e a bassianoide que podem ser utilizados no manejo integrado de pragas (ST. LEGER et al., 1986; LEITE 2003).

Os fungos entomopatogênicos sintetizam os metabólitos secundários naturalmente quando os mesmos penetram o exoesqueleto do inseto alcançando a hemocele, dessa maneira acredita-se que parte da virulência durante a patogênese se deve às propriedades inseticidas desses metabólitos (TELLEZ-JURADO et al., 2009; VEY et al., 2001)

No processo de fermentação líquida em fermentadores, ocorre a produção de metabólitos, visto que os fungos, em geral, são classificados na microbiologia como “secretores” por produzirem grandes quantidades de metabólitos. Estudos sobre esses compostos produzidos pelos fungos entomopatogênicos, ainda são escassos. No entanto, dos compostos já descritos incluem-se enzimas de vários tipos e os metabólitos secundários depsipeptídeos (moléculas menores formadas por aminoácidos e hidroxiaácidos). Apesar de não ter sido definida a ação desses compostos sabe-se que eles auxiliam na dissolução da cutícula do inseto para indução da doença, supressão do sistema imunológico, interferência com os canais de íons e outras funções celulares do hospedeiro. Os depsipeptídeos mais conhecidos são as destruxinas e a bassianoide que causam efeitos tóxicos nos insetos. Entre os metabólitos secundários a beauvericina já foi isolada dos fungos *Beauveria bassiana*, *C. fumosorosea*, *Fusarium semirectum* e *F. moniforme* var. *subglutinans*, e do fitopatógeno *Polyporus sulphureus*, demonstrando efeitos citotóxicos e propriedades inseticidas em larvas de mosquitos e moscas varejeiras (LEITE, 2003).

Noronha et al., 2000 observou que o tipo de substrato utilizado no desenvolvimento de fungos pode induzir a produção de enzimas. Em estudos realizados por Murad et al., 2011 foi adicionado ao meio de cultura sólido em placa de Petri a cutícula de *Callosobruchus maculatus*, para cultivo dos fungos *Verticillium suchlasporium* e *Metarhizium anisopliae*; e no cultivo do fungo *V. suchlasporium* a presença da cutícula do inseto induziu a produção de serina-protease P32 e para fungo *M. anisopliae* induziu a produção de proteases e quitinases.

Apesar da escassez de dados sobre os compostos químicos produzidos pelos fungos entomopatogênicos, essas substâncias devem ser consideradas importantes no melhoramento da performance dos fungos sobre a ação nos insetos, bem como serem utilizadas no desenvolvimento de novas classes de produtos para controle de pragas (LEITE, 2003). Além disso, a capacidade de induzir a expressão de compostos utilizando diferentes substratos abre mais as possibilidades da utilização desses compostos no controle de pragas (FRANCO et al., 2011).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ISOLADO

Os isolados utilizados nos ensaios foram ESALQ 1296, de *Cordyceps fumosorosea*, ESALQ PL63 de *Beauveria bassiana* e ESALQ E9 de *Metarhizium anisopliae*, depositados no banco de entomopatógenos do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos – ESALQ-USP, Piracicaba/SP. Os isolados são ingredientes ativos produzidos e comercializados pela empresa Koppert do Brasil Holding; e *C. fumosorosea* é recomendado para controle do psilídeo-do-citros, *Diaphorina citri* e para a cigarrinha do milho *Dalbulus maidis*.

O fungo foi repicado em placas de Petri com Meio Completo (MC) para produção de conídios (ALVES et. al, 1998) e permaneceu por aproximadamente 7 dias em câmara BOD, à 25 ± 1 °C com fotofase de 12 horas. Após este período os conídios produzidos foram removidos da superfície do meio de cultura, com auxílio de espátula de metal e suspensos em água estéril com espalhante adesivo (Tween 80® - 0,1%). Para quantificar a concentração de conídios viáveis na suspensão, foi realizada análise de concentração e viabilidade dos conídios. A partir deste resultado foi possível calcular a quantidade de suspensão necessária para que os meios utilizados no ensaio recebessem a mesma dose de conídios de $2,0 \times 10^6$ /mL.

4.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Na etapa de cultivo líquido, o ensaio foi composto por quatro tratamentos cada um com três repetições (três fermentações):

Tratamento 1: Meio de cultura A - 10% fonte de nitrogênio A+ 40% fonte de carboidrato cultivado em biorreator de bancada.

Tratamento 2: Meio de cultura B - 10% fonte de nitrogênio A + 5% fonte de nitrogênio B + 40% fonte de carboidrato cultivado em biorreator de bancada.

Tratamento 3: Meio de cultura C - 10% fonte de nitrogênio A + 10% fonte de nitrogênio B + 40% fonte de carboidrato cultivado em biorreator de bancada.

Tratamento 4: Conídios aéreos produzidos a partir de cultivo sólido utilizando método bifásico, provenientes da produção da Koppert do Brasil Holding.

4.3. PREPARO E FERMENTAÇÃO DOS MEIOS LÍQUIDOS

Os meios foram preparados em frascos de vidros e autoclavados à 121°C por 30 minutos, os reatores foram cheios de água e autoclavados da mesma maneira que os meios. Após o resfriamento os respectivos meios de cultura foram transferidos aos reatores e após estabilização da temperatura o pH foi calibrado para 4,0 e depois adicionado uma concentração de $2,0 \times 10^6$ conídios/mL de inóculo de *C. fumosorosea* ao meio de cultura. Os meios de cultivo permaneceram nos reatores por 72 horas com os parâmetros de pH 4,0 e oxigenação de 25%. Os parâmetros de cultivo líquido foram determinados com base em estudos realizados pelo laboratório de microbiologia da Koppert na Holanda.

4.4. PARÂMETROS AVALIADOS

No decorrer dos ensaios, foram analisados os seguintes parâmetros: concentração de partículas infectivas através da contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) (descrita no item 4.4.1); avaliação de concentração de conídios e células infectivas em câmara de Neubauer (descrita no item 4.4.2); produção de biomassa (descrita no item 4.4.3); identificação da quantificação de metabólitos pelo método NMR e HPLC (descrita no item 4.4.4.) e análise de patogenicidade (descrita no item 4.4.5).

4.4.1. METODOLOGIA ANÁLISE – LEITURA DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA (UFC)

As análises de UFC foram avaliadas desde a inoculação (tempo zero), e em intervalos de 24 horas até período final de desenvolvimento (72 horas). Para avaliar as UFC primeiramente foi realizada uma diluição seriada das alíquotas retiradas em cada um dos tempos de cultivo; depois foi escolhida uma diluição de cada tratamento e 100µl dessa diluição foi pipetada em três placas de Petri contendo meio Batata Dextrose Ágar + Triton. As placas foram armazenadas em BOD a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotofase 12 horas por 5 dias ou até aparecimento da colônia. As colônias foram contabilizadas em contador de colônias e o número encontrado foi multiplicado pela diluição utilizada para expressar os valores em UFC/mL de meio de cultivo.

4.4.2. METODOLOGIA DE ANÁLISE DE CONCENTRAÇÃO EM NEUBAUER

Assim como para análise de UFC, na análise de concentração, foi realizada uma diluição seriada das amostras coletadas no tempo de 72 horas e, com auxílio de uma micropipeta foi transferida uma alíquota de aproximadamente 200µL da diluição escolhida na canaleta de uma câmara de Neubauer, já coberta com uma lamínula, até o preenchimento de todo o espaço existente entre a lamínula e a câmara.

A contagem de conídios foi realizada com auxílio de microscópio óptico, Marca Leica, Modelo DM500, em aumento de 400X nos campos 1 e 2 da câmara de Neubauer, nos cinco quadrados identificados como campo de contagem 3 (Figura 1), totalizando cinco contagens por campo.

A concentração de conídios e ou células infectivas/mL ou g foi calculada multiplicando a média obtida nas 10 contagens pelo fator de diluição $2,5 \times 10^5$.

Para as estruturas ou conídios que ficaram sobre as linhas das demarcações internas dos sub compartimentos, foram contados os que estiveram nas linhas da esquerda e superior do mesmo campo de observação.

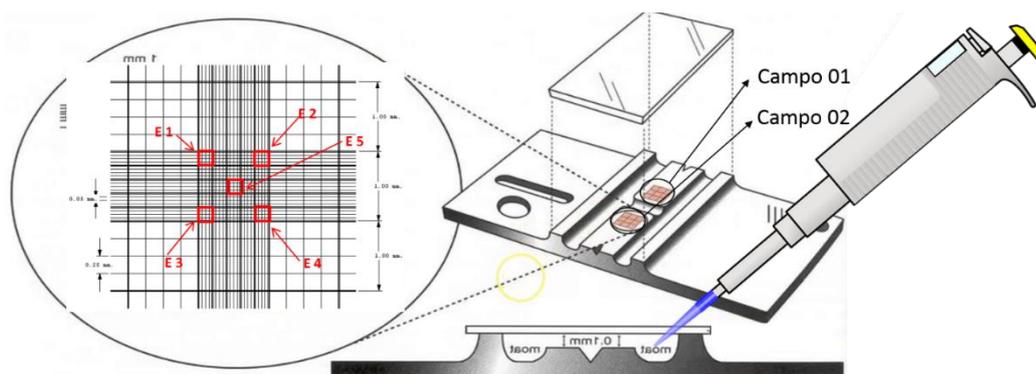


Figura 1 Câmara de Neubauer e demarcações dos campos observados durante a contagem

4.4.3. METODOLOGIA ANÁLISE – BIOMASSA

As amostras de biomassa foram coletadas em intervalos de 24 horas até período final de desenvolvimento (72 horas). Inicialmente um papel filtro foi pesado e 50 mL do meio de cultivo

em análise foi passado pelo filtro. O filtro com a parte filtrada do meio foi colocado em estufa de secagem a 40°C até que o mesmo atingisse massa constante. Após esse tempo, foi realizada nova pesagem para cálculo da produção de biomassa utilizando a seguinte equação:

$$\frac{\text{Peso Final} - \text{Peso Inicial}}{100} \times 1.000 = \text{Biomassa por litro}$$

4.4.4. METODOLOGIA ANÁLISE – METABÓLITOS

As análises de cromatografia e molecular foram executadas pela equipe da Dra. Simone Possidente de Lira, do grupo de Produtos Naturais e Microbiologia da ESALQ/USP, Piracicaba/SP, em colaboração com o grupo de Química Orgânica de Sistemas Biológicos do Instituto de Química da USP de São Carlos/SP.

4.4.4.1. (IQSC/USP). EXTRAÇÃO E ANÁLISE UPLC-ESPECTOFOTOMETRIA DE MASSAS

Os extratos brutos foram particionados com acetato de etila de acordo com Yahagi et al. (2020) e concentrado em vácuo. As frações orgânicas foram então ressuspensas em acetonitrila (ACN) na concentração de 1 mg/mL e, 10µL foram injetadas no equipamento Acquity UPLC H Class - Xevo G2-XS Qtof (Waters). A fase estacionária usada foi uma coluna Acquity UPLC BEH C18 (1,7 µm, 2,1 x 100 mm) e a fase móvel foi um perfil de gradiente de 10 a 100% ACN + 0,1% de ácido fórmico (FA) em H₂O + 0,1% FA (para 12 min), seguido por 100% ACN isocrático + 0,1% FA (por 3 min) e 5% ACN + 0,1% FA (3 min) fase de reequilíbrio, com uma taxa de fluxo de 400 µL / min. Os dados foram adquiridos da pesquisa MS1 ao longo de m/z 100 - 1500, com o tempo de varredura de 150 ms no modo de aquisição dependente de dados (DDA), e até cinco varreduras MS2 no modo CID foram adquiridas por ciclo (onde os 5 primeiros são mais abundantes Íons MS1 foram selecionados) com tempo de varredura de 100 ms. A pesquisa MS foi configurada para mudar para a aquisição MS2 quando o TIC subisse acima, e a aquisição MS2 voltaria para a pesquisa MS após terem decorrido 0,25 s. A energia de ionização foi ajustada em 1,2 Kv, os valores de m/z foram registrados no modo centróide e as detecções foram realizadas no modo positivo. Um padrão de beauvericina foi analisado com os mesmos parâmetros usados para as frações.

4.4.4.2. ANÁLISE MOLECULAR

Os arquivos de dados foram primeiro convertidos para o formato mzXML usando o software MSConvert (CHAMBERS et al., 2012) e depois visualizados com MZmine 2 (PLUSKAL et al., 2010). Os arquivos mzXML foram usados para criar uma rede molecular usando o fluxo de trabalho online no site do GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>) (WANG et al., 2016). Os dados foram filtrados removendo todos os íons do fragmento MS2 dentro de +/- 17 do precursor m / z. Os espectros de MS2 foram filtrados por janela escolhendo apenas os 6 íons do fragmento superior na janela +/- 50Da em todo o espectro. A tolerância de massa do íon precursor foi definida para 0,05 Da e uma tolerância do fragmento de íon MS2 de 0,05 Da. Uma rede foi então criada onde as bordas foram filtradas para ter uma pontuação de cosseno acima de 0,7 e mais de 6 picos correspondentes. Além disso, as bordas entre dois nós foram mantidas na rede, se e somente se, cada um dos nós apareceu nos respectivos 10 nós mais semelhantes. Finalmente, o tamanho máximo de uma família molecular foi definido como 100 e as bordas de pontuação mais baixas foram removidas das famílias moleculares até que o tamanho da família molecular estivesse abaixo desse limite. Os espectros na rede foram então pesquisados nas bibliotecas espectrais do GNPS. Os espectros da biblioteca foram filtrados da mesma maneira que os dados de entrada. Todas as correspondências mantidas entre os espectros da rede e os espectros da biblioteca deveriam ter uma pontuação acima de 0,6 e pelo menos 4 picos correspondentes.

4.4.5. ENSAIO DE PATOGENICIDADE

O teste de patogenicidade foi realizado em adultos, ninfas de 2º instar e ovos de *E. heros*, onde para os tratamentos provenientes da fermentação líquida (tratamentos 1, 2 e 3) o produto da fermentação foi utilizado de três maneiras diferentes.

1º Parte sólida + parte líquida: produto puro da fermentação líquida contendo células infectivas bem como os metabólitos e enzimas produzidas durante a fermentação;

2º Parte sólida: contendo apenas as células infectivas produzidas durante a fermentação;

3º Parte líquida: contendo apenas os metabólitos e enzimas produzidos no processo de fermentação;

Para fazer a separação da parte líquida e sólida proveniente da fermentação, foi retirada uma alíquota do fermentado de cada tratamento para submissão ao processo de centrifugação durante 10 minutos a 10.000 rpm. A parte sólida “precipitada” foi ressuspensa em água no mesmo volume do líquido sobrenadante que foi retirado. Dessa maneira o ensaio foi composto por 14 tratamentos conforme Tabela 1.

Tabela 1: Descrição dos tratamentos dos ensaios de Patogenicidade

Tratamento 01 - Meio A – Parte sólida + Parte líquida (produto puro)
Tratamento 02 - Meio A – Parte líquida
Tratamento 03 - Meio A – Parte sólida ressuspensa em água
Tratamento 04 - Meio B - Parte sólida + Parte líquida (produto puro)
Tratamento 05 - Meio B – Parte líquida
Tratamento 06 - Meio B – Parte sólida ressuspensa em água
Tratamento 07 - Meio C - Parte sólida + Parte líquida (produto puro)
Tratamento 08 - Meio C – Parte líquida
Tratamento 09 - Meio C – Parte sólida ressuspensa em água
Tratamento 10 – Suspensão de conídios de <i>Cordyceps fumosorosea</i> CEPA 1296 ESALQ
Tratamento 11 – Água
Tratamento 12 – Apenas o inseto
Tratamento 13 – Suspensão de conídios de <i>Beauveria bassiana</i> CEPA PL63 ESALQ
Tratamento 14 - Suspensão de conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i> CEPA E9 ESALQ

Os tratamentos (sólido e sólido + líquido) foram calibrados para que cada 1,0 mL de calda estivesse na concentração de $1,0 \times 10^8$ células infectivas. Essa padronização das caldas foi realizada conforme concentração de partículas infectivas encontradas nas análises realizadas em câmara de Neubauer. Para os tratamentos onde foi utilizado apenas a parte líquida da fermentação não foi realizada nenhuma diluição.

Após a calibração, foi pulverizado 1,0 mL de cada suspensão em 12 ovos, 12 ninfas de 2º instar e 12 adultos de *E. heros* com auxílio de Torre de Potter com pressão de 14 bar. Após a aplicação os insetos adultos foram individualizados em placas de Petri 60x15mm contendo dieta artificial e água, as ninfas foram transferidas para placas de Petri 90x15mm contendo dieta artificial e água e os ovos foram transferidos para placa de Petri 60x15mm contendo apenas água. Todas as fases do inseto foram mantidas em câmara incubadora tipo BOD climatizada à temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas.

A avaliação da eficácia dos agentes de controle frente às diferentes fases do inseto testado foi realizada no décimo oitavo dia após a pulverização, onde foi observada a colonização dos insetos

pelo agente utilizado. Para o crescimento dos fungos nos insetos, os mesmos foram colocados em câmara úmida composta por placa de Petri com algodão umedecido com água estéril.

Para cada batelada “fermentação” foi realizado um ensaio de patogenicidade totalizando 36 insetos para cada tratamento.

5. ANÁLISE COMPARATIVA DE CUSTO DE PRODUÇÃO DE MEIO DE CULTURA E DE MÃO DE OBRA

Para avaliar o custo de produção dos métodos de cultivo sólido e de cultivo líquido foi realizado um levantamento do custo do substrato utilizado para cada um dos processos e a mão de obra necessária para produção do mesmo volume de substrato (Tabelas 2 e 3). Não foram considerados o custo de investimento em estrutura física bem como não foi considerado o custo do produto final, uma vez que há necessidade de diversos testes e estudos para identificar o melhor tratamento pós cultivo para os produtos provenientes de cultivo líquido, desde sua extração até a formulação do produto.

Tabela 2: Custo da mão de obra para produção de 2.000 Kg de cultivo sólido (grãos de arroz) e de 2.000 L de cultivo líquido do fungo entomopatogênico *Cordyceps fumosorosea*

	Tipo de cultivo			
	Líquido		Sólido	
	Quantidade	Salário	Quantidade	Salário
Mão de obra especializada	1	R\$ 2.500,00	1	R\$ 2.500,00
Mão de obra produção	1	R\$ 1.700,00	7	R\$ 1.700,00
Total	2	R\$ 4.200,00	8	R\$ 14.400,00

Tabela 3: Custo de 2.000 Kg de cultivo sólido (arroz), de 2.000 L de cultivo líquido (meios A, B e C), custo de mão de obra para produção de 2.000 Kg/L de cada tipo de cultivo e custo final para produção de cada cultivo de *Cordyceps fumosorosea* levando em consideração o custo de mão de obra

	Insumos meio (2.000 Kg ou L)	Custo Mão de Obra	Custo total de Produção 2.000 Kg ou L
Meio A	R\$ 2.676,20	R\$ 4.200,00	R\$ 6.876,20
Meio B	R\$ 3.476,20	R\$ 4.200,00	R\$ 7.676,20
Meio C	R\$ 4.276,20	R\$ 4.200,00	R\$ 8.476,20
Sólido	R\$ 8.739,91	R\$14.400,00	R\$ 23.139,91

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os ensaios da etapa de cultivo Biomassa (três repetições por tempo de cultivo), UFC (nove repetições por tempo de cultivo) e Concentração (trinta contagens por batelada), foram elaborados em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) e para execução das análises foi utilizado o programa SISVAR (Versão 5.3). Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F a 1% de probabilidade e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Para os ensaios de patogenicidade (porcentagem de insetos colonizados nas diferentes fases de desenvolvimento), modelos de análise e variância foram feitas por meio do teste de Tukey ($P=0,05$). Modelos lineares generalizados do tipo quase-binomial foram ajustados aos dados de colonização de ovo-ninfa (ninfas tratadas na fase de ovo) enquanto que para dados de colonização de ninfas e adultos foi utilizado um modelo linear generalizado do tipo binomial. Comparações múltiplas foram feitas obtendo-se os intervalos de confiança de 95% para os preditores lineares.

7. RESULTADOS

7.1. CONCENTRAÇÃO DE CONÍDIOS SUBMERSOS/BLASTOSPOROS

Após 72 horas de fermentação foi avaliada a concentração de células infectivas (conídios submersos e blastosporos) para os três meios de cultura testados (Meio A, B e C) nos três ensaios realizados em períodos distintos (Ensaio 01, 02 e 03). Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4: Concentração média de conídios submersos/blastosporos de *Cordyceps fumosorosea* ($\times 10^8$) produzidos ao final de 72 horas de cultivo para os meios de cultura testados nos três bioensaios realizados.

Tratamentos	Ensaio 01 ⁽¹⁾	Ensaio 02 ⁽¹⁾	Ensaio 03 ⁽²⁾
Meio A	6,00 \pm 0,307 c	12,75 \pm 1,367 a	8,25 \pm 1,239 b
Meio B	9,98 \pm 0,512 a	14,00 \pm 1,716 a	7,00 \pm 1,106 b
Meio C	7,78 \pm 0,427 b	15,50 \pm 1,740 a	15,25 \pm 1,953 a
CV%	16,39%	36,78%	24,05%
Teste F	23,540*	0,707 ^{n.s.}	6,995*

⁽¹⁾Médias originais seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

⁽²⁾ Dados transformados por $\sqrt{x+0,5}$ na análise e dados originais na tabela. *Significativo a 5% de probabilidade. ^{n.s.}- Não significativo. CV- Coeficiente de Variação

Conforme apresentado na Tabela 4, observou-se que não houve uma repetição fiel dos resultados para os meios nos três ensaios realizados. No primeiro ensaio, todos os tratamentos se diferenciaram sendo que o meio de cultura B que recebeu 5% de fonte de nitrogênio B foi o que mais produziu células, enquanto o meio de cultura A que recebeu apenas fonte de proteína A produziu menos células que o restante dos tratamentos. No segundo ensaio, apesar de não

apresentar diferença estatística, o meio de cultura que menos produziu foi o A assim com observado no ensaio 1; já no terceiro ensaio observa-se uma diferença estatística destacando o meio C como o mais produtivo, observa-se também que o resultado de concentração obtido para o mesmo meio no ensaio 2 foi muito semelhante.

Conforme descrito na Tabela 5, na média geral dos três ensaios, observou-se que não houve diferença estatística na produção de células infectivas para os meios de cultura testados e, que independente da presença e da concentração de uma segunda fonte de proteína não houve diferença estatística na produção de células infectivas. Entretanto, nota-se uma tendência em maior produção de células quanto maior a concentração da segunda fonte de proteína uma vez 0%, 5% e 10% da fonte de proteína B produziu 9,02; 10,33 e 12,83 x 10⁸ células/mL de meio de cultura (A, B e C).

Tabela 5: Concentração média das células infectivas de *Cordyceps fumosorosea* (blastosporos/conídios submersos), obtida de 3 ensaios, após 72 horas de cultivo para os três meios de cultura distintos.

Tratamentos	Concentração de conídios submersos/blastosporos por mL (x10 ⁸) ⁽¹⁾
Meio A	9,02 ± 1,095 A
Meio B	10,33 ± 1,111 A
Meio C	12,83 ± 1,392 A
CV%	28,76%
Teste F	1,115 n.s.

⁽¹⁾Médias originais seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. n.s.- Não significativo. CV- Coeficiente de Variação.

7.2. BIOMASSA

A produção de biomassa foi aferida em intervalos de 24 horas desde o início da fermentação até a última aferição de 72 horas.

Tabela 6: Média de biomassa (g/L) de *Cordyceps fumosorosea* produzida nos três meios de cultura durante as 72 horas de cultivo, coletada e avaliada em intervalos de 24 horas após a inoculação e antes do início do cultivo.

	0 horas ⁽¹⁾	24 horas ⁽¹⁾	48 horas ⁽¹⁾	72 horas ⁽¹⁾
Meio A	34,58 ± 8,057 a	34,03 ± 6,122 a	35,63 ± 6,727 a	42,53 ± 7,638 a
Meio B	33,08 ± 4,725 a	37,07 ± 7,963 a	36,07 ± 6,061 a	36,79 ± 2,309 a
Meio C	36,63 ± 3,536 a	38,82 ± 2,281 a	28,66 ± 4,597 a	28,13 ± 6,410 a
CV%	12,31%	20,10%	14,14%	15,38%
Teste F	0,520 n.s.	0,325 n.s.	2,319 n.s.	5,193 n.s.

⁽¹⁾Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; n.s.- Não significativo; CV – Coeficiente de Variação

A produção de biomassa, conforme demonstrado na Tabela 6, não apresentou diferença estatística para os diferentes meios de cultura nos tempos avaliados. Já comparando a produção de biomassa em função do tempo para o mesmo meio de cultura (Figura 2), nota-se que o meio de cultura A foi o único que apresentou uma curva de crescimento, enquanto o meio B após 24 horas de fermentação estacionou e 36/37g de biomassa por litro de meio até o final do processo produtivo, já o meio C teve aumento da biomassa nas primeiras 24 horas e depois perdeu massa e se manteve nos últimos dois dias de cultivo com 28g.

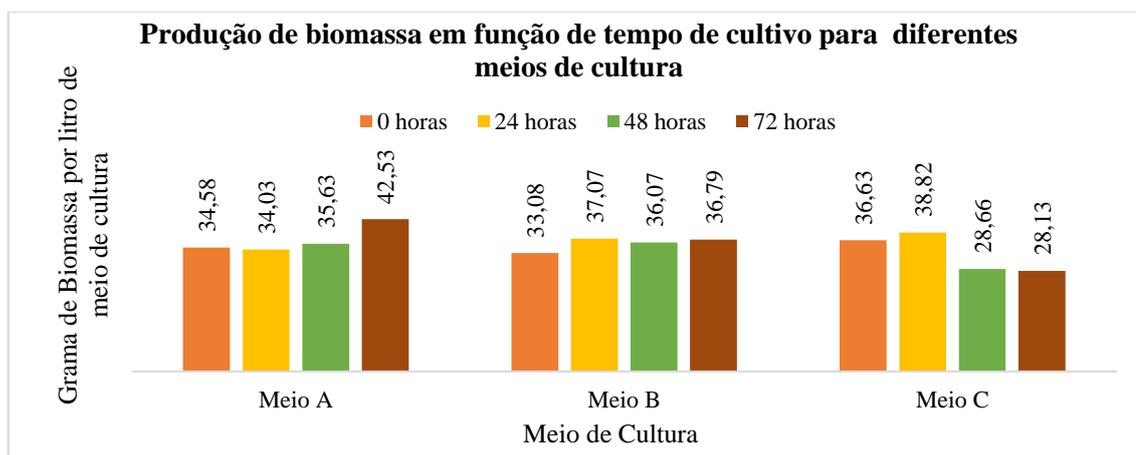


Figura 2: Média de produção de biomassa (g/L de meio) de *Cordyceps fumosorosea*, coletada em três ensaios, avaliada em intervalos de 24 horas partir do tempo zero do processo de cultivo líquido.

7.3. UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA (UFC)

As UFCs (Unidades Formadoras de Colônia) foram avaliadas nos mesmos intervalos em que foram avaliadas a produção de biomassa, ou seja, a cada 24 horas desde a inoculação (0, 24, 48 e 72 horas).

Tabela 7: Média de Unidades Formadoras de Colônia de *Cordyceps fumosorosea* mantidas em incubadora à $27 \pm 1^\circ\text{C}$ por 6 dias, coletadas em intervalos de 24 horas no decorrer do processo nos três meios de cultura avaliados.

	0 horas (10^4) ⁽¹⁾	24 horas (10^4) ⁽¹⁾	48 horas (10^6) ⁽¹⁾	72 horas (10^6) ⁽¹⁾
Meio A	50,00 ± 4,441 b	110,33 ± 11,906 a	45,50 ± 6,464 a	436,67 ± 14,981 a
Meio B	62,22 ± 8,861 a b	42,444 ± 11,601 b	39,17 ± 5,516 a	440,67 ± 32,405 a
Meio C	73,33 ± 9,363 a	27,89 ± 6,518 b	49,67 ± 1,926 a	270,00 ± 16,533 B
CV%	24,63%	28,85%	21,71%	14,66%
Teste F	5,284*	57,723*	1,774 ^{n.s.}	18,103*

⁽¹⁾Médias originais seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. *Significativo a 5% de probabilidade. ^{n.s.}- Não significativo. CV- Coeficiente de Variação

Conforme pode ser observado na Tabela 7 no tempo zero de avaliação o meio C foi o que iniciou com uma concentração maior de UFCs/mL porém não se diferenciou do meio B e esse por sua vez não diferenciou do meio A, entretanto o meio A se diferenciou do C inicialmente. No decorrer no desenvolvimento nota-se que o meio A que inicialmente teve uma concentração menor de UFC terminou o processo com um dos valores mais altos não diferindo do meio B assim como observado no tempo zero. Entretanto o meio C que iniciou com uma maior concentração, no final do processo apresentou menor valor apresentando diferença estatística dos resultados verificados pelos meios A e B. Na Figura 3, foi possível observar que os meios de cultura B e C que receberam a fonte de nitrogênio B tiveram uma queda na concentração de UFCs nas primeiras 24 horas de cultivo e após 24 horas de cultivo ambos os meios apresentaram uma curva de crescimento semelhante. Para o meio A, em todos os tempos avaliados houve crescimento do fungo.

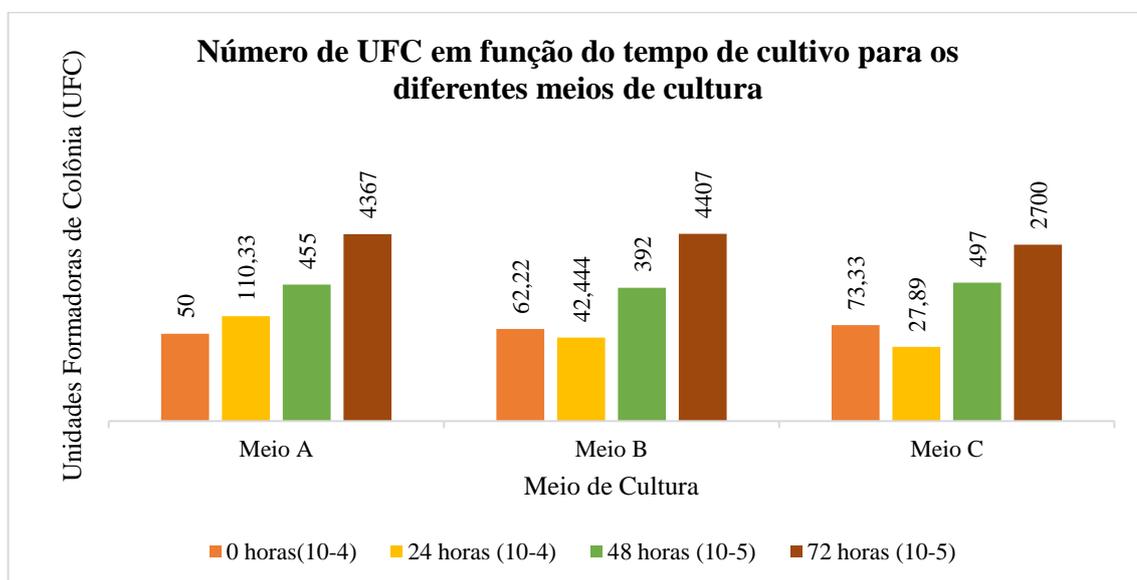


Figura 3: Média de três ensaios realizados para determinação das Unidades Formadoras de Colônia com amostras coletadas em quatro tempos distintos durante o processo de cultivo líquido do fungo entomopatogênico *Cordyceps fumosorosea*.

7.4. METABÓLITOS

As amostras dos diferentes meios de cultivo foram analisadas em duplicata em equipamento de HPLC e também foi avaliado o meio de cultura antes do processo fermentativo, denominado de branco, bem como foi avaliado o padrão beauvericina. Nas Figuras 4, 5 e 6 podem ser observados o padrão das curvas obtidas para os brancos, a beauvericina e as duas réplicas dos meios depois do processo de fermentação.

Conforme ilustrado nas Figuras 4, 5 e 6, independente do meio de cultura utilizado verificou se que durante o processo de desenvolvimento do fungo não houve a produção do metabólito

beauvericina. Entretanto, foi possível observar que existem alguns picos nas análises o que sugere a presença de outro metabólito.

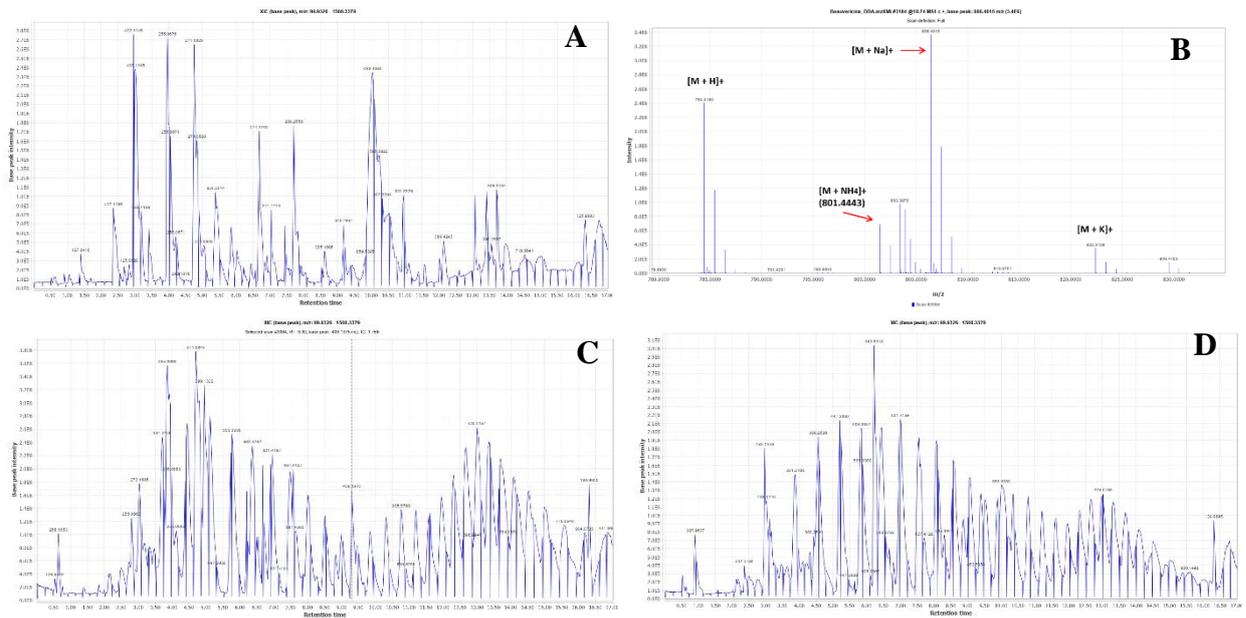


Figura 5: Gráficos de análise em HPLC para Meio A (A- Branco; B-Padrão; C-1ªRepetição; D- 2ªRepetição)

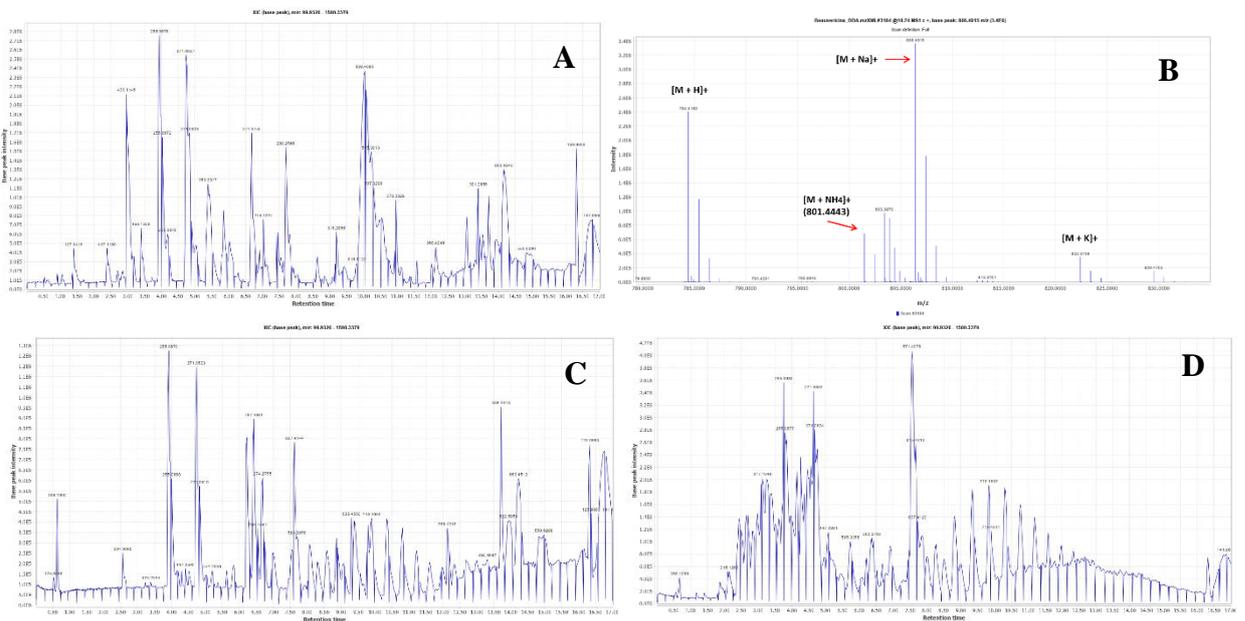


Figura 4: Gráficos de análise em HPLC para Meio B (A- Branco; B-Padrão; C-1ªRepetição; D- 2ªRepetição)

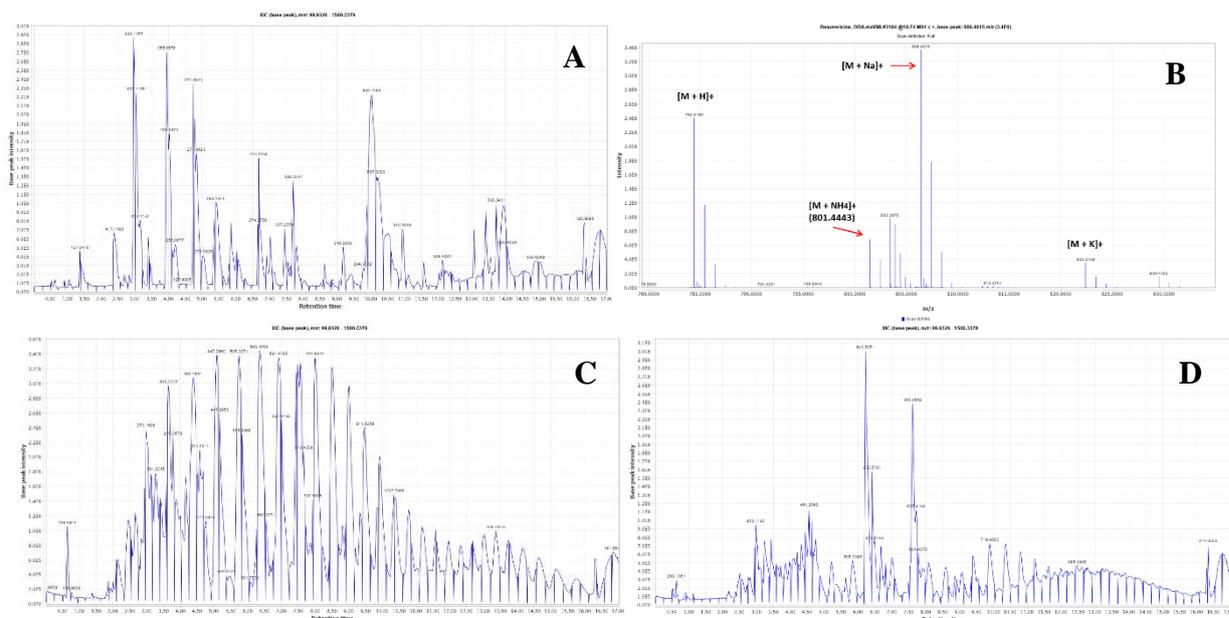


Figura 6: Gráficos de análise em HPLC para Meio C (A- Branco; B-Padrão; C-1ªRepetição; D- 2ªRepetição)

Na análise molecular onde foi avaliada apenas uma repetição de cada meio de cultivo após o processo fermentativo, não foi encontrada similaridade da estrutura da beauvericina nas amostras analisadas. A similaridade foi encontrada apenas no “padrão” utilizado pelo laboratório, com pode ser observado na Figura 7 indicando a ausência do metabólito “padrão – beauvericina” nos meios de cultivos estudados.

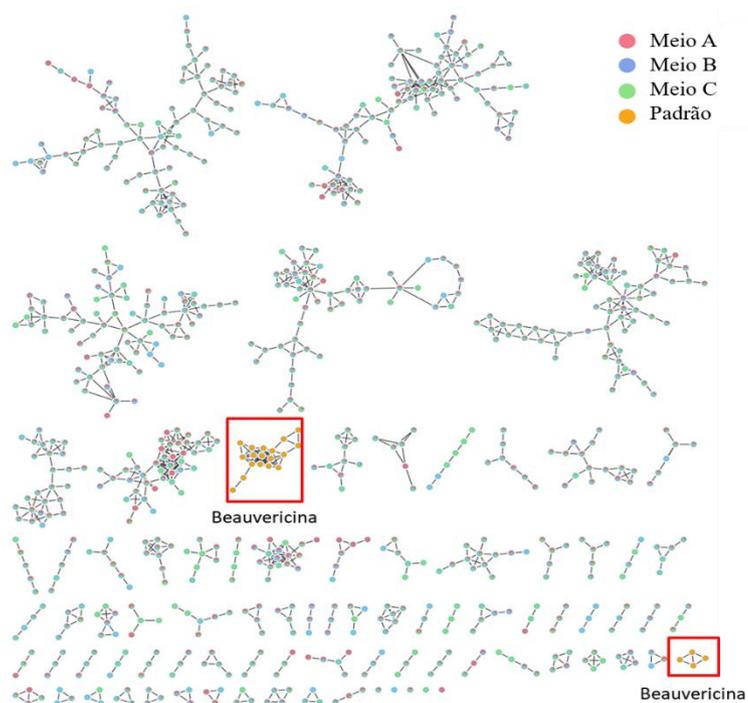


Figura 7:Análise molecular para detecção de beauvericina

7.5. PATOGENICIDADE

A colonização dos insetos pelos fungos entomopatogênicos estudados apresentou grande variação quando aplicados nas diferentes fases do inseto (Tabela 8)

Tabela 8: Percevejos (%) *Euschistus heros* colonizados por fungos entomopatogênicos, 18 dias após aplicação e metabólitos, para cada um dos tratamentos analisados e para cada fase de desenvolvimento avaliada (Incubação em B.O.D, temperatura $25\pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas).

Tratamentos	Adulto ⁽¹⁾	Ninfa ⁽¹⁾	Ovo ⁽¹⁾
Inseto	0,0±0,000	a 8,3±1,000	a 0,0±0,000
Água	8,3±0,577	a 11,1±1,333	a 4,2±0,333
Esporo <i>C. fumosorosea</i> (1296)	13,9±0,882	a 13,9±1,667	a 0,0±0,000
Meio A - parte líquida	2,8±0,333	a 16,7±2,000	a 16,7±0,333
Meio A - parte sólida	5,6±0,333	a 16,7±1,528	a 20,8±0,667
Meio A - parte líquida+sólida	16,7±1,000	a 19,4±1,453	a 95,8±0,333
Meio B - parte líquida	0,0±0,000	a 0,0±0,000	a 29,2±0,333
Meio B - parte sólida	5,6±0,333	a 11,1±1,333	a 0,0±0,000
Meio B - parte líquida+sólida	8,3±0,000	a 13,9±0,333	a 40,0±0,333
Meio C - parte líquida	0,0±0,000	a 19,4±1,453	a 36,4±0,667
Meio C - parte sólida	19,4±0,882	a 5,6±0,667	a 29,2±0,333
Meio C - parte líquida+sólida	16,7±1,000	a 2,8±0,333	a 22,7±0,333
Esporo <i>B. bassiana</i> (PL63)	5,6±0,333	a 33,3±1,732	a 25,0±0,577
Esporo <i>M. anisopliae</i> (E9)	0,0±0,000	a 8,3±0,577	a 0,0±0,000
Teste F	0,245	0,186	22,259
Df	28	28	28
P	=0,997	=0,999	≤0,05

⁽¹⁾Médias originais seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, Df: graus de liberdade

Conforme demonstrado na Tabela 8, nos tratamentos onde foram aplicados os produtos nas fases de adulto e ninfa, as porcentagens de colonização não apresentaram diferença estatística e atingiram valores de colonização inferiores à 20%. Entretanto o tratamento onde os produtos foram aplicados na fase de ovo com avaliação realizada na fase de ninfa, a colonização das ninfas eclodidas apresentou diferença estatística entre os tratamentos. O meio de cultura A, proporcionou 95% de colonização quando foi aplicada a parte líquida junto com a parte sólida. Em contrapartida os outros tratamentos com o mesmo meio, onde foram aplicadas as partes sólidas e líquida separadas, não apresentaram uma alta taxa de controle, sugerindo que a sinergia das duas “partes” foram importantes para que o controle ocorresse em 95% das ninfas.

7.6. CUSTO DE PRODUÇÃO

Foi avaliado em câmara de Neubauer a quantidade de células infectivas produzidas por mL de meio de cultivo líquido após 72 horas de cultivo (último dia de cultivo) e em grama de meio de cultivo sólido após 8 dias (último dia de cultivo – método de produção Koppert). Para determinar o custo de produção de cada um dos métodos/meio de cultivo foi avaliado o custo de substrato e de mão de obra necessária para produção de 2.000 Kg ou Litros de substrato.

Tabela 9: Concentração média de estruturas infectivas ($\times 10^8$) determinadas em câmara de Neubauer produzidas ao final do cultivo para os meios de cultura A, B e C (conídios submersos/blastosporos) e para o método produtivo Koppert em arroz (conídio aéreo) em três bioensaios realizados.

	Ensaio 01 ⁽¹⁾		Ensaio 02 ⁽¹⁾		Ensaio 03 ⁽²⁾		Média ⁽¹⁾
Meio A	6,00 ± 0,307	b	12,75 ± 1,367	a	8,25 ± 1,239	b	9,02 ± 1,095 a
Meio B	9,98 ± 0,512	a	14,00 ± 1,716	a	7,00 ± 1,106	b	10,33 ± 1,111 a
Meio C	7,78 ± 0,427	b	15,50 ± 1,740	a	15,25 ± 1,953	a	12,83 ± 1,392 a
Esporo	10,50 ± 0,726	a	11,50 ± 0,764	a	17,25 ± 0,583	a	13,10 ± 1,161 a
CV%	19,65%		33,43%		18,95%		28,76%
Teste F	15,233*		1,453 ^{n.s.}		12,538*		1,115 ^{n.s.}

⁽¹⁾Médias originais seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ⁽²⁾ Dados transformados por $\sqrt{x+0,5}$ na análise e dados originais na tabela. *Significativo a 5% de probabilidade. ^{n.s.}- Não significativo. CV- Coeficiente de Variação

Conforme pode ser observado na Tabela 9 a concentração de células infectivas no final do processo apresentou diferença estatística nos ensaios 01 e 03, entretanto, no ensaio 02 e na média dos 3 ensaios, não houve diferença estatística na concentração de células infectivas produzidas ao final do processo. Mesmo nos ensaios que apresentaram diferença estatística, observa-se que o meio de cultivo arroz não houve diferença estatística com pelo menos um dos tratamentos com os meios de cultivo líquidos avaliados.

Tabela 10: Custo de produção e concentração de células infectivas (conídios aéreos-arroz e blastosporos/conídios submersos-Meios A, B e C) para cada um dos meios de cultivo em seu respectivo tempo de produção.

Meio de cultivo	Custo total de produção 2.000 Kg/L	Concentração de células por mL/g ($\times 10^{-8}$) ⁽¹⁾	Tempo de produção
Meio A	R\$ 6.876,20	9,02 ± 1,095 a	3 dias
Meio B	R\$ 7.676,20	10,33 ± 1,111 a	3 dias
Meio C	R\$ 8.476,20	12,83 ± 1,392 a	3 dias
Arroz	R\$ 23.139,91	13,10 ± 1,161 a	8 dias
CV%	NA	28,76%	NA
Teste F	NA	1,115 ^{n.s.}	NA

⁽¹⁾Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; ^{n.s.}- Não significativo. CV – Coeficiente de Variação. NA- Não Aplicável

Para a construção do custo de produção foi considerando apenas o custo de matéria-prima e de mão de obra do processo produtivo, visto que o trabalho não contemplou a forma de extração dessas células. Dessa forma não foi possível avaliar a estrutura necessária para a construção de uma planta à produção de *C. fumosorosea* em cultivo líquido. Conforme demonstrado na Tabela 10, o custo para produção de 2000 Kg de substrato sólido foi 3x maior em relação à produção de 2000 L de substrato líquido seja para os meios A, B ou C e ambos não diferiram estatisticamente na concentração células infectivas produzidas no final do seu processo de desenvolvimento. Outro ponto importante foi o tempo que ambos os meios de cultivos levaram para chegar na concentração média de $1,13 \times 10^9$ células por g ou mL de meio de cultivo. Os meios de cultivo A, B e C, provenientes da fermentação líquida levaram 3 dias para atingir essa concentração; ao passo que na fermentação sólida em arroz, o tempo foi de 8 dias para atingir a mesma concentração.

8. DISCUSSÃO

Mascarin 2015, encontrou concentrações de $1,2 \times 10^{12}$ blastosporos/L após 72 horas de cultivo, quando utilizou meios de líquidos para o crescimento de *C. fumosorosea*. Esse resultado corroborou com os resultados obtidos neste trabalho uma vez que o meio de cultura C apresentou $1,2 \times 10^{12}$ blastosporos/L de meio de cultura, ao final do mesmo período. Apesar de ter sido observada nos outros meios uma quantidade menor produzida de blastosporos estatisticamente eles não apresentaram diferença. Desta forma, ambos os meios de cultura testados apresentaram resultados muito semelhantes aos observados por Mascarin 2015.

Uma das grandes dificuldades do cultivo em meio sólido é o controle de fatores ambientais como, temperatura, pH e umidade durante a fermentação (DEY et al., 2018), fatores que podem ser controlados em cultivo líquido, entretanto, no cultivo líquido a concentração de nutrientes e substrato se torna de extrema importância pois pode ocorrer a diluição em água dos componentes; desta forma, faz se necessário garantir as quantidades mínimas exigidas para o desenvolvimento de cada microrganismo (DEY et al., 2018; IRFAN et al., 2019). Não foi observada queda na produtividade de células infectivas em ambos os meios de cultura líquidos utilizados quando comparado ao substrato sólido o que indica uma nutrição similar, além disso o cultivo líquido oferece aos microrganismos um controle maior dos fatores ambientais, tornando o processo de cultivo líquido uma excelente alternativa no cultivo de *C. fumosorosea*.

Ottati-de-Lima, 2007, observou que para os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* os melhores meios para produção de blastosporos foram os constituídos por uma menor concentração de nitrogênio e maior concentração de carbono. O mesmo foi observado por Oliveira, 2000 e Sano,

2005 para produção de *Sporothrix insectorum* e *M. anisopliae*. Entretanto para o fungo *C. fumosorosea*, Jackson et. al 1997, não observou efeito significativo na produção de células infectivas em diferentes relações de carbono e nitrogênio corroborando com os resultados obtidos nesse trabalho onde a maior concentração de fonte de nitrogênio não interferiu na produção de células infectivas quando comparado ao tratamento que recebeu menos concentração de nitrogênio; porém no que se diz respeito ao ensaio de patogenicidade o tratamento que recebeu a menor dose de nitrogênio apresentou maior eficácia no tratamento onde foi aplicado o produto puro da fermentação (células e metabólitos) em ovos de *E. heros*.

Segundo Alves 1988, a produção de metabólitos é comum nos fungos entomopatogênicos sendo um dos mais comuns, a beauvericina. Entretanto, a presença deste metabólito não foi detectada pela análise de cromatografia e nem através de análise molecular. Nas análises de cromatografia pôde ser observada a presença de outros picos, o que indica a presença de algum outro composto não avaliado. Existem mais de setenta metabólitos secundários identificados e isolados de *C. fumosorosea* e *Isaria farinosa* como micotoxinas NRP-peptídeo não ribossômico (beauvericina e beauverolídeos), terpenos (vários tricocaranos e fumosorinona), compostos de lactona (vários cefarosporolídeos) e ácidos (ácido diplicolínico e ácido oxálico). As bioatividades e os mecanismos de ação desses metabólitos ainda não foram bem estudados (WENG et.al, 2016).

Diferentes cepas de *Beauveria bassiana* foram cultivadas em caldo batata e foi avaliado a presença do gene responsável pela produção de beauvericina e bassianolida, bem como foi avaliado a produção dos metabólitos e, apesar de apresentarem os genes a produção dos metabólitos não foram detectadas nas condições do ensaio (ROSA-GARCIA et. al, 2020).

Em ensaios realizados por Gotti, 2016 foi observado que o uso de diferentes meios de cultura para crescimento de *Metarhizium anisopliae* não interferiram em sua patogenicidade frente à cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata*, sendo o mesmo observado para os diferentes meios de cultivos de *C. fumosorosea* frente a adultos e ninfas de *E. heros*. Daniel, 2016 não observou a eficácia para *E. heros* quando utilizou os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* corroborando com os resultados obtidos nos ensaios com ninfas e adultos onde foram observadas baixa ou nenhuma taxa de mortalidade. Entretanto Santos et. al., 2020, em ensaios realizados em laboratório, observou mortalidade acima de 50% em adultos de *E. heros* utilizando os fungos *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *C. fumosorosea* onde a taxa de mortalidade chegou à 90% quando os três fungos foram aplicados em conjunto, o que corrobora com os resultados de alta eficiência no controle de ninfas recém-eclodidas quando foram aplicados os metabólitos e as células infectivas em conjunto.

Rustiguel et al, 2012 avaliou a produção de quitinase em cultivos sólidos contendo crisálida para diferentes isolados de *M. anisopliae* e observou que a maior produção de quitinase não resultou no melhor resultado de eficácia frente à *D. saccharalis*, indicando que outros fatores influenciaram na infecção do alvo, corroborando com os resultados obtidos onde não foi detectado a presença do metabólito beauvericina entretanto a infecção de ninfas recém-eclodidas foi maior quando utilizado as células infectivas e a parte líquida do fermentado indicando que algum outro fator influenciou na infecção do alvo.

A colonização das ninfas que eclodiram dos ovos tratados com os patógenos sugere que houve uma transmissão vertical do mesmo, ou seja, a doença foi passada de um estágio para o outro, onde a ação do microrganismo foi observada em fase de desenvolvimento diferente da fase em que o mesmo foi aplicado (VALADARES-INGLIS et. al, 2020). O desencadeamento de doenças em populações de insetos está relacionado a fatores interdependentes como densidade e distribuição espacial do hospedeiro e do patógeno, além dos aspectos intrínsecos relacionados ao mesmo (infectividade, virulência e capacidade de sobrevivência) e condições do ambiente (ROSSI, 2002). A incidência dessas infecções é geralmente baixa (MOSCARDI et al. 1988) e a ocorrência de epizootias naturais com alta prevalência é restrita a condições de casa de vegetação (SOSA-GÓMEZ et al. 1997).

Estudos têm sido realizados com o objetivo de determinar os efeitos da infecção fúngica em populações de percevejos de laboratório. Os resultados desses estudos demonstraram que altas concentrações de conídios são necessárias para atingir um índice de mortalidade satisfatório (MOSCARDI et al. 1985; SOSA-GÓMEZ et al. 1997; SOSA-GÓMEZ et al. 1998). As diferentes espécies pertencentes ao complexo soja-percevejo exibem vários níveis de suscetibilidade a fungos entomopatogênicos, e algumas são inerentemente tolerantes à infecção por tais fungos (SOSA-GÓMEZ et al. 1997). Pouco se sabe sobre os mecanismos de tolerância dos percevejos a fungos e as possíveis formas de interferir em sua suscetibilidade a esses organismos. Considerando a variedade de estratégias de defesa antimicrobiana dos insetos, sua resistência às infecções fúngicas pode ter várias causas, como estruturas de tegumento particulares, a presença de antifúngicos compostos na camada cutícula superficial do exoesqueleto (ORTIZ-URQUIZA et al. 2013) e reações humorais ou de defesa celular podem aumentar a resistência dos insetos a infecções fúngicas (VILCINSKAS et al. 1999).

Em se tratando de meio de cultura, uma das principais características desejáveis é que o mesmo apresente alta produção de células por grama ou mL de substrato bem como seu custo seja o menor possível (ADAMEK, 1965; GOETTEL, 1984); nesse sentido os meios de cultura líquidos testados apresentaram uma economia significativa em relação ao meio sólido gerando economia na

produção do microrganismo conforme demonstrado na Tabela 11. Dessa maneira os resultados obtidos por Gotti 2016 onde a produção de *Metarhizium anisopliae* foi economicamente viável tanto por fermentação líquida quanto pelo método convencional sólido em arroz corroboram com os resultados obtidos para *C. fumosorosea*.

Tabela 11: Custo dos insumos para produção de *Cordyceps fumosorosea* em meio de cultivo líquido e sólido, redução de custo e porcentagem de economia dos meios líquidos em relação ao sólido.

	Insumos meio (2.000 Kg ou L)	Redução de custo em relação ao meio sólido	Economia (Porcentagem)
Meio A	R\$ 2.676,20	6.063,71	69%
Meio B	R\$ 3.476,20	5.263,71	60%
Meio C	R\$ 4.276,20	4.012,71	51%
Sólido (arroz)	R\$ 8.739,91	-	-

Além do custo do meio de cultura líquido ser mais baixo que o cultivo sólido, segundo Ottati-de-Lima (2007) esse método oferece grandes vantagens principalmente para aplicação em campo, uma vez que o produto já está pronto para uso diminuindo gastos com mão de obra e extração do material produzido se comparado ao substrato sólido (arroz). Ainda pode ser destacada a redução da mão de obra na etapa de formulação do produto, além da produção de um mesmo volume de substrato líquido pode ser realizado com uma quantidade muito menor de mão de obra em relação ao mesmo volume de substrato sólido (arroz), conforme representado na Tabela 2.

9. CONCLUSÕES

A quantidade de células infectivas independentemente do método de cultivo e da composição do meio foi a mesma produzida ao final do processo;

O tempo para produção da mesma quantidade de células infectivas em cultivo líquido é de 3 dias enquanto no cultivo sólido é de 8 dias;

Apesar de não ter sido detectada a presença de beauvericina ocorre a produção de um ou mais metabólitos no meio de cultura A.

O meio de cultura A aplicado contendo tanto células infectivas quanto seus metabólitos, é eficaz no controle de ninfas recém eclodidas de *E. heros* infectadas por transmissão vertical.

O custo para a produção da mesma quantidade de cultivo sólido é três vezes maior se comparado ao cultivo líquido;

O meio de cultura A pode ser considerado um potencial produto para controle de *E. heros*, conferindo economia na produção do microrganismo.

10. REFERÊNCIAS

ADAMEK, L. Submerge cultivation of the fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.). Folia Microbiologic, Prague, n. 10, p. 255-267, 1965.

AGROFIT. 2003. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em 05 de fevereiro de 2020.

ALVES, S. B. Controle microbiano de insetos. 2. ed. Piracicaba, SP: FEALQ, 1998. 1163 p. (Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz; v.4).

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Projeções do Agronegócio :Brasil 2012/2013 a 2022/2023 / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Gestão Estratégica. – Brasília: Mapa/ACS, 2013.

BUENO, A. F. et al. In: Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga; Hoffmann Campo, C. B., Corrêa-Ferreira, B. S., and Moscardi, F., Eds.; Brasília - DF: Embrapa, 2012.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. Boletim da safra de Grãos. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>> Acesso em: 15 jan. 2020

CHAMBERS, M. et al. A Cross-platform Toolkit for Mass Spectrometry and Proteomics. Nature biotechnology, v. 30, n. 10, p. 918–920, 2012.

CORRÊA-FERREIRA, Beatriz Spalding; PANIZZI, Antônio Ricardo. Percevejos da soja e seu manejo. Londrina: Centro Nacional de Pesquisa da Soja, 1999. EMBRAPA-CNPSO. Circular Técnica, 24. ISSN: 0100-6703.

CROPLIFEBRASIL, Cresce a adoção de produtos biológicos pelos agricultores brasileiros. Julho 2021: Acesso em: 25 jul. 2021 <<https://croplifebrasil.org/noticias/cresce-a-adocao-de-produtos-biologicos-pelos-agricultores-brasileiros/>>

DALLA Nora, Daiane, Isolamento e seleção de fungos para o controle biológico do percevejo-marrom. Tese (Mestrado em ciência do solo) – Pós-Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal de Santa Maria, Santa maria, p.60, 2019.

DANIEL, Jeferson Luis Aquino. Efeito de agentes de controle sobre *Euschistus heros* (Hemiptera: pentatomidae) na cultura da soja, em diferentes estádios fenológicos e extratos do dossel. Tese (Mestrado em Agroecossistemas) – Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, p.59, 2019.

DEY, Pinaki et al. Improved production of cellulase by *Trichoderma reesei* (MTCC 164) from coconut mesocarp-based lignocellulosic wastes under response surface-optimized condition. 3 *Biotech*, v. 8, n. 9, p. 1-13, 2018

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Dados Econômicos – Soja. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>>. Acesso em 18/05/2020.

EMBRAPA milho e sorgo, Sistemas de Produção: Cultivo do Milho, Disponível em:https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/territorio_sisal/arvore/CONT000fckl80cd02wx5eo0a2ndxy148tp3r.htm, Nov./2007. Acesso em: julho 2019.

ERTHAL JUNIOR, Milton. Controle biológico de insetos pragas. In: SEMINÁRIO MOSAICO AMBIENTAL: OLHARES SOBRE O AMBIENTE, 1., 2011, Campos de Goytacazes. Seminário. Campos de Goytacazes: IFF Guarus: S.i., p. 1 - 16. 2011.

FRANCO, K.; RODRÍGUEZ, S.; CERVANTES, J.; BARRANCO, J. Enzimas y toxinas de hongos entomopatógenos, su aplicación potencial como insecticidas y fungicidas. *Sociedades rurales, producción y medio ambiente*, v.11, n.22, 2011.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A. ; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. *Entomologia Agrícola*. Piracicaba: Fealq, 920 p. 2002.

GHIMIRE, N., WOODWARD, R. T. Under- and over-use of pesticides: An international analysis. *Ecological Economics* 89, 73 – 81, 2013.

GOETTEL, M. S. A simple method for mass culturing entomopathogenic hyphomycete fungi. *Journal of Microbiological Methods*, Amsterdam, v. 3, n. 1, p. 15-20, 1984.

GOTTI, I.A. DESENVOLVIMENTO DE MEIO DE CULTURA PARA PRODUÇÃO DE *Metarhizium anisopliae* (MESTSH.) SOROK. POR FERMENTAÇÃO LÍQUIDA. São Paulo. 2016. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico

GOULI, V.; GOULI, S.; SKINNER, M.; HAMILTON, G.; KIM, J. S.; PARKER, B. L. Virulence of select entomopathogenic fungi to the brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* (Stål) (Heteroptera: Pentatomidae). *Pest. Manag. Sci.*, [s.l.], v. 68, n. 2, p.155-157, 2012. Wiley-Blackwell.

GUEDES, R. N. C., Insecticide resistance, control failure likelihood and the First Law of Geography. *Pest Management Science* 73, p.479 – 484, 2017.

HAMILL, R. L.; HIGGENS, C. E.; BOAZ, H. E.; GORMAN, M. The structure of beauvericin, a new depsipeptide antibiotic toxic to *Artemia salina*. *Tetrahedron Lett*, v.49, p.4255-4258, 1969.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; CORRÊA-FERREIRA; B. S.; OLIVEIRA, L. J.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; PANIZZI, A. R.; CORSO, I. C.; GAZZONI, D. L.; OLIVEIRA, E. B. *Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado*. 30. ed. Londrina: Embrapa Soja, 70 p. 2000. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 30 ISSN 1516-7860).

IRFAN, M., SADIA, S., BAKHTAWAR, J., SHAKIR, HA, KHAN, M., & ALI, S. Utilization of peanut shells as substrate for cellulase production in submerged fermentation through Box-Behnken Design. *International Journal of Biology and Chemistry*, v. 12, n. 2, p. 28-39, 2019.

JACKSON, M. A., PAYNE, A. R.; ODELSON, D. A. Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycological Research, Cambridge*, v. 101, n. 1, p. 35-41, 1997.

KELLER, N.; TURNER, G.; BENNETT, J. Fungal secondary metabolism from biochemistry to genomics, *Nature Reviews Microbiology*, v.3, p.937-47, 2005.

KEPLER RM, LUANGSA-ARD JJ, HYWEL-JONES NL, QUANDT CA, SUNG GH, REHNER SA, AIME MC, HENKEL TW, SANJUAN T, ZARE R, CHEN M, LI Z, ROSSMAN AY, SPATAFORA JW, SHRESTHA B. A phylogenetically-based nomenclature for Cordycipitaceae (Hypocreales). *IMA fungus* 8:335–353, 2017.

MASCARIN, G. M., Production by solid-state and liquid fermentation and formulation of virulent strains of the fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* against whiteflies. Tese de doutorado (Doutorado em Entomologia) Escola Superior de Agricultura “Luiz de queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, p.187. 2015

MISSÃO, M. R. Soja: Origem, classificação, utilização e uma visão abrangente do mercado. *Revista de Ciências Empresariais, Maringá*, v. 3, n. 1, p.07-15, jan. 2006.

MOSCARDI F, CORRÊA-FERREIRA BS, DINIZ MC, BONO ILS. Incidência estacional de fungos entomógenos sobre populações de percevejos-pragas da soja. In: *Resultados de Pesquisa de Soja 1986–1987*. EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Soja, Londrina, PR, Brasil. p. 90, 1988.

MURAD, A. M.; LAUMANN, R. A.; LIMA, T. DE A.; SARMENTO, R. B.; NORONHA, E. F.; ROCHA, T. L.; VALADARES-INGLIS, M. C.; FRANCO, O. L. Screening of entomopathogenic *Metarhizium anisopliae* isolates and proteomic analysis of secretion synthesized in response to cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) exoskeleton, *Comp. Biochem. Physiol. C*, v.142, p.365-370, 2006.

NORONHA, E.F.; KIPNIS, A.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P.; ULHOA, C. J. Regulation of 36-kDa beta-1,3-glucanase synthesis in *Trichoderma harzianum*, *FEMS Microbiol. Lett*, v. 188, p. 19-22, 2000.

OLIVEIRA, S. M. C. Exigências físicas e nutricionais para produção de *Sporothrix insectorum* em meios de cultura líquidos. Jaboticabal, 45 f. 2000. (Dissertação de Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade estadual Paulista.

OLIVEIRA, A. M; MACARAJÁ, P. B.; FILHO, E. T. D.; LINHARES, P. C. F. Controle biológico de pragas em cultivos comerciais como alternativa ao uso de agrotóxicos. *Revista Verde*, Mossoró, v. 01, n. 02, p.01-09, 2006.

OTTATI-DE-LIMA, E. L. Produção de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. em diferentes substratos e efeito da radiação ultravioleta e da temperatura sobre estruturas infectivas desses entomopatógenos. 2007. 92 p. Tese (Doutorado em Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2007.

PANIZZI, A. R.; BUENO, A. F.; SILVA, F. A. C.; Insetos que atacam vagens e grãos. In: HOFFMANN-CAMPO, Clara Beatriz; CORRÊA-FERREIRA, B. Sp.; MOSCARDI, F. SOJA - Manejo Integrado de Insetos e outros Artrópodes-Praga. Brasília: Embrapa, Cap. 05. p. 859. 2012.

PARRA, J. R. P; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊ-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. Controle Biológico no Brasil: Parasitoides e Predadores. São Paulo, 2002.

PLUSKAL, T.; CASTILHO, S.; VILLAR-BRIONES, A.; ORESIC, M. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics*, v. 11, 2010.

ROSAS-GARCIA, N.; M.; MIRELES-MARTINEZ, M.; VILLEGAS-MENDOZA, J. M. Detección de bassianolida y beauvericina en cepas de *Beauveria bassiana* y su participación en la actividad patogénica hacia *Spodoptera* sp. *Biocencia*, Hermosillo, v. 22, n. 3, p. 93-99, 2020.

RUSTIGUEL, C.B; JORGE, J. A.; GUIMARET, L. H. S. “Otimização da produção de quitinase por diferentes cepas de *Metarhizium anisopliae* sob fermentação de estado sólido com crisálida de bicho-da-seda como substrato usando CCRD.” *Ai Magazine* 02, 268-276. 2012.

SANTOS, L. G.; GERREIRO, J. C.; Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (PL63) *Metarhizium anisopliae* (E9) e *Isaria fumosorosea* (ESALQ 1296) utilizados de forma isolada e em mistura sobre *Euschistus heros*. In: Encontro Anual de Iniciação Científica e Encontro anual de Iniciação científica Júnior, 29º e 9º, 2020, Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Agrárias/Umuarama, PR. <http://www.eaic.uem.br/eaic2020/anais/artigos/4051.pdf>

SANO, A. H. Dosagens de extrato de levedura e glicose para a produção de *Metarhizium anisopliae* em meio líquido. Jaboticabal. 42p., 2005. [Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Univ. Estadual Paulista].

SILVA, F., CALIZOTTI, G., PANIZZI, A. R. Survivorship and Egg Production of Phytophagous Pentatomids in Laboratory Rearing. *Neotropical Entomology* 40, 35 – 3, 2011.

SIMONATO, J.; GRIGOLLI, J. F. J.; OLIVEIRA, Harley Nonato de. Controle Biológico de Insetos-praga na Soja. Curitiba: Fundação MS, 247 p., 2010.

SOSA-GÓMEZ DR, BOUCIAS DG, NATION JL. Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the southern green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. *J Invert Pathol.* 69: 31-39, 1997.

SOSA-GÓMEZ DR, MOSCARDI F. Laboratory and field studies on the infection of stink bugs, *Nezara viridula*, *Piezodorus guildinii*, and *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) with *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in Brazil. *J Invert Pathol.* 71: 115-120, 1998

SOSA-GÓMEZ, D. R.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; HOFFMANN-CAMPO, C. B. CORSO, I. C.; OLIVEIRA, L. J.; MOSCARDI, F.; PANIZZI, A. R.; BUENO, A. de F.; HIROSE, E. Manual

de identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja. 3. ed. Londrina: Embrapa Soja, 2014. 100 p. (Documentos 269, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária).

ST LEGER, R. J.; COOPER R. M.; CHARNLEY, A. K. Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. *J. Gen. Microbiol*, v.132, P.1509-1517, 1986.

TÉLLEZ-JURADO, A.; CRUZ, R. M. G.; FLORES, M. Y.; ASAFF, T. A.; ARANA CUENCA, A. Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista mexicana de micología*, v.30, p.73-80, 2009.

TUELHER, E. S., SILVA, E. H., HIROSE, E., GUEDES, R. N. C., OLIVEIRA, E. E. Competition between the phytophagous stink bugs *Euschistus heros* and *Piezodorus guildinii* in soybeans. *Pest Management Science* 72, 1837 – 1843, 2016

VALADARES-INGLIS, M. C.; LOPES, R. B.; FARIA, M. R.; Controle de artrópodes-praga com fungos entomopatogênicos. *In: Controle biológico de pragas da agricultura*, Brasília, DF: FONTES, Eliana Maria Gouveia; Valadares-Inglis, Maria Cleria, p.201-231. 2020.

VEY, A.; HOAGLAND, R. E.; BUTT, T. M. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents”, en Butt M. *et al.* (eds.), *Fungi as biocontrol agents progress, problems and potential*, CABI Publishing, Wallingford, Reino Unido, p.311-346, 2001.

VILCINSKAS A, GÖTZ P. Parasitic fungi and their interactions with the insect immune system. *Adv Parasit.* 43: 267-313, 1999

VINCENT, F.; WEGST, G. Design and mechanical properties of insect cuticle. *Arthropod Struct. Dev*, v.33, p.187-199, 2000.

WENG, Q.; ZHANG, X.; CHEN, W.; HU, Q. Secondary Metabolites and the Risks of *Isaria fumosorosea* and *Isaria farinosa*. *Molecules* , 24, 664, 2019.

WANG, M.; CARVER, J. J.; PHELAN, V. V.; et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology*, v. 34, n. 8, p. 828–837, 2016.

YAHAGI, H.; YAHAGI, T.; FURUKAWA, M .; MATSUZAKI, K. Antiproliferative and antimigration activities of beauvericin isolated from *isaria* sp. On pancreatic cancer cells. *Molecules*, v. 25, n. 19, 2020.

