

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS LONDRINA
CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL**

Karoline Oliveira Morais

**Avaliação do Potencial Inseticida e Metabolômica Microbiana de
Extratos Orgânicos de Isolados de Fungos Entomopatogênicos
Metarhizium spp.**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**LONDRINA
2019**

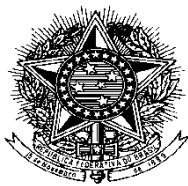
KAROLINE OLIVEIRA MORAIS

**Avaliação do Potencial Inseticida e Metabolômica Microbiana de
Extratos Orgânicos de Isolados de Fungos Entomopatogênicos
Metarhizium spp.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso Superior de Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *Câmpus* Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Engenharia Ambiental.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Juliana Feijó de Souza Daniel

**LONDRINA
2019**



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Londrina
Coordenação de Engenharia Ambiental



TERMO DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INSETICIDA E METABOLÔMICA
MICROBIANA DE EXTRATOS ORGÂNICOS DE ISOLADOS DE
FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS *METARHIZIUM SPP.* por

KAROLINE OLIVEIRA MORAIS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no dia 21 de Outubro de 2019 ao Curso Superior de Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Londrina. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o aprovado.

Prof. Dr^a. Patrícia Cordeiro Lobo Faria
(UTFPR)

Prof. Dr. Humberto Godoy Androcioli
(IAPAR)

Prof. Dr^a. Juliana Feijó de Souza Daniel
Orientadora

Profa. Dra. Edilaine Regina Pereira
Responsável pelo TCC do Curso de Eng. Ambiental

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pois sem ele nada poderia ser feito. Por haver me concedido a oportunidade de realizar esse trabalho e me abençoar durante todo período de graduação. Agradeço em especial aos meus pais Sebastião e Marina por sempre me apoiarem não somente nesse percurso, mais na vida. Agradeço também ao meu querido Romulo, que jamais me negou apoio, carinho e encorajamento sempre. Aos meus irmãos Bruna e João Pedro por serem os meus melhores amigos e melhores companheiros.

Agradeço a minha professora orientadora Juliana Feijó por me acompanhar desde 2017, por ter me dado suporte com suas correções e incentivos. Aos amigos do projeto QuiMiBio, aos da iniciação científica Thais, Ana, Igor, Gabriela, Beatriz e ao Antônio, no qual compartilhamos os resultados positivos e negativos deste trabalho. Aos amigos também do projeto do mestrado, como, Paula, Renato e Nayara.

Agradeço aos pesquisadores do IAPAR Humberto Godoy Andracioli por me conceder materiais necessários para elaboração deste trabalho, aos parceiros que ajudaram neste processo no IAPAR, Luciano e Seu Pedro. À Daniele Sartori do Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Londrina. À Geisa Caprini da Fundação Oswaldo Cruz Noroeste, pelo apoio na realização das análises das amostras utilizadas neste trabalho.

À UTFPR, por sua estrutura e equipamentos. Aos professores que compõem minha banca desde o TCC1, Patrícia Carneiro Lobo Faria e Renato Márcio Ribeiro Viana, agradeço pelos conselhos, dicas e por dedicarem seus tempos para a correção deste trabalho.

Aos meus amigos de graduação Mayara, Roseane, Naldisya, Vinícius, Luíza Taynara, por compartilharem os “momentos” e os trabalhos infinitos que realizamos ao longo da jornada acadêmica, muitos momentos com humor, confesso que às vezes mais sobre minha pessoa.

RESUMO

A expansão de áreas cultivadas no Brasil, associada a condições climáticas e uso indiscriminado de agrotóxicos selecionou insetos pragas resistentes. O percevejo *Dichelops melacanthus* (Dallas, 1851) (hemiptera: pentatomidae) causa prejuízos ao crescimento culturas de milho, diminuindo a produção e causando prejuízos ao crescimento e sobrevivência das mesmas, diminuindo o número de plantas por área cultivada. Alguns fungos sintetizam metabólitos secundários e enzimas que atuam como agentes no controle biológico de pragas na agricultura. A análise metabolômica é o estudo dos metabólitos secundários com baixas massas moleculares produzidas por fungos e outros microrganismos. Uma das ferramentas analíticas que permitem essa análise é a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, que possibilita análise tanto quantitativa como qualitativa, fornecendo informações estruturais das moléculas, a partir de dados de massas. Os objetivos deste trabalho foram realizar um teste bioinseticida contra o percevejo *D. melacanthus* e identificar o possível gênero dos seis isolados fúngicos através da análise metabolômica. Seis isolados foram obtidos de insetos *Spheciformes* sp. (Vespa), *Anthophila* sp. (Abelha), *Formica* sp. (Formiga), *Amblytelus* sp (Besouro). Os extratos orgânicos produzidos pelos isolados foram extraídos utilizando solvente orgânico acetato de etila e metanol. Para realização do teste bioinseticida os percevejos encontravam-se no quinto instar de crescimento. Foram realizados 14 tratamentos com 5 repetições. Cada tratamento foi realizado em caixa acrílica contendo 5 percevejos, com uma dieta restrita, e umidade média de 60 % por caixa em sala climatizada com fotoperíodo de 14 horas. Os tratamentos foram borrifados sobre cada uma das caixas, de acordo com o respectivo tratamento. Após o décimo dia de análise foi realizado o teste de Tukey para análise da mortalidade. A análise dos metabólitos foi obtida de acordo com a massa molecular obtida em UHPLC (*Ultra High Pressure Liquid Chromatography*) na concentração de 0,1 mg/ml, a partir dos extratos fúngicos. Foram identificadas morfologicamente esporos fúngicos pertencentes ao gênero *Aspergillus* sp. O teste inseticida não apresentou dados significativos de mortalidade a partir dos extratos e esporos dos isolados fúngicos, devido à média de mortalidade das testemunhas e controle serem próximas aos resultados dos demais tratamentos. Na análise metabolômica, identificou-se 24 metabólitos sintetizados por fungos, sendo 17 destruxinas e 7 aflatoxinas produzidas por *Metarhizium* e *Aspergillus* respectivamente. A identificação de fungos por essas análises foram complementares, além de permitir a criação de um banco de dados de moléculas fúngicas usando a espectrometria de massas.

Palavras-chave: Controle biológico, fungos entomopatôgenicos, bioinseticida, metabolômica.

ABSTRACT

The expansion of cultivated areas in Brazil, associated with climatic conditions and indiscriminate use of pesticides, selects insect resistant pests. The stink bug *Dichelops melacanthus* (Dallas, 1851) (hemiptera: pentatomidae) causes damage to the growth of maize crops, slowing yields and impairing their growth and reproduction by decreasing the number of plants per cultivated area. Some fungi synthesize secondary metabolites and enzymes that act as agents without biological pest control in agriculture. A metabolic analysis is the study of secondary metabolites with low molecular masses produced by fungi and other microorganisms. One of the analytical tools that allow this analysis is the liquid chromatography coupled to mass spectrometry, which enables both quantitative and qualitative analysis, providing structural information of molecules from mass data. The objectives of this work were to perform a bioinsecticide test against the *D. melacanthus* stink bug and to identify the possible genus of the six fungal isolates through the metabolomic analysis. Six isolates were obtained from insects *Spheciformes* sp. (Wasp), *Anthophila* sp. (Bee), *Formica* sp. (Ant), *Amblytelus* sp. (Beetle). The organic extracts produced by the isolates were extracted using organic solvent ethyl acetate and methanol. To perform the bioinsecticide test the bed bugs were in the fifth instar of growth. There were 14 treatments with 5 repetitions. Each treatment was carried out in an acrylic box containing 5 bed bugs, with a restricted diet, and average humidity of 60% per box in a 14 hour photoperiod. The treatments were sprayed on each box according to the respective treatment. After the tenth day of analysis, the Tukey test for mortality analysis was performed. The metabolites analysis was obtained according to the molecular mass obtained in UHPLC (Ultra High Pressure Liquid Chromatography) at a concentration of 0.1 mg / ml, from the fungal extracts. Morphologically identified fungal spores belonging to the genus *Aspergillus* sp. The insecticide test did not present significant mortality data from fungal isolates extracts and spores, due to the average mortality of the controls and control are close to the results of the other treatments. In the metabolomic analysis, 24 metabolites synthesized by fungi were identified, being 17 destruxins and 7 aflatoxins produced by *Metarhizium* and *Aspergillus* respectively. The identification of fungi by these analyzes were complementary, besides allowing the creation of a database of fungal molecules using mass spectrometry.

Key-words: Biological control, entomopathogenic fungi, bioinsecticide, metabolomics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fungo <i>Beauveria bassiana</i> infectando a broca-do-café.....	14
Figura 2- Percevejo Barriga verde.....	15
Figura 3- Espécie de fungo <i>Metarhizium anisopliae</i>	18
Figura 4- Fungo entomopatogênico (<i>Metarhizium anisopliae</i>) parasitando inseto. ...	19
Figura 5- Colônia de <i>Aspergillus flavus</i>	20
Figura 6- Estruturas moleculares das micotoxinas; Destruxina E e Destruxina C, respectivamente.	21
Figura 7- Estruturas moleculares das micotoxinas; Aflatoxina B1 e Aflatoxina G1 produzidas por <i>Aspergillus</i>	22
Figura 8- Fluxograma de trabalho para análise metabolômica.....	23
Figura 9- Fluxograma das etapas de metodologia.	25
Figura 10- Cepas fúngicas isoladas de insetos e conservadas em meio BDA; A- JUVES004; B- JUABE002; C- JUABE001; D- JUFOR006; E- JUBES001; JUABE 007.....	26
Figura 11- Inoculação em placa de Petri.	27
Figura 12 – Macrocultivo em meio líquido do isolado JUABE007.	28
Figura 13- Separação do extrato líquido.	28
Figura 14 - Contagem de esporos câmara de Neubauer.	30
Figura 15- Representação da réplica para avaliação do teste inseticida.	32
Figura 16 -Câmara úmida.....	33
Figura 17- UHPLC/MSn (Ultimate 3000 acoplado ao QExactive Plus, ThermoFisher).	34
Figura 18- Apresenta o espectro de massa MS/MS (314,07924) da amostra para aflatoxina B2 em acetato – JUABE002.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Massas dos seis isolados fúngicos extraídos com acetato e metanol.	29
Tabela 2- Tratamentos aplicados sobre cada uma das repetições.	31
Tabela 3- Mortalidade média ao final do 10º dia de <i>D. melacantus</i> em diferentes tratamentos com esporos fúngicos. Temp.: 25± 2°C; U.R.: 60±10%; fotofase: 14 h.....	35
Tabela 4 – Taxa de mortalidade insetos JUABE001.	36
Tabela 5 -Taxa de mortalidade insetos JUABE007.....	37
Tabela 6- Características das destruxinas produzidas por fungo do gênero <i>Metarhizium</i> , encontrados na literatura.....	38
Tabela 7- Características dos metabólitos produzidos pelo fungo do gênero <i>Aspergillus</i>	39
Tabela 8- Destruxinas identificadas nos extratos acetato e metanólico da cepa JUABE002.	40
Tabela 9- Destruxinas identificadas nos extratos acetato e metanólico da cepa JUABE001.	42
Tabela 10- Destruxinas identificadas no extrato acetato da cepa JUABE007.....	43
Tabela 11- Aflatoxinas identificadas nos extratos acetato e metanólico produzidos pela cepa JUABE007.....	44
Tabela 12- Destruxinas identificadas no extrato acetato da cepa JUBES001.....	44
Tabela 13- Aflatoxinas identificadas nos extratos acetato e metanólico da cepa JUBES001.	45
Tabela 14- Destruxinas identificadas nos extratos acetato e metanolico da cepa JUFOR006.....	45
Tabela 15- Destruxinas identificadas nos extratos acetato e metanol da cepa JUVES004.	47

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 OBJETIVOS.....	12
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
3.1 CONTROLE BIOLÓGICO.....	13
3.2 PERCEVEJO <i>DICHELOPS MELACANTHUS</i>	14
3.3 FUNGOS ENTOMOPATÔGENICOS.....	16
3.3.1 Fungos do gênero <i>Metarhizium</i> e <i>Aspergillus</i>	17
3.4 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	18
3.5 METABOLÔMICA MICROBIANA E SUAS CARACTERÍSTICAS.....	19
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1 COLETA E CONSERVAÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO.....	27
4.2 CONSERVAÇÃO DOS ISOLADOS.....	28
4.3 MACROCULTIVO EM MEIO LÍQUIDO.....	28
4.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS FÚNGICOS.....	29
4.5 BIOENSAIO INSETICIDA.....	31
4.5.1 Criação de <i>D. melacanthus</i>	31
4.5.2 Obtenção Esporos fúngicos entomopatogênicos.....	32
4.5.3 Teste inseticida.....	33
4.6 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR USANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADO A ESPECTROMETRIA DE MASSAS LC/MS.....	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1 BIOENSAIO INSETICIDA.....	37
5.2 ANÁLISE METABÔLÔMICA MICROBIANA.....	41
5.3 Extrato JUABE 002	42
5.4 Extrato JUABE 001.....	44
5.5 Extrato JUABE007	46
5.6 Extrato JUBES001	47
5.7 Extrato JUFOR006	48
5.8 Extrato JUVES004.....	50

6 Considerações Finais	49
7 Referências Bibliográficas	50

1. INTRODUÇÃO

O número de pragas na lavoura tem aumentado devido à constante expansão de áreas cultivadas no Brasil e à intensa exploração agrícola, ocasionando uma elevada demanda por agentes químicos no controle de doenças, pragas e plantas invasoras na agricultura. Com isso, há consequências danosas ao meio ambiente e à saúde humana.

Os defensivos agrícolas são a segunda maior causa de contaminação de rios no Brasil, sendo que grande parte dos agrotóxicos não atinge a praga alvo, e conseqüentemente contaminam o solo, ar e águas subterrâneas, gerando consequências para a fauna e a flora aquática, incorporando estes compostos danosos ao ciclo natural do meio ambiente. Além disso, a constante utilização desses químicos sintéticos seleciona o surgimento de insetos-praga resistentes, sendo a rotação de culturas o processo capaz de tornar os insetos adaptáveis em diferentes condições. Essas mudanças, geradas pela constante aplicação de produtos químicos, desencadearam o crescimento de várias espécies, como o percevejo *D. melacanthus*. Esta praga causa danos no crescimento das plantas, e assim intensificando as medidas de controle através do uso de inseticidas.

Com isso, o controle biológico, utilizando métodos alternativos, pode manter as populações de pragas à (níveis) baixos, e/ou satisfatórios. Dentre esses métodos, tem-se o controle biológico usando microrganismos, como, por exemplo, os fungos. Esta técnica consiste em controlar um agente causador de patogenia através de outro ser vivo. Estes podem ser aplicados em plantas visando controlar insetos-praga.

Alguns fungos sintetizam metabólitos secundários e enzimas capazes de atuar como agentes para o controle biológico. Estes fungos podem ser encontrados em forma de toxinas nocivas ao desenvolvimento de insetos pragas. Pouco se sabe sobre o mecanismo de atuação dessas toxinas presentes nos extratos orgânicos sobre outros microrganismos e insetos. Porém, vários estudos mostram a eficácia dessas substâncias no controle biológico. Além disso, a aplicação de esporos fúngicos apresenta atividades enzimáticas e toxinas capazes de levar os insetos a óbito.

A análise metabolômica é o estudo dos metabólitos secundários com baixas massas moleculares produzidas por fungos e outros microrganismos. Uma das

ferramentas analíticas que auxiliam nesse processo é a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, que possibilita análise tanto quantitativa como qualitativa, fornecendo informações estruturais da molécula em análise, a partir de dados de massas.

A produção dos metabólitos depende de cada espécie de fungo e sua atuação para o microrganismo é muito pouco descrita na literatura, porém essas substâncias podem ser uma alternativa no controle de insetos. A elucidação estrutural dos metabólitos produzidos pelos fungos agrega valor ao processo, uma vez que tratamentos biológicos costumam ser menos agressivos ao meio ambiente. Isto aumenta a possibilidade de aceitação do processo tanto pela sociedade quanto pela indústria.

Assim, é de grande importância o desenvolvimento de novas técnicas viáveis que garantam a exploração sustentável de um recurso natural e renovável, oferecendo alternativa ao atual sistema de produção e consumo.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial bioinseticida de seis cepas fúngicas pertencentes à micoteca do laboratório QuiMiBio/UTFPR/LD, e identificar através da análise metabolômica o gênero e os metabólitos presentes nos extratos em acetato de etila e metanol.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar teste bioinseticida com os extratos orgânicos no controle do inseto *D. melacanthus*.
- Identificar os metabólitos presentes nos extratos orgânicos a partir da análise metabolômica usando espectrometria de massas dos extratos orgânicos.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Controle Biológico

O uso indiscriminado de agrotóxicos tem sido o padrão de controle de pragas em diversas culturas plantadas no Brasil e diversas partes do mundo. Com isso, tem-se os mais variados desequilíbrios ecológicos nos plantios, que vão desde a superpopulação de pragas, “seleção” de biótipos resistentes, poluição de solos e aquíferos até prejuízos à saúde humana e animal (GALLO et al., 1988).

A superprodução de alimento devido à expansão da agricultura proporciona alimento abundante para insetos, com isso o crescimento de suas populações, causando significativos impactos na agricultura, elevando a utilização de fitossanitários. Por outro lado, o COEX – Comitê Executivo de Fitossanidade do Rio Grande do Norte – menciona que os fruticultores que destinam sua produção para exportação, têm recebido forte pressão dos importadores, especialmente da Europa, no que diz respeito à segurança fitossanitária – entendida como uma necessidade essencial o alimento apresentar a menor quantidade de resíduos agroquímicos, infestação por pragas e contaminação microbiológica (COEX, 2005).

Uma possibilidade para redução da utilização de agrotóxicos é a substituição, mesmo que gradativa, dos inseticidas químicos pelo controle biológico por intermédio de inimigos naturais, que podem ser, outros insetos benéficos, predadores, parasitóides, e microrganismos, como fungos, vírus e bactérias. Esse método de controle utilizando inimigos naturais não deixam resíduos nos alimentos e são inofensivos ao meio ambiente e à saúde da população (EMBRAPA, 2015).

Dentre as várias pragas que ocorrem na agricultura tem-se por exemplo a broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae), que ataca a as culturas de cana-de-açúcar, causando a complexo broca-podridão causado pela ação conjunta de micro-organismos que penetram nos colmos da cana de açúcar juntamente com a praga, além do dano direto devido à abertura de galerias ao longo da planta, causando perdas para a agricultura (GALLO et al., 2002).

Os produtos de origem biológica são uma possível alternativa que não substitui na totalidade os produtos químicos convencionais utilizados atualmente no controle das pragas, mas desempenham um papel alternativo para produtos químicos convencionais encontrados atualmente no mercado. A figura 1, exemplifica o

controle biológico utilizando o fungo *Beauveria bassiana* para controle da cigarrinha da pastagem, na cana de açúcar usado na agricultura.

Figura 1- Fungo *Beauveria bassiana* infectando a broca-do-café.



Fonte: Embrapa Rondônia.

A broca-do-café é o nome popular do besouro *Hypothenemus hampei* que ataca o fruto do café qualquer estágio de maturação, inclusive o grão já seco. O fungo *Beauveria bassiana*, é aplicado no cafeeiro durante o ano todo, ou em determinadas épocas, de acordo com as condições climáticas do local, atuando com bioinseticida no controle da broca-do-café (LONDRINA, 2005).

3.2 Percevejo *Dichelops Melacanthus*

Conhecidos por barriga verde, *Dichelops melacanthus* são percevejos que quando jovens apresentam a coloração verde e quando adultos apresentam a parte dorsal do corpo marrom e a ventral verde. *D. melacanthus* (Figura 2) são conhecidos devido aos danos causados em culturas de milho. Os percevejos do gênero *Dichelops* são facilmente encontrados exclusivamente em regiões tropicais, distribuídos por diversos países da América do Sul e no Brasil, são facilmente encontrados norte do Paraná.

Carvalho (2007) descreveu essa espécie com as seguintes características: adultos apresentam o corpo em forma de losango, cujo tamanho varia entre 9 a 12 mm, cabeça com jugas agudas, margens ântero laterais do pronoto serrilhadas, e abdômen de coloração verde predominante (figura 2). Os ovos dessa espécie

apresentam coloração verde clara e à medida que maturam vão escurecendo. Apresentam um tempo de vida estimado de aproximadamente três a quatro meses (BRUSTOLIN; BIANCO; NEVES,2011). As ninfas e os adultos preferencialmente se instalam em ambientes com temperaturas amenas, mais próximos do solo, e seu ataque normalmente se dá durante o entardecer e à noite.

Figura 2- Percevejo Barriga verde.



Fonte: Eco (2011).

Por serem pragas iniciais, ou seja, pragas que atacam o estágio inicial de crescimento da planta esse percevejo têm prejudicado significativamente a cultura no momento de instalação, prejudicando o desenvolvimento das plântulas e em casos extremos causando a morte das plantas. Além disso, é possível ocorrer redução do porte, população final e aumento da incidência de plantas dominadas.

O percevejo ataca principalmente as culturas de soja, porém, a partir da década de 90, segundo Ávila (1995), há relatos dessa espécie atacando plântulas de milho, trigo, além de outras gramíneas, como a aveia-preta e triticale. Esses insetos sugam várias estruturas da planta, injetando toxina no fruto e na semente durante o seu processo de alimentação. Em relação aos danos provocados na cultura do milho, quando comparado com outros percevejos, o barriga-verde é o que provavelmente apresenta maior potencial de causar prejuízos, sugerindo-se uma possível toxicidade de sua saliva (ROZA GOMES et al., 2011).

Conforme Carvalho (2007) os danos ocasionados por estes insetos são resultantes da frequência de penetração do aparelho bucal e duração do processo

de alimentação, associado à liberação de secreções salivares que podem ser tóxicas, e pela época de sua ocorrência na lavoura. Conforme o tempo de alimentação, podem murchar as folhas, seguido de secamento da planta, ocasionando perdas superiores a 25% na produtividade (GALLO et al., 2002). O controle desta praga, em condições convencionais, tem sido realizado em grande parte com base em produtos químicos. Porém, a má regulação dos equipamentos, a escolha incorreta dos agrotóxicos e a condução nem sempre adequada da cultura têm aumentado o número médio de aplicações de inseticidas, sem o eficiente controle (VIANA; COSTA, 1998). Após a colheita da soja, por exemplo nas regiões como o norte do Paraná, o percevejo *D. melacanthus* permanece entre os detritos no solo alimentando-se das plantas de milho (*Zea mays L.*), ou do trigo (*Triticum aestivum L.*), que crescem sob o plantio direto (BRUSTOLIN; BIANCO; NEVES, 2011). Nessas áreas, os insetos encontram abrigo na palha e alimento em sementes secas sobre o solo possibilitando a sua reprodução. Isso difere do que ocorre em áreas de cultivo convencional, onde os insetos são desalojados de seus abrigos e mortos, devido ao cultivo (Panizzi, 2000). Em estudo desenvolvido no Mato Grosso do Sul, Brasil ficou evidente que maiores populações de *D. melacanthus* foram encontradas na pré e pós colheita da soja, principalmente na palhada. Também foi perceptível que, à medida que o milho "safrinha" ou as plantas voluntárias de milho cresceram, a população do inseto tende a diminuir (BRUSTOLIN; BIANCO; NEVES, 2011).

3.3 Fungos Entomopatogênicos

Os fungos entomopatogênicos são fungos que parasitam insetos, geralmente esporulam externamente no corpo do inseto hospedeiro sob condições de alta umidade, e em alguns casos esporulam no interior do organismo hospedeiro (abdômem), a exemplo dos gafanhotos, que vivem em ambientes seco (ALVES; FARIA, 2010). Existe especificidade na infecção dos fungos, tais fungos podem não afetar outros animais e plantas. Eles apresentam estágios de resistências (produção de esporos) que mantém o potencial de infecção só condições adversas, à exemplo, locais secos (GRAVENA, 2000).

Os fungos podem se espalhar rapidamente por uma população de insetos, causando o seu colapso. Desse modo, várias espécies de fungos apresentam um

potencial para atuarem como inseticidas microbianos. Alguns fungos como *Entomophthora* e espécies próximas são bastante específicos afetando insetos, como as moscas, já outros como o *Beauveria*, tem um amplo espectro de hospedeiros, não distinguindo espécies como besouros, lagartas, percevejos e vítimas. Essas espécies de fungos apresentam uma importante ferramenta para o manejo ecológico de pragas, tanto aplicados a cultivos convencionais como nos orgânicos ou autossustentáveis (GRAVENA, 2000).

Conforme Alves (1998), a colonização do hospedeiro se inicia com o esporo do fungo se aderindo à parte externa do inseto (cutícula), em seguida o esporo germina e forma uma estrutura de penetração na cutícula, adentrando a parte interna do inseto. A seguir, uma sequência de enzimas e metabólitos produzidos pelo fungo (lipases e proteinases, principalmente) são produzidas, que juntamente com uma força física, possibilitam o rompimento da cutícula e a colonização do hospedeiro. Após a morte do inseto e o esgotamento de suas reservas, o fungo emite hifas pelas articulações e outras aberturas naturais do cadáver e esporula para iniciar outro ciclo de infecção. Algumas enzimas podem estar correlacionadas com a agressividade de certos fungos para determinar uma série de eventos.

3.3.1 Fungos do gênero *Metarhizium* e *Aspergillus*

Metarhizium spp

Os primeiros estudos com fungos que infectam insetos, foram realizados pelo russo Metschnikoff no final do século XIX, quando avaliou o potencial de *Metarhizium anisopliae* para o controle de uma espécie de besouro. Porém apenas um século depois os primeiros resultados práticos de técnicas empregando a aplicação de fungos começaram a surgir (FARIA; MAGALHÃES, 2001).

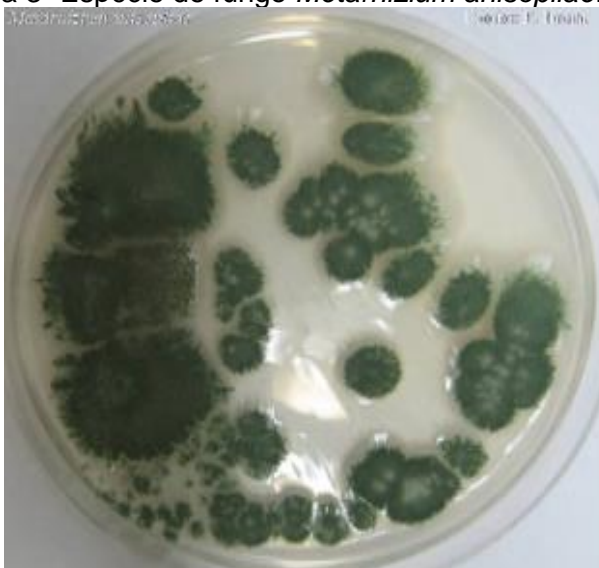
No Brasil, a utilização de fungos entomopatogênicos como agentes de controle biológico vem sendo aplicada utilizando-se principalmente as espécies *Metarhizium anisopliae* e *Bauveria bassiana* (ZIMMER et al., 2010). *Metarhizium anisopliae* vem sendo usado utilizado no controle biológico de percevejos (gênero *Deois*) das pastagens, da cigarrinha da cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata*)(Hemiptera: Cercopidae), da broca da cana-de-açúcar (*Diatraea*

saccharalis)(Lepidoptera:Crambidae) e nos carrapatos de impacto na pecuária, como *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. (ORLANDELLI; PAMPHILE, 2011).

Alves et al. (1998) relataram que as cigarrinhas-das-pastagens, *Mahanarva posticata* e *Metarrhizium. fimbriolata* causaram perdas de 11% na produção de 800.000 hectares de cana. Pesquisas realizadas nas regiões Sudeste e Nordeste indicam que o fungo *M. anisopliae* possibilita a redução de 70 a 90% das insetos pragas na agricultura, já no estado de São Paulo, o tratamento dos canaviais com *M. anisopliae* reduziu em 3 vezes o custo do tratamento em relação ao uso de agrotóxicos.

Diante disso e devido à evidência da alta patogenicidade apresentada pelo fungo de *M. Anisopliae* (Figura 3) em insetos e a fácil capacidade de multiplicação em laboratório, a seleção de isolados deste fungo para o controle por exemplo de *D. melacanthus* pode fornecer subsídios para a administração dessas pragas das culturas (GROTH et al., 2017).

Figura 3- Espécie de fungo *Metarhizium anisopliae*.



Fonte: <https://gukilimg.pw/metarhizium-anisopliae-cigarrinha.html>.

No cenário nacional, em escala comercial o fungo mais estudado e produzido é o *M. anisopliae*, cujo uso já atingiu mais de um milhão de hectares tratado principalmente em virtude da sua ampla variedade genética, variedade de hospedeiros e facilidade de produção com a utilização de substratos artificiais (MASCARIN; QUINTELA, 2013). A figura 4 exemplifica o parasitismo de fungo *M. anisopliae* em uma mosca.

Figura 4- Fungo entomopatogênico (*Metarhizium anisopliae*) parasitando inseto.



Fonte: Lopes (2017).

Aspergillus spp

Algumas espécies fúngicas possuem a capacidade de se desenvolver sobre grãos armazenados. Os principais fatores favoráveis são umidade, temperatura, período de armazenamento, nível inicial de contaminação, impurezas, insetos, concentração de CO₂, condições físicas e sanitárias dos grãos (LAZZARI, 1997). Em condições ambientais favoráveis, de umidade e de temperatura, os esporos dos fungos germinam, desenvolvendo hifas, que infestam grãos, rações e outros substratos (PRADO et al., 1991).

Os fungos do gênero *Aspergillus* são os indicadores de deterioração em sementes e grãos causando danos no germe, descoloração, alteração nutricional, perda da matéria seca e os primeiros estágios da deterioração microbiológica. (COBERLINNI, 2003).

Os fungos potencialmente capazes de produzir metabólitos secundários tóxicos são denominados toxigênicos e podem contaminar os grãos no campo, antes mesmo da colheita ou durante o armazenamento, persistindo em alimentos e rações destinados ao consumo humano e de animais (CARVAJAL; ARROYO, 1997). Os fungos toxigênicos pertencem basicamente aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e

Fusarium, os quais são responsáveis pela produção da maioria das micotoxinas até hoje conhecidas e estudadas (SCUSSEL, 2002). As espécies de *Aspergillus* são comumente encontrados como contaminantes de produtos durante a secagem e o armazenamento, sendo denominados de fungos de armazenamento (SWEENEY; DOBSON, 1998).

O *Aspergillus flavus* figura 4, produz aflatoxinas B1 e B2, enquanto o *Aspergillus parasiticus* produz as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 (MOSS, 1991). A toxicidade das aflatoxinas decresce na ordem B1>B2>G1>G 2. A G1 possui a metade da toxicidade de B1 (SCUSSEL, 2002).

Figura 5- Colônia de *Aspergillus flavus*.



Fonte: <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/toxico/micotoxinas.html>

3.4 Metabólitos Secundários

Os metabólitos são produtos do metabolismo dos microrganismos, sendo divididos em primários e secundários. Os metabólitos primários são indispensáveis para a vida celular sendo encontrados na forma de carboidratos, proteínas, aminoácidos e ácidos nucleicos, oriundos de vias fitossintéticas e respiratórias.

Essas estruturas podem ser identificadas como toxinas de baixo peso molecular, capazes de atuar na inibição de outros organismos através das propriedades orgânicas presentes em suas estruturas químicas. Muitos dos microrganismos que produzem metabólitos secundários têm uma complexa diferenciação morfológica (SUTTON, 1996).

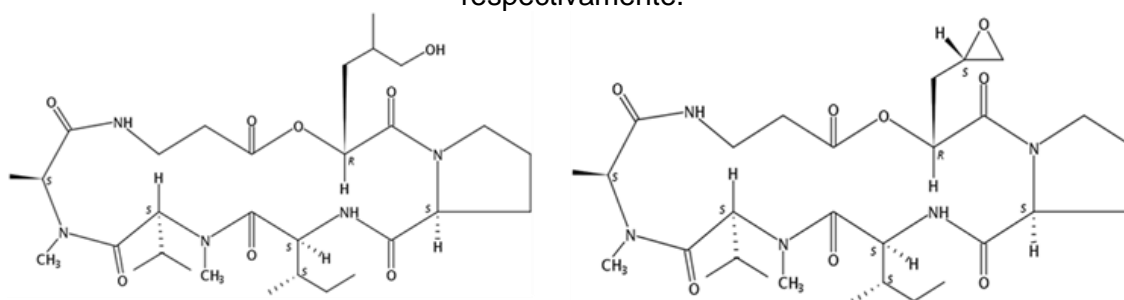
Os fungos, ao serem submetidas a algum tipo de estresse, como a exposição a outros microrganismos patogênicos podem produzir novos metabólitos secundários relacionados à defesa, além de aumentar a produção dos preexistentes. Esses metabólitos atuam como antimicrobianos, de baixa massa molecular, biossintetizados pelos fungos, sendo acumulados em seus organismos em resposta às infecções decorrentes de agentes patogênicos e estresses abióticos (PASCHOLATI, 2011).

A realização do estudo do perfil metabólico é complexa devido à grande variedade de metabólitos existentes. Segundo Sumner, Mendes e Dixon (2003) deve-se incluir carboidratos, aminoácidos, ácidos orgânicos, lipídeos, vitaminas, compostos fenólicos, terpenoides e alcaloides que mudam de acordo com a espécie em estudo, alguns exemplos são antibióticos, toxinas, pigmentos e hormônios. Os antibióticos por exemplo, são inibidores de microrganismos em baixíssimas concentrações (DIXON, 2003).

Alguns metabólitos causam doenças nos seres humanos, das quais são algumas já são conhecidas, como: botulismo, tétano, disenteria e difteria. Devido a sua grande suscetibilidade a diversas influências químicas e físicas, como a luz, o calor ou o tempo transcorrido, as toxinas são difíceis de se isolar, o que torna necessário o estudo de seus efeitos (DELBONE; LANDO, 2010).

As destruxinas são metabólitos secundários produzidos pelo fungo *Metarhizium*, elas possuem uma determinada virulência e com potencial para o uso de controle de pragas (PEDRAS et al., 2002). Essas micotoxinas (Figura 6), são detectadas no corpo dos insetos infectados, inclusive em estágios avançados da infecção, causando mortalidade. Mais de vinte diferentes destruxinas já foram isoladas e quinze destas foram isoladas de *M. anisopliae* (LOUTELEIR et al., 1996).

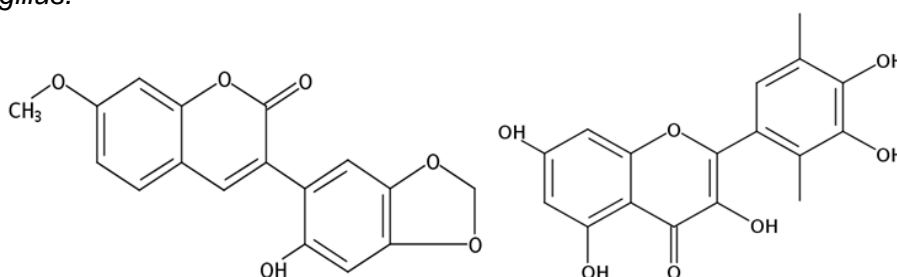
Figura 6- Estruturas moleculares das micotoxinas; Destruxina E e Destruxina C, respectivamente.



Fonte: Sci Finder.

Por estarem presentes em quase todos os lugares, os fungos produtores de micotoxinas são capazes de crescer e produzir micotoxinas em uma grande variedade de produtos agrícolas. Para isso deve haver condições favoráveis de umidade, temperatura e aeração. A Figura 7 exemplifica moléculas de micotoxinas produzidos pelo fungo *Aspergillus*.

Figura 7- Estruturas moleculares das micotoxinas; Aflatoxina B1 e Aflatoxina G1 produzidas por *Aspergillus*.



Fonte: Sci Finder.

3.5 Metabolômica microbiana e suas características

Um ser vivo pode produzir centenas de metabólitos em quantidade e diversidade bastante variáveis, dependendo da espécie. Assim, pode-se definir o metaboloma como uma coleção de pequenas moléculas (os metabólitos), menores que 1000 Da, sintetizadas no metabolismo de uma célula, tecido ou organismo (HOFFMAN, 2007).

Estudos sobre metabolômica consiste em desenvolver caminhos para descoberta de vias metabólicas que incluem peptídeos, aminoácidos, ácidos nucleicos, carboidratos, ácidos orgânicos, vitaminas, polifenóis alcaloides e outras moléculas inorgânicas. Os metabólitos não conhecidos denominam-se analitos, já os metabólitos cuja estrutura, fórmula ou propriedade química é conhecida são denominados compostos. Em geral, são produtos intermediários ou finais das múltiplas reações enzimáticas de atividade bioquímica de um organismo (PATTI et al., 2012).

A metabolômica microbiana tem sido aplicada em vários campos, inclusive na identificação de microrganismos, mutações celulares, pesquisa de genes funcionais, e identificação de vias metabólicas (BELINATO et al., 2019).

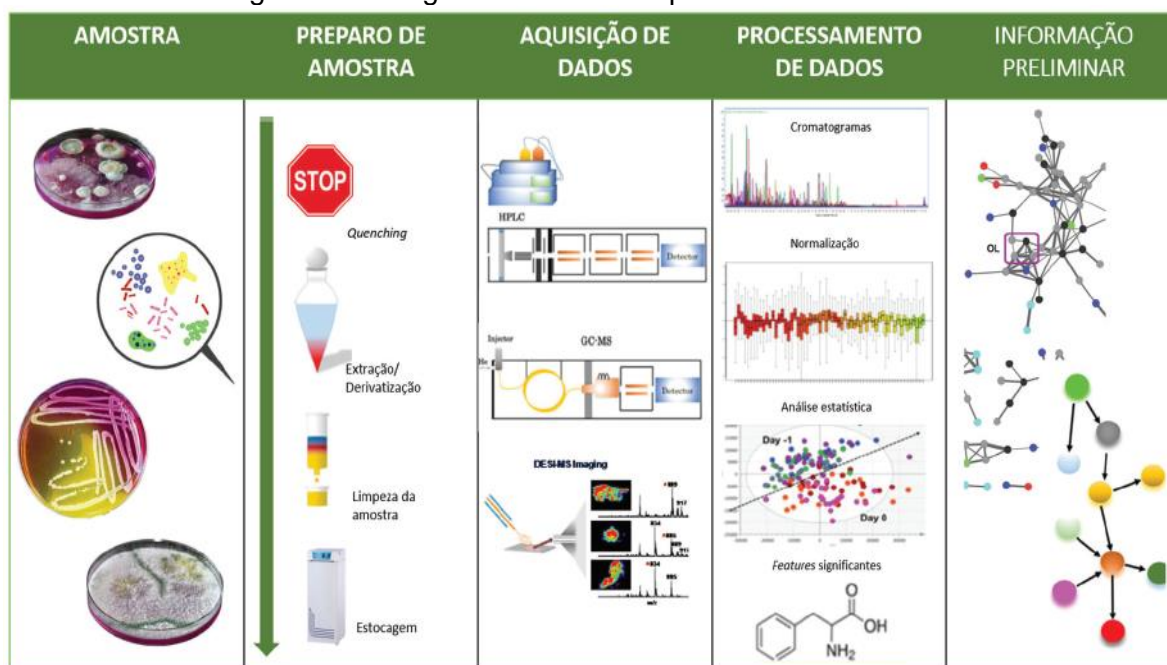
Quando comparada a outros estudos, a principal desvantagem da metabolômica de microrganismos está na alta complexidade dos metabólitos ainda pouco

explorados e, em alguns casos, de difícil identificação. Além disso, a separação dos metabólitos intracelulares e extracelulares em microrganismos não é uma tarefa trivial (XU et al., 2014). Dentre a análise metabolômica tem-se como exemplo as micotoxinas identificadas através da análise de metabolômicas que consiste em avaliar a molécula de acordo com sua massa, fórmula molecular e tempo de retenção (BELINATO et al., 2019).

Devido aos avanços tecnológicos, o desenvolvimento de novas e melhores instrumentações analíticas, auxiliou o melhor desenvolvimentos de técnicas como a cromatografia e espectrometria de massas juntamente com à novas ferramentas computacionais, favorecendo o avanço das pesquisas sobre metabolômica microbiana (KONDAKOVA et al., 2015).

A definição do problema biológico a ser estudado é a primeira etapa no desenvolvimento do estudo, para a determinação do tipo de abordagem empregada. Após essa escolha, as etapas de planejamento experimental e análise química são delineadas e o experimento metabolômico é conduzido. A partir daí, segue-se para o fluxograma de trabalho ilustrado na Figura 8 (KHOOMRUNG et al., 2017).

Figura 8- Fluxograma de trabalho para análise metabolômica.



Fonte: Belinato, 2019.

O preparo das amostras é de suma importância para a compreensão do estudo metabolômico, pois os microrganismos são suscetíveis a variações metabólicas muito rapidamente durante o preparo da amostra. A escolha do

quenching apropriado através do uso de solventes específicos, seja através da lavagem para remoção do meio extracelular ou por congelamento de biomassa é importante, pois garante a maior eficiência na remoção dos metabólitos produzidos por fungos (KAPOORE,2017).

Logo após o *quenching* é realizada a separação dos metabólitos através da extração. Para identificar e quantificar os metabólitos encontrados no meio intracelular é necessário usar solventes de extração (orgânicos, inorgânicos não aquosos ou uma mistura dos dois), permitindo que haja a penetração dos solventes no meio intracelular, e uma maior recuperação desses metabólitos intracelulares (LEE, 2015). Por outro lado, os metabólitos presentes no ambiente extracelular são mais fáceis de serem extraídos, advindos da composição do meio de cultura e compostos secretados pelas células ou produto das lises celulares (PINU, 2017).

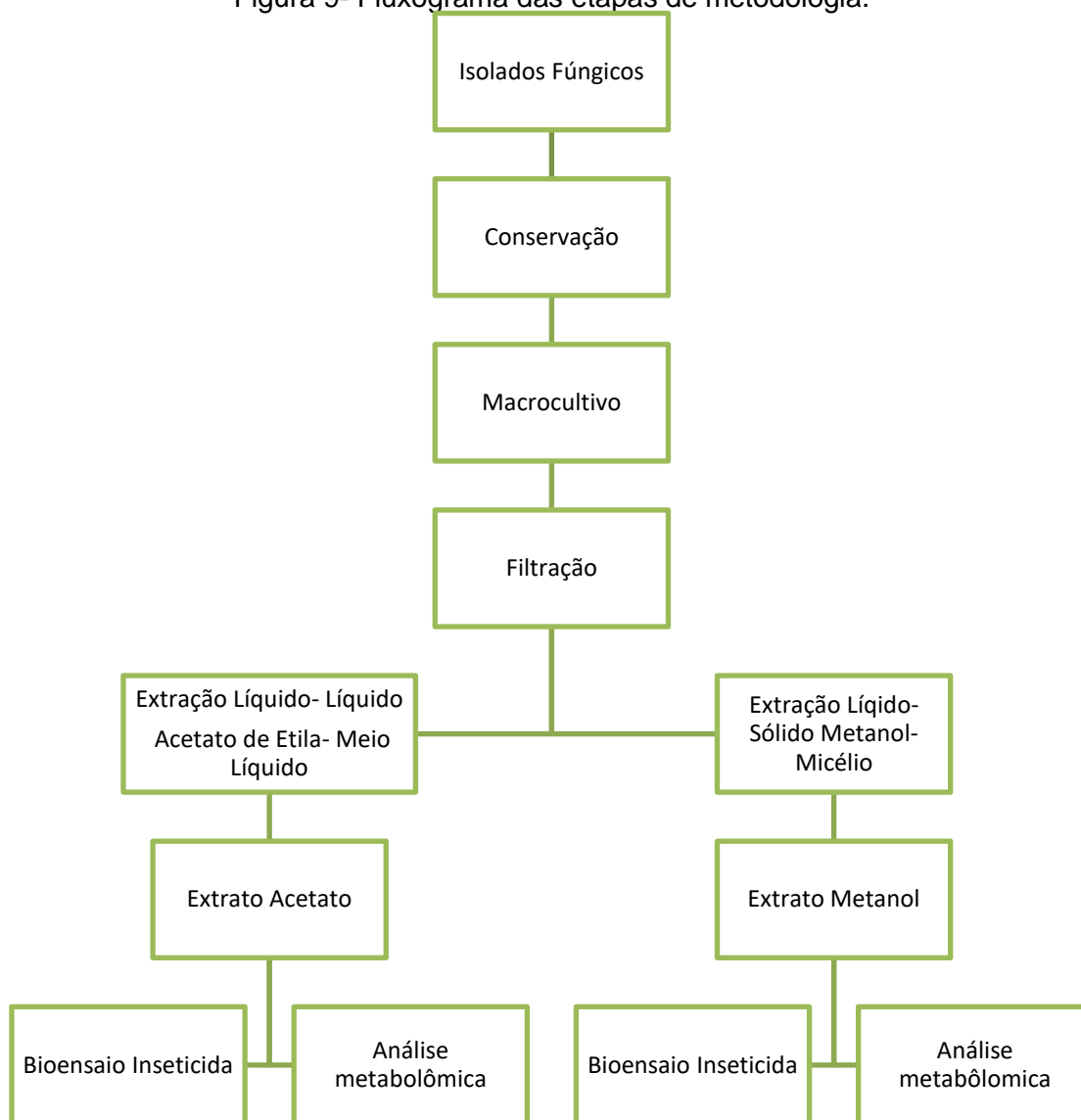
A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS do inglês *Liquid Chromatography- Mass Spectrometry*) tornou-se uma importante ferramenta analítica para a aquisição dos dados metabólicos. Ela separa os metabólitos e depois faz a análise de massas desses metabólitos, através dos fragmentos gerados no equipamento. É a técnica mais adequada na análise de compostos separando-os por polaridade da molécula, apresenta grande sensibilidade, precisão dos resultados e requer pouca amostra. A LC-MS possibilita o conhecimento de análises quantitativas MS/MS (espectrometria de massas) cromatográficas, dispensando outras técnicas de análise em decorrência de suas principais vantagens: diminuição considerável no tempo de análise, melhor resolução e detectabilidade, pequeno volume de amostra, grande variedade de colunas equipamentos disponíveis e menor geração de resíduos atendendo, desta forma, à Química Verde (MALDANER; JARDIM, 2012).

Uma aplicação da LC-MS recente foi a utilização de metabólitos secundários de *Streptomyces* para classificação quimiotaxonômica (Lee 20015). Assim, esse estudo demonstrou que esse tipo de classificação baseada em metabólitos é uma ferramenta eficaz para distinguir *Streptomyces spp.* e para determinar os metabólitos específicos da espécie (Lee 2015). Além das análises exploratórias, estudos específicos para a descoberta de novas classes de compostos, como antibióticos produzidos a partir de micro-organismos também têm sido desenvolvidos, sendo que a LC-MS é amplamente empregada na caracterização desses novos compostos (ZUNIGA et al., 2017).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os processos e as etapas necessárias para a realização deste trabalho estão esquematizados na Figura 9 e descritos a seguir.

Figura 9- Fluxograma das etapas de metodologia.



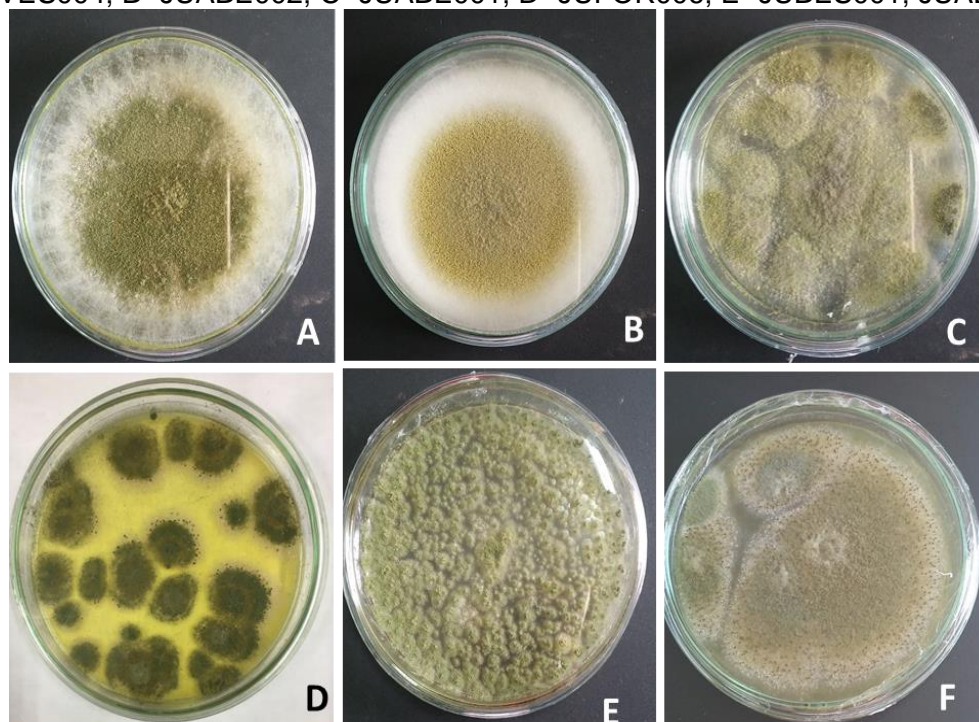
Fonte: Autoria própria.

Os experimentos foram realizados no laboratório de Química de Microrganismos e Bioatividade (QuiMiBio), na Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) Câmpus Londrina e no Instituto Agrônomo do Parana (IAPAR - Londrina, Paraná).

4.1 Coleta e conservação do material biológico

As unidades formadoras de colônias (UFCs), isoladas dos insetos, foram repicadas em meio BDA (batata, dextrose e ágar) (Figura 10). Cada UFC foi codificada com a nomenclatura dada aos novos isolados, composta pelo prefixo JU, referente ao nome da orientadora, e um sufixo numérico, que corresponde à ordem de isolamento. A parte central na nomenclatura refere-se ao material de origem do fungo, corresponde ao inseto em que foi isolado: JUVES004 (isolado de vespa do gênero *Spheciformes* sp.) JUABE001, JUABE002 e JUABE 007 (isolado de abelha do gênero *Anthophila* sp.), JUFOR006 (isolado de formiga do gênero *Formica* sp.), JUBES001 (isolado de besouros do gênero *Amblytelus* sp). Os insetos foram coletados na entrada principal do Câmpus Londrina UTFPR e no bairro Gleba Fazenda Palhano, Londrina-Paraná.

Figura 10- Cepas fúngicas isoladas de insetos e conservadas em meio BDA; A- JUVES004; B- JUABE002; C- JUABE001; D- JUFOR006; E- JUBES001; JUABE 007.



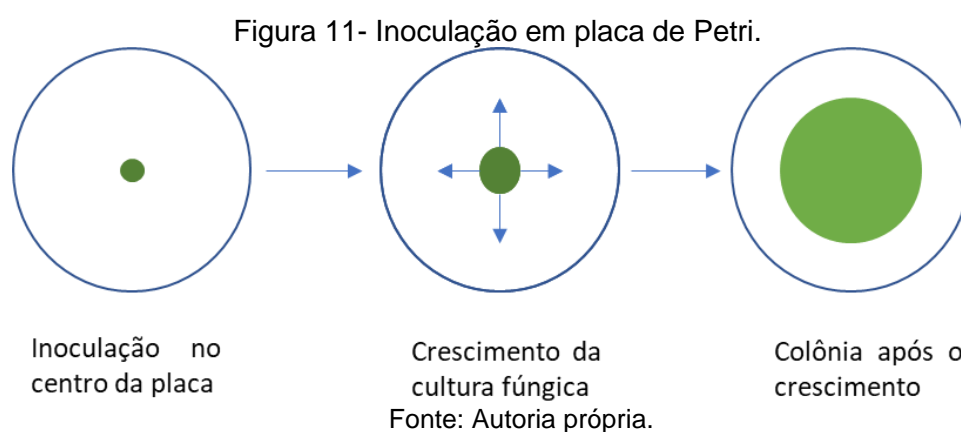
Fonte: Autoria própria.

4.2 Conservação dos isolados

Os isolados fúngicos entomopatogênicos foram conservados a partir de três metodologias, para realização deste trabalho e posteriores. O primeiro método de

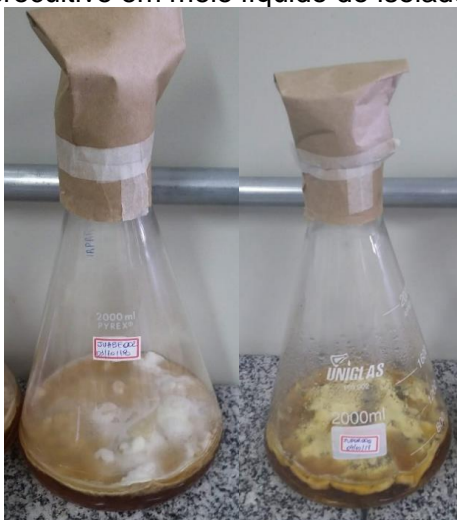
conservação foi, a inoculação das culturas fúngicas em placas de Petri contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar). A segunda foi a inoculação em tubos de ensaio contendo meio BDA e óleo mineral, a terceira em água destilada, método Castellani (RODRIGUES; LÍRIO; LACAZ, 1992) de forma a manter os isolados fúngicos viáveis por longos períodos. Esses fungos foram armazenados na micoteca do laboratório QuiMiBio da UTFPR- Londrina.

Os isolados fúngicos obtidos a partir de insetos mortos (Figura 10), foram previamente identificadas como pertencentes ao gênero de *Metarhizium* e cultivados e seis placas de Petri para cada isolado, contendo meio BDA à 25° C (figura 11), e após sete dias foi realizado o pré-inóculo.



Após o cultivo em placas, foram coletados cinco fragmentos do meio de cultivo, contendo o isolado fúngico em cada uma das placas e foram transferidos para seis pré-inóculos, cada isolado fúngico foi inoculado em 100 ml de meio líquido suplementado, dividido em dois frascos Erlenmeyer (250ml), contendo: 3,0 g de glicose; 0,2 g de bactopectona; 0,1 g de extrato de levedura; 0,05 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,05 g de KH_2PO_4 . Os frascos foram incubados em agitador rotativo (200 rpm), durante sete dias. Os pré inóculos foram transferidos para o macro cultivo em 2 litros de meio líquido contendo os mesmos nutrientes presentes no pré inóculo (60 g glicose; 4 g bactopectona; 2 g extrato de levedura; 1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 1 g KH_2PO_4), mantidos por 15 dias de modo estático, em temperatura ambiente, sendo realizada uma leve agitação diária (figura 12) (DANIEL et al., 2016).

Figura 12 – Macrocultivo em meio líquido do isolado JUABE007.



Fonte: Autoria Própria.

4.4 Obtenção dos extratos fúngicos

Após o término do processo anterior (4.3), os micélios foram separados por filtração à pressão reduzida, e a fase líquida foi submetida à extração líquido-líquido com acetato de etila (EtOAc) 3 vezes (1 Litro para cada extração) como demonstrado na Figura 13, a fase inferior representa o meio líquido no qual foram cultivados os isolados fúngicos e na fase superior obtém extratos após a destilação à vácuo.

Figura 13- Separação do extrato líquido.



Fonte: Autoria própria.

Os micélios fúngicos foram submetidos ao processo de congelamento e desidratação para a sublimação do gelo para retirada da água (Liofilização). Após a liofilização, as massas miceliais foram extraídas com metanol (meOH) 4 vezes (100 ml). O solvente orgânico acetato de etila e metanol foram evaporados por destilação à vácuo a $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$, utilizando evaporador rotativo.

Através do preparo de extratos foram obtidas as seguintes massas (g) dos extratos, dispostos na Tabela 1:

Tabela 1- Massas dos seis isolados fúngicos extraídos com acetato e metanol.

Fungo	Acetato (g)	Metanol (g)
JUBES001	3,9153	4,2358
JUABE001	5,4412	4,7370
JUABE002	3,9153	5,2314
JUABE007	3,8053	4,9974
JUFOR006	6,2356	5,2658
JUVES004	3,8031	8,2525

Fonte: Aatoria própria.

4.5 Bioensaio inseticida

Para a realização do ensaio de atividade inseticida dos isolados fúngicos (JUVES004, JUABE001, JUABE002, JUABE 007 e JUBES001) foram necessárias as seguintes atividades descritas a seguir: Criação de insetos (barriga-verde), obtenção de esporos para inoculação em insetos, montagem de ensaio envolvendo comparação com inseticida.

4.5.1 Criação de *D. melacanthus*

As posturas de *D. melacanthus* para a realização do experimento foram obtidas de uma colônia pertencente ao laboratório de criação de insetos do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) Londrina, Paraná. A criação dos insetos ocorreu com dieta composta por grãos de soja, amendoim e feijão-de-vagem. Esses indivíduos desenvolveram-se em condições controladas de temperatura ($25 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$), umidade relativa ($60 \pm 10\%$) e fotofase (14h).

4.5.2 Preparo das soluções inseticidas

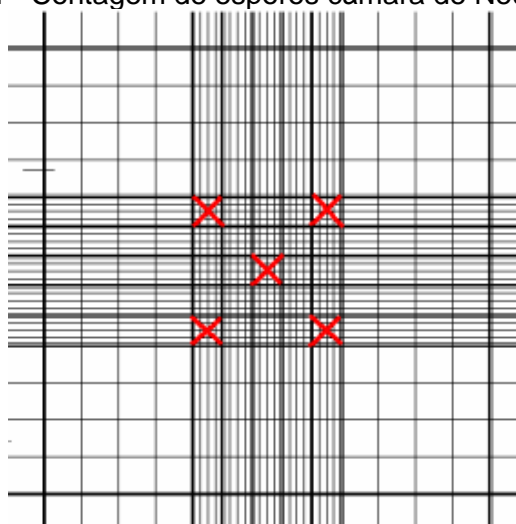
4.5.2.1 Obtenção de esporos

Os isolados fúngicos (JUVES004, JUABE001, JUABE007, JUFOR006, JUABE002 e JUBES001) foram inoculados em placas de Petri contendo meio BDA e incubados por sete dias a 25 °C em estufa. Foram adicionadas 10 ml de água destilada em cada placa, e com auxílio de uma alça de platina, realizou-se raspagem do micélio, para remoção dos esporos. O conteúdo das placas foi transferido para béqueres estéreis, e completado com água destilada até um volume de 30 ml, para o fungo JUABE 002, e volume de 50 ml para os demais isolados.

4.5.2.2 Determinação da densidade de esporos

A partir dessa suspensão fúngica, 1 µL de cada amostra foram adicionados à câmara para contagem diferencial, figura 14, em microscópio luminoso segundo a fórmula: Contagem de esporos = média do núm. total de esporos nos cinco pontos selecionados * $(2,5 * 10^5)$ [esporos/ ml].

Figura 14 - Contagem de esporos câmara de Neubauer.



Fonte: Autoria própria.

Os esporos fúngicos para o teste bioinseticida obtiveram as seguintes densidades: JUVES004: $107,8 * 10^5$; JUABE001: $179,0 * 10^5$; JUABE007: $62,3 * 10^5$; JUFOR006:

76,0*10⁵; JUABE002: 378,0*10⁵; JUBES001: 108,0 *10⁵ (Esporos/ ml), para cada um dos isolados.

4.5.3 Preparo das soluções

Foram preparadas soluções com extratos sendo esses pesados 5 mg dos extratos: acetato (JUVES004. JUABE007) e metanol (JUFOR006, JUABE 001) diluídos em 1ml de Dimetil sulfóxido (DMSO) e três gotas de Tween para dissolver os extratos a um volume de 30 ml de solução para cada um dos extratos, para aplicação nos tratamentos.

4.5.4 Teste Inseticida

A atividade inseticida foi testada a partir da solução com a suspensão de esporos dos seis isolados fúngicos entomopatogênicos foram testados contra o inseto *D. melacanthus*. O delineamento utilizado foi de blocos inteiramente casualizados, com 14 tratamentos e 5 repetições (Tabela 2).

Tabela 2- Tratamentos aplicados sobre cada uma das repetições.

Tipos De Tratamentos
Água destilada
Engeo pleno
Testemunhas
Dmso/tween
Esporos JUVES004
Esporos JUABE 001
Esporos JUABE 007
Esporos JUFOR 006
Esporos JUABE 002
Esporos JUBES 001
Extrato acetato JUVES 004
Extrato acetato JUABE 007
Extrato metanólico JUFOR 006
Extrato metanólico JUABE 001

Fonte: Autoria Própria.

Cada repetição consistiu em uma caixa acrílica (11x 11x 3,5 (cm)), forrada com papel filtro, contendo cinco ninfas de *D. melacanthus*, dieta contendo 4 grãos de soja,

2 grãos e amendoim e 1 vagem de feijão, e um recipiente contendo algodão embebido em água destilada como apresentado na Figura 15.

Figura 15- Representação da réplica para avaliação do teste inseticida.



Fonte: Autoria própria.

Os tratamentos foram aplicados sobre a caixa acrílica aberta, utilizando borrifador spray, sendo realizadas 3 aplicações de acordo com cada tratamento, propiciando gotas finas sobre a superfície das ninfas de *D. melacanthus*. O tratamento 1 foi borrifada água destilada, atuando como controle para os tratamentos contendo esporos fúngicos. O tratamento 2, inseticida Engeo Pleno S TM (Lambda Cialotrina 106 g/L + Tiametoxam 141 g/L) foi utilizado como controle negativo a uma concentração de 0,125%. Já os tratamentos 3 e 4 correspondem a testemunhas positivas: sendo que 3 não recebeu nenhum tratamento e o tratamento 4 contém o branco da solução utilizado para dissolver os extratos, contendo 1 ml de DMSO (Dimetil sulfóxido) e três gotas de Tween.

Para os tratamentos 5 ao 10 foram preparadas 5 soluções contendo, 1 ml de DMSO, três gotas de Tween e 5 mg de cada um dos extratos de JUVES004, JUABE 007, JUFOR006 e JUABE001.

O ensaio foi mantido em sala climatizada com 28 °C de temperatura. Os insetos foram monitorados diariamente, durante dez dias para verificar a mortalidade. Durante esse período foram verificadas, a dieta e a umidade de cada caixa.

Os insetos mortos passaram pelo processo de assepsia externa (mergulhados em álcool 70%) e posteriormente foram colocados em câmara úmida conforme Figura 16 contendo algodão umidificado em água destilada, para verificar a esporulação de fungos sobre o inseto após a sua mortalidade aplicadas aos tratamentos.

Figura 16 -Câmara úmida.



Fonte: Autoria própria.

Os dados foram submetidos a análise estatística para confirmação dos dados de mortalidade através do teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.6 Identificação molecular dos extratos através da cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas LC/MS

Os doze extratos orgânicos dos seis isolados fúngicos foram diluídos em metanol 100% em concentração de 0,1 mg/ml. A seguir 5 ul/ml de cada amostra foi analisada em triplicata através do UHPLC/MSⁿ (Ultimate 3000 acoplado ao QExactive Plus, ThermoFisher). (Figura 17). O preparo das amostras e processamento de dados foi realizado em parceria com a Dr^a Geisa Caprini do Laboratório de Apoio ao

Desenvolvimento Tecnológico - LADETEC/ IQ – da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Figura 17- UHPLC/MSn (Ultimate 3000 acoplado ao QExactive Plus, ThermoFisher).



Fonte: <https://www.indiamart.com/proddetail/thermo-fisher-ultimate-3000-uhplc-system-13637763191.html>.

O sistema cromatográfico foi equipado com uma coluna RP C18 Synchronis (2,1 x 50 mm, 1,7 μ m, ThermoFisher), com fluxo de 400 μ l/min, aplicando-se como fase móvel A água miliQ com 5 mM de NH_4HCO_2 e 0,1% de ácido fórmico e fase móvel B Metanol e 0,1% de ácido fórmico através do gradiente 0-1 min: 5 % B; 1-21 min: 5-100 % B; 21-23: 100% B; 23-24 min: 100-5 % B; 24-28 min: 5 % fluxo de 0,4 mL min⁻¹.

As aquisições dos espectros de massa foram obtidas com ionização positiva, em faixa de 100-1500 m/z, com uma resolução de 70.000 no modo FullMS, AGC (atypical glandular cells (células glandulares atípicas) de 106 por no máximo 50 ms, e seleção dos 15 íons mais intensos para adquirir os espectros de fragmentação numa resolução de 17.500, AGC de 1,5 x 10³ a 10⁵ por até 100 ms. Os dados de massas gerados foram submetidos a busca através do software Compound Discoverer (ThermoFisher).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Bioensaio inseticida

A sobrevivência dos percevejos *D. melacanthus* nos diferentes tratamentos não foi significativamente influenciada pelos tratamentos biológicos e químicos borrifados sobre as caixas, exceto pelo tratamento com Engeo pleno (controle negativo). Durante todo o período de análise (10 dias), a mortalidade foi maior no segundo dia totalizando 56 mortes somando todos os tratamentos e controles. Os dados médios de mortalidade dos insetos estão dispostos. As testemunhas apresentaram um alto índice de mortalidade, o que confirma a ideia de não significância entre os tratamentos Tabela 3.

Tabela 3- Mortalidade média ao final do 10º dia de *D. melacanthus* em diferentes tratamentos com esporos fúngicos. Temp.: 25± 2°C; U.R.: 60±10%; fotofase: 14 h.

Tratamentos	Média
Engeo pleno	100 ^a
Testemunhas	52 ^b
Esporos JUABE 007	52 ^b
Esporos JUABE 001	52 ^b
Extrato a. JUABE 007	48 ^b
Extrato m. JUFOR 006	44 ^b
Esporos JUABE 002	40 ^b
Esporos JUVES 004	40 ^b
Água destilada	38 ^b
Extrato acetato JUVES004	36 ^b
Dmso/tween	36 ^b
Esporos JUFOR 006	36 ^b
Esporos JUBES 001	32 ^b
Extrato metanólico JUABE 001	28 ^b

Valores seguidos da mesma letra não apresentam diferença estatística, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, pelo teste de Tukey (P<0,05). Fonte: Autoria própria.

As porcentagens médias de mortalidade foram de 52 % em três tratamentos, considerando que as testemunhas deveriam ter apresentado baixa mortalidade. Isso pode ter ocorrido pois os insetos foram selecionados próximo da fase adulta, dessa forma os mesmos podem ter apresentado mortalidade natural.

Embora os fungos sejam de ampla ocorrência natural e possam ser encontrados em diversas espécies de insetos das diferentes ordens, os 6 isolados testados não foram considerados patogênicos ao percevejo *D. melacanthus*. Resultado semelhante foi obtido por Viegas et al., que não tiveram sucesso utilizando apenas um isolado de *M. anisopliae* frente ao percevejo *D. melacanthus* em seus experimentos. No entanto, há necessidade de se testar um número de isolados frente a outras fases de crescimento para avaliar seu verdadeiro controle de *D. melacanthus*. Devido à alta taxa de mortalidade dos tratamentos controle, que tiveram números aproximados aos dos tratamentos com o fungo *in vivo*, sendo necessário adotar outra metodologia para teste inseticida, e ou identificar as causas do resultado, através de análise química, ou biológica das cepas fúngicas.

No trabalho de Ávila e Duarte (2012), os maiores níveis de redução populacional do percevejo, aos três e dez dias, foram observados realizando também a infecção com inseticida na alimentação à base de milho, onde a alimentação ofertada aos percevejos era tratada com tiametoxam. Nestes tratamentos foram constatadas reduções populacionais do percevejo variando de 95,8 a 100%. Nos demais tratamentos em que houve apenas a pulverização do inseticida, os níveis de redução populacional da praga foram baixos apenas com a menor dose testada, sendo não vantajoso para agricultura pois o tratamento de sementes com grandes quantidades de inseticidas compromete a eficiência na obtenção de inseticidas naturais. Apesar das análises não relatar valores significativos, analisando as repetições dos tratamentos com esporos, analisados individualmente pode-se perceber valores consideráveis de mortalidade de insetos para tratamentos com esporos (JUABE001 e JUABE 007), dispostos nas Tabelas 4.

Tabela 4 – Taxa de mortalidade insetos JUABE001.

Repetição	Vivo	Morto	%mortalidade
1	3	2	40
2	3	2	40
3	1	4	80
4	4	1	20
5	1	4	80
MÉDIA	2,4	2,6	52

Fonte: Autoria própria.

Na Tabela 5 é possível observar a mortalidade para os esporos das cepas fúngicas JUABE007, no qual apresentou uma porcentagem de mortalidade de 52 %.

Tabela 5 -Taxa de mortalidade insetos JUABE007.

Repetição	Vivo	Morto	%mortalidade
1	4	1	20
2	2	3	60
3	2	3	60
4	1	4	80
5	3	2	40
MÉDIA	2,4	2,6	52

Fonte: Aatoria própria.

Os fungos JUABE 001 E JUABE007 testados in vivo conforme as tabelas 4 e 5 obtiveram taxas de mortalidade de 52% cada, demonstrando possível potencial de controle biológico. O segundo teste inseticida com os extratos corrobora com o potencial do JUABE007 que também logrou taxas mais significativas no controle do percevejo.

No trabalho de Asha (2012), ao avaliar o efeito de extratos de algas do gênero *Ulva* em ninfas de percevejos do algodão, *D. cingulatus*, observou-se que as diferentes concentrações dos extratos apresentaram atividade inseticida, em relação à mortalidade. Apesar de ter apresentado 65,41% de mortalidade, o tratamento ulvana não obteve diferença significativa em relação ao controle. Tendo em vista que isso seria o mais aceitável para dizer que o polissacarídeo ulvana apresenta efeito sobre o percevejo *D. melacanthus*. Dessa forma, propõe-se que novos testes sejam feitos com insetos jovens, para obter assim resultados sobre o efeito inseticida do polissacarídeo ulvana. Segundo autor a concentração dos extratos nos insetos deve ser avaliada em diferentes concentrações de modo a verificar a dose letal que é aplicada obre as ninfas de *D. melacanthus*.

Nos tratamentos em que foram borrifados os esporos fúngicos ou extrato pode-se verificar uma taxa de mortalidade total de aproximadamente 42% e 36%, sendo que os isolados JUABE001 e JUABE007 atingiram 52% e o extrato JUABE007 atingiu 48%. Todos os tratamentos citados acima indicam possível potencial inseticida, podendo ser reavaliados posteriormente contra outros insetos, ou ínstar de crescimento inferiores aos quatro adotados nesse trabalho.

Foram isoladas do teste bioinseticida 10 novos isolados fúngicos, conservadas em três metodologias, e Placas de Petri contendo meio BDA, tubos inclinados com meio BDA acrescidos de óleo mineral e método Castellani (item 4.2).

5.3 Análise Metabolômica Microbiana

Foram detectados cerca de 300 metabólitos secundários provenientes dos extratos em cada amostra. No entanto, muitos dos analitos não foram identificadas pela inexistência nos bancos de dados pesquisados, os quais foram: Biocyc, CheEI, ChEMBL, HMDB, KEGG, LipidMAPS, MassBank, MetaboLights, PubMed, Yeast Metabolome Database, sendo necessária uma busca na literatura para cada metabólito manual, sendo identificados através dessa análise 200 compostos equivalente aos descritos na literatura.

Para analisar os compostos e analitos foram adotadas pesquisa global direcionadas para procura de dados, de metabólitos produzidos por dois gêneros fúngicos, *Metarhizium* (Tabela 6) e *Aspergillus* (Tabela 7), que foram obtidos através de pesquisas e os códigos de identificação de cada molécula foi obtida nos sites: Sci Finder e Pub Chem Sid.

A injeção de 1 µg/ml de amostra não apresentou resultados satisfatórios, sendo realizada uma nova injeção de 0,1 mg/ ml de amostra para real confirmação dos dados de analitos e compostos obtidos.

Tabela 6- Características das destruxinas produzidas por fungo do gênero *Metarhizium*, encontrados na literatura.

Destruxinas	Fórmula	Massa Específica (Da)	Pub chem cid¹	Cas²
Desmetildestruxina A	C ₂₇ H ₄₃ N ₅ O ₇	549,669	44575691	-
Desmetildestruxina B2	C ₂₇ H ₄₅ N ₅ O ₇	551,685	44575684	-
Destruxina A2	C ₂₈ H ₄₅ N ₅ O ₇	563,696	157382	-
Destruxina A3	C ₂₈ H ₄₇ N ₅ O ₇	565,712	101565000	148440-84-0
Destruxina A	C ₂₉ H ₄₇ N ₅ O ₇	577,723	71308749	-
Desmetildestruxina B	C ₂₉ H ₄₇ N ₅ O ₇	579,730	101306722	27482-48-0
Destruxina B2	C ₂₉ H ₄₉ N ₅ O ₇	579,739	157514	-
Destruxina A1	C ₃₀ H ₄₉ N ₅ O ₇	591,750	101427888	-
Destruxina E	C ₂₉ H ₄₇ N ₅ O ₈	593,722	46934590	-
Destruxina B	C ₃₀ H ₅₁ N ₅ O ₇	593,766	23306078	-
Desmetidestruxina C	C ₂₉ H ₄₉ N ₅ O ₈	595,730	102145471	148471-93-6
Destruxina C2	C ₂₉ H ₄₉ N ₅ O ₈	595,738	157513	-
Destruxina F	C ₂₉ H ₄₉ N ₅ O ₈	595,738	102145481	-

Destruxinas	Fórmula	Massa Específica (Da)	Pub Chem Cid¹	Cas²
Destruxina ED ₂	C ₂₈ H ₄₇ N ₅ O ₉	597,700	-	2130934- 26-6
Destruxina E1	C ₃₀ H ₄₉ N ₅ O ₈	607,749	102147752	-
Destruxina B1	C ₃₁ H ₅₃ N ₅ O ₇	607,780	102147802	79386-01-9
Destruxina D2	C ₂₉ H ₄₇ N ₅ O ₉	609,721	101366647	-
Destruxina C	C ₃₀ H ₅₁ N ₅ O ₈	609,765	101306723	-
Hidroxidestruxina B	C ₃₀ H ₅₁ N ₅ O ₈	609,765	101055478	-
Destruxina Ediol	C ₂₉ H ₄₉ N ₅ O ₉	611,737	101604155	-
Destruxina E2 chlorohydrin	C ₂₈ H ₄₆ CLN ₅ O ₈	616,153	132495843	-
Destruxina D	C ₃₀ H ₄₉ N ₅ O ₉	623,740	-	27482-50-4
Destruxina C1	C ₃₁ H ₅₃ N ₅ O ₈	623,780	-	2130934-25-5
Destruxina Ed ₁	C ₃₀ H ₅₁ N ₅ O ₉	625,750	-	207342-107
Destruxina D ₁	C ₃₁ H ₅₁ N ₅ O ₉	637,775	157512	-
[Beta-me-pro] destruxina E chlorohydrin	C ₃₀ H ₅₀ CLN ₅ O ₈	644,207	1609026	-
Destruxina G ₁	C ₃₂ H ₅₃ N ₅ O ₉	651,790	-	2130934-28-8
Pseudodestruxina C	C ₃₆ H ₅₅ N ₅ O ₇	669,850	-	918438-45-6
Pseudodestruxina B	C ₃₆ H ₅₅ N ₅ O ₇	669,864	9986956	-

¹Banco de dados de moléculas orgânicas; ² Chemical Abstracts Service - Serviço de Resumos Químicos; -Massa não encontrada; Fonte: Autoria Própria.

Os metabólitos encontrados para os fungos do gênero *Metarhizium* apresentam registros no Pub Chem Cid e CAS (*Chemical Abstracts Service* - Serviço de Resumos Químicos), usados como parâmetro para comparação das amostras de cada extrato com a literatura, classificados como compostos.

Os metabólitos produzidos pelo fungo *Aspergillus* foram identificados nos extratos, sendo necessária a análise para os metabólitos produzidos por esse fungo. As aflatoxinas para análise foram encontradas no banco de dados do Pub Chem Cid.

Tabela 7- Características dos metabólitos produzidos pelo fungo do gênero *Aspergillus*.

Aflatoxinas	Fórmula	Massa Específica (Da)	Pub chem cid¹
Aflatoxina B1	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312,277	186907

Aflatoxinas	Fórmula	Massa	
		Específica (Da)	Pub chem cid ¹
Aflatoxina B2	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314,293	2724360
Aflatoxina M1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328,276	15558498
Aflatoxina G1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328,276	14421
Aflatoxina G2	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330,292	2724362
Ocratoxina A	C ₂₀ H ₁₈ NO ₆	403,815	442530
Ocratoxina B	C ₂₀ H ₁₉ NO ₆	369,373	20966
Citrinina	C ₁₃ H ₁₄ O ₅	250,250	54680783

¹Banco de dados de moléculas orgânicas. Fonte: Autoria própria.

5.4.1 Extrato JUABE 002

Nos extratos produzidos pelo fungo JUABE 002 foram detectados 18 compostos, as massas são compatíveis aos compostos sintetizados pelos fungos dos gêneros *Metahrizium* (destruxinas) e *Aspergillus* (aflatoxinas).

Extrato acetato: 7 possíveis destruxinas e 3 possíveis aflatoxinas dos 683 analitos obtidos. Extrato metanólico: 6 possíveis destruxinas e 2 aflatoxinas de 300 analitos. A tabela 8, abaixo, descrevem as massas e a fórmula molecular dos metabólitos obtidos da cepa JUABE002.

Tabela 8- Destruxinas identificadas nos extratos acetato e metanólico da cepa JUABE002.

Fórmula	Destruxina	Extrato acetato	Extrato metanol
		Massa Específica (Da)	Massa Específica (Da)
C ₃₇ H ₆₉ N O ₄	Destruxina A1	591,52334	591,52299
C ₃₀ H ₄₇ N O ₉	Destruxina A2	565,32538	-
C ₃₈ H ₆₇ N ₅	Destruxina B	-	593,53826
C ₃₇ H ₆₅ N ₅ O	Destruxina C2	655,1850	-
C ₃₇ H ₇₁ N O ₅	Destruxina D2	-	609,53386
C ₃₃ H ₇₀ N ₇ O P	Destruxina ediol	611,54021	-
C ₃₈ H ₆₅ N ₅ O	Destruxina E1	607,51832	607,52836
C ₃₉ H ₆₈ O ₅	Destruxina E2 chlorohydrin	616,50739	616,5072
C ₃₉ H ₇₅ N O ₅	Destruxina G	637,56505	-
Fórmula	Aflatoxina	Extrato acetato	Extrato metanol

		Massa Específica (Da)	Massa Específica (Da)
$C_{13}H_{14}O_5$	Citrinina	250,0844	-
$C_{18}H_{24}N_4O$	Aflatoxina B1	312,19155	593,53826
$C_{17}H_{14}O_6$	Aflatoxina B2	314,07924	314,2284
$C_{28}H_{37}NO$	Ocratoxina A	403,28783	-

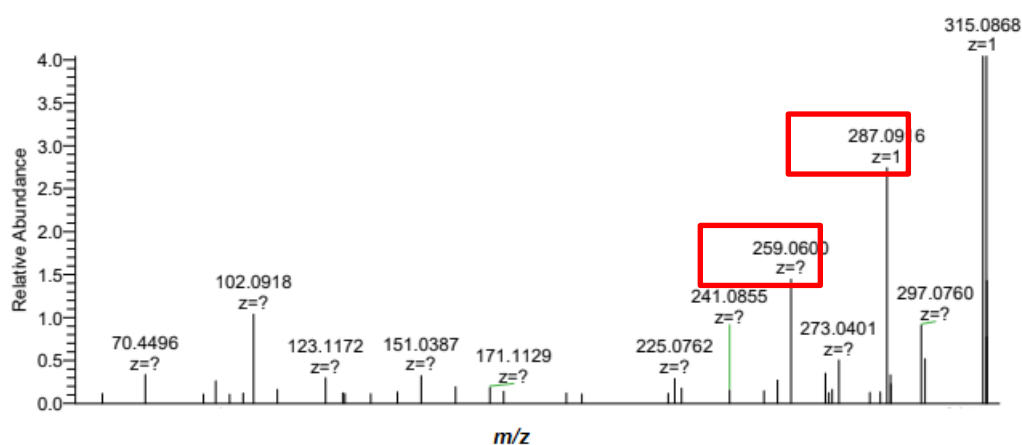
- Massa não encontrada. Fonte: Autoria própria.

A Tabela 8 caracteriza os metabólitos produzidos por fungo do gênero *Metarhizium*, quando comparado ao extrato acetato, verificou-se a presença de 5 destruxinas diferentes das encontradas em extrato acetato sendo elas, destruxina A2, C2, E1 e G. Ainda na Tabela 8, identificamos as aflatoxinas produzidas por fungos como: *Aspergillus alutaceus*, *Aspergillus ochraceus* (MARQUARDT; FROHLICH, 1992), embora também a produzam *Aspergillus melleus*, *Aspergillus sulphureus*, *Penicillium viridicatum*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium commune*, *Penicillium purpurecens*, *Penicillium palitans*, *Penicillium verrucosum*, entre outros (MOSS, 1996). Essas espécies fúngicas são produtoras de ocratoxinas, sendo elas, consideradas tóxicas.

A aflatoxina B2 é um composto sintetizado por fungos *Aspergillus flavus*, produtores de aflatoxinas do grupo B, *A. parasiticus* e *A. nomius*, produtores de aflatoxinas do grupo B e G (PITT, 1993).

Para a cepa JUABE002 foi possível obter um perfil de fragmentação de íons presentes nas amostras de extrato aceta, onde os íons observados no perfil de fragmentação da substância aflatoxina B2 (massa: 314,07924 Da) (Figura 18) correspondem aos íons notados para aflatoxina B2.

Figura 18- Apresenta o espectro de massa MS/MS (314,07924) da amostra para aflatoxina B2 em acetato – JUABE002.



Fonte: UHPLC/MSn (Ultimate 3000 acoplado ao QExactive Plus, ThermoFisher).

Os íons fragmentos mais abundantes são aqueles de m/z 287,0916 e 259,0600, que representam fragmentos da molécula de aflatoxina B2. Essas massas também foram encontradas no trabalho de Kokkonen, Jestoi e Rizzo (2005), m/z 286 e 259, semelhante aos obtidos neste trabalho.

5.3 Extrato JUABE 001

Dos extratos das cepas fúngicas JUABE001, foram detectados 9 micotoxinas. Em extrato acetato detectou-se: 4 possíveis destruxinas e 1 possível aflatoxina dos 324 analitos obtidos. Em extrato metanol: 2 possíveis destruxinas e 4 aflatoxinas de 224 analitos. Sugerindo a presença de duas espécies de fungo presentes no extrato. As massas são compatíveis aos compostos sintetizados pelos fungos dos gêneros *Metahrizium* (destruxinas) e *Aspergillus* (aflatoxinas) tabela 9.

Tabela 9- Destruxinas identificadas nos extratos acetato e metanólico da cepa JUABE001.

Fórmula	Destruxina	Extrato acetato	Extrato metanol
		Massa (Da)	Massa (Da)
$C_{28}H_{65}N_7O_3S$	Desmetildestruxina B	579,48674	-
$C_{31}H_{70}N_5O_3P$	Destruxina A1	591,52315	-
$C_{36}H_{72}N_3O_2P$	Destruxina C	-	609,53362
$C_{36}H_{72}N_3O_2P$	Destruxina D2	609,53341	-
$C_{39}H_{75}NO_5$	Destruxina D1	637,56343	-

Fórmula	Aflatoxina	Extrato acetato	Extrato metanol
		Massa Específica (Da)	Massa Específica (Da)
C ₃₉ H ₆₈ O ₅	Destruxina E2 chlorohydrin	616,50698	-
C ₁₄ H ₁₈ O ₄	Citrinina	250,12066	-
C ₂₁ H ₃₀ O ₂	Aflatoxina B2	-	314,2247
C ₁₅ H ₁₉ N ₃ O ₆ S	Ocratoxina B	-	369,0997

- Massa específica não encontrada.

Fonte: Autoria própria.

As destruxinas, Tabela 9, apresentam potentes atividades biológicas, como, atividade inseticida, fitotóxica, citotóxica contra células tumorais, atividade antiviral contra vírus da hepatite B, atividade inotrópica e ratos de acordo com Pedras (2002).

Os esporos secos do fungo em que estão presentes as destruxinas apresentam compostos de extremo interesse, tanto do ponto de vista estrutural como do ponto de vista de suas atividades biológicas, sendo consideradas uma classe de compostos importantes na sintetização desses compostos. (GALLO, 2002). No extrato em acetato detectou-se apenas uma possível aflatoxina, identificada como Citrinina diferente das aflatoxinas identificadas em extrato metanólico que constam na Tabela 9.

5.4 Extrato JUABE007

Dos extratos das cepas fúngicas JUABE007, foram detectados 8 compostos sintetizado por fungos, sendo em acetato: 4 possíveis destruxinas e 1 possíveis aflatoxinas dos 467 analitos obtidos. Em extrato metanol: não foram detectadas destruxinas e 3 aflatoxinas de 208 analitos. A tabela 10 demonstra as destruxinas encontradas no extrato em acetato.

Tabela 10- Destruixinas identificadas no extrato acetato da cepa JUABE007.

Fórmula	Destruixina	Extrato acetato
		Massa Específica (Da)
C ₂₄ H ₅₀ N ₅ O ₇ P	Desmetildestruixina B2	551,3464
C ₃₆ H ₇₂ N ₃ O ₂ P	Destruixina C	609,53389
C ₃₉ H ₆₈ O ₅	Destruixina E2 chlorohydrin	616,50693
C ₃₈ H ₇₆ N ₃ O ₂ P	Destruixina G	637,5647

No extrato em acetato detectou-se apenas uma possível aflatoxina, identificada como Citrinina, diferente das aflatoxinas identificadas em extrato metanólico. Mesma estrutura encontrada no extrato JUABE002 em acetato. A tabela 11 exemplifica os compostos sintetizados pelos fungos do gênero *Aspergillus*, presentes nos extratos acetato e metanólicos.

Tabela 11- Aflatoxinas identificadas nos extratos acetato e metanólico produzidos pela cepa JUABE007.

Fórmula	Aflatoxina	Extrato acetato	Extrato metanol
		Massa (Da)	Massa (Da)
C ₁₄ H ₁₈ O ₄	Citrinina	250,12066	-
C ₂₁ H ₃₀ O ₂	Aflatoxina B2	-	314,22479
C ₁₅ H ₁₉ N ₃ O ₆ S	Ocratoxina B	-	369,09963
C ₁₆ H ₁₅ N ₇ O ₂ S	Aflatoxina G2	-	330,20976

- Massa específica não encontrada. Fonte: Autoria própria.

O extrato em metanol detectou aflatoxinas B2 e G2, nas quais são encontradas sobre alimentos como, amendoins, milho, oleaginosas, especiarias e nos frutos secos, devido às condições de umidade e temperatura favorecerem o crescimento de espécies fúngicas sobre esses grãos. As espécies produtoras pertencem na sua maioria ao gênero *Aspergillus* e à secção *Flavi* (RODRIGUES et al., 2009).

5.5 Extrato JUBES001

Dos extratos das cepas fúngicas JUBES 001, detectou-se em acetato: 4 destruxinas, e 6 aflatoxinas, dos 374 analitos obtidos. Em extrato metanol 7 aflatoxinas de 295 analitos, não sendo identificados em extrato metanol Estruturas químicas pertencentes ao fungo do gênero *Metarhizium*. A tabela 12 exemplifica as destruxinas identificadas no produto da cepa JUBES001.

Tabela 12- Destruxinas identificadas no extrato acetato da cepa JUBES001.

Fórmula	Destruxina	Extrato acetato
		Massa (Da)
C ₂₄ H ₅₀ N ₅ O ₇ P	Desmetildestruxina B	595,91918
C ₁₄ H ₁₅ O ₁₈ P ₃ S	Destruxina D2	609,53394
C ₃₇ H ₇₁ N O ₅	Destruxina E2	616,50701
C ₃₉ H ₆₈ O ₅	Destruxina G	637,56465

Fonte: Autoria própria.

De acordo com o trabalho de Suzuki (1970), as destruxinas C, D e desmetildestruxina C, são estruturas formadas por ciclodespeptídeos inseticidas, produzidos por *Metarhizium anisopliae*. Sendo fungos dessa espécie potencialmente inseticidas natural. Devido a sua patogenicidade a diversos tipos de insetos.

A tabela 13 elucida os compostos encontrados no extrato metanol caracterizando os compostos como pertencentes aos produzidos por fungos do gênero *Aspergillus*.

Tabela 13- Aflatoxinas identificadas nos extratos acetato e metanólico da cepa JUBES001.

Fórmula	Aflatoxina	Extrato acetato	Extrato metanol
		Massa (Da)	Massa (Da)
C ₁₃ H ₁₄ O ₅	Citrinina	250,0843	250,15703
C ₁₇ H ₁₂ O ₆	Aflatoxina B1	312,0633	312,6326
C ₁₇ H ₁₄ O ₆	Aflatoxina B2	314,079	314,07914
C ₁₇ H ₁₂ O ₇	Aflatoxina G1	328,0586	328,05856
C ₁₇ H ₁₄ O ₇	Aflatoxina G2	330,074	330,07404
C ₂₂ H ₂₁ N ₅ O ₃	Ocratoxina A	403,1634	403,28773
C ₂₈ H ₃₇ N O	Ocratoxina B	-	369,09974

Fonte: Autoria própria.

5.6 Extrato JUFOR006

Dos extratos das cepas fúngicas JUFOR006, foram detectadas 24 micotoxinas. Sendo em acetato: 7 possíveis destruxinas e 6 possíveis aflatoxinas dos 413 analitos obtidos. Em extrato metanol: 5 possíveis destruxinas e 5 aflatoxinas de 492 analitos, ambos encontrados na Tabela 14.

Tabela 14- Destruxinas identificadas nos extratos acetato e metanolico da cepa JUFOR006.

Fórmula	Destruxina	Extrato acetato	Extrato metanol
		Massa (Da)	Massa (Da)
C ₂₄ H ₅₀ N ₅ O ₇ P	Destruxina A1	591,52293	591,5234
C ₃₇ H ₆₉ N O ₄	Destruxina B	593,53792	593,5385
C ₃₇ H ₇₁ N O ₄	Destruxina E1	607,51824	-
C ₃₇ H ₆₉ N O ₅	Destruxina D2	609,17766	609,4979
C ₃₄ H ₃₂ Cl N ₅ S ₂	Destruxina Ediol	611,54938	-
C ₃₇ H ₇₃ N O ₅	Destruxina D	623,54929	-
C ₃₇ H ₇₁ N O S ₂	Destruxina D2	-	609,4979

$C_{36} H_{47} N O_9$	Destruixina G	-	637,3248
$C_{34} H_{69} N_7 O_3$	Destruixina G1	651,54418	-
$C_{40} H_{69} N_5 O_2$	Destruixina A1	591,52293	-
Fórmula	Aflatoxina	Extrato acetato	Extrato metanol
		Massa (Da)	Massa (Da)
$C_{14} H_{18} O_4$	Citrinina	250,12063	-
$C_{17} H_{12} O_6$	Aflatoxina B1	312,06361	312,0636
$C_{17} H_{14} O_6$	Aflatoxina B2	314,0791	314,2248
$C_{18} H_{20} N_2 O_4$	Aflatoxina G1	328,14262	328,2354
$C_{17} H_{14} O_7$	Aflatoxina G2	330,07416	-
$C_{28} H_{37} N O$	Ocratoxina A	403,28753	403,2877
$C_{28} H_{37} N O$	Ocratoxina B	-	369,0998

- Massa específica não encontrada. Fonte: Autoria própria.

Alguns autores identificaram a Destruixina Ediol e destruxina G1 como destruxinas produzidas pelo fungo *Metarhizium brunneum*. As demais destruxinas são sintetizadas por fungos *Metarhizium anisopliae*. (WANG et al., 2018).

A maioria das destruxina é um inseticida e apresenta atividades fitotóxicas. Outras atividades biológicas incluem antimicrobiano, antitripanossômico, citotóxico, atividades imunossupressoras, antiproliferativas e antivirais. Destruixinas fornece uma base para o desenvolvimento de novos medicamentos contra a osteoporose, câncer ou como agentes de controle biológico (PEDRAS, 2002).

No extrato em metanol tabela 15, detectou-se menos aflatoxinas quando comparada ao extrato em acetato, isso se deve ao fato que as aflatoxinas serem extraídas nesse tipo de solvente orgânico. Porém ambas aflatoxinas encontradas nos extratos sejam oriundas do fungo *Aspergillus*.

5.7 Extrato JUVES004

Nos extratos produzidos pelo fungo JUAVES004, foram detectados 12 compostos, as massas são compatíveis aos compostos sintetizados pelos fungos. Extrato acetato: 2 possíveis destruxinas e 3 possíveis aflatoxinas dos 108 analitos obtidos. Extrato metanólico: 1 possível destruxinas e 6 aflatoxinas de 351 analitos. A Tabelas abaixo 15 descrevem as massas específicas e fórmula molecular dos metabólitos obtidos do extrato acetato.

Tabela 15- Destruxinas identificadas nos extratos acetato e metanol da cepa JUVES004.

Fórmula	Destruxina	Extrato acetato	Extrato metanol
		Massa (Da)	Massa (Da)
C ₄₀ H ₈₃ N	Destruxina A	577,65039	577,65300
C ₃₆ H ₄₇ N O ₉	Destruxina G	637,56564	-
Fórmula	Aflatoxina	Extrato acetato	Extrato metanol
		Massa (Da)	Massa (Da)
C ₁₄ H ₁₈ O ₄	Citrinina	-	250,0844
C ₁₇ H ₁₂ O ₆	Aflatoxina B1	312,06358	312,0634
C ₁₇ H ₁₄ O ₆	Aflatoxina B2	314,07934	314,0793
C ₁₈ H ₂₀ N ₂ O ₄	Aflatoxina G1	-	325,1187
C ₁₇ H ₁₄ O ₇	Aflatoxina G2	330,07425	330,0743
C ₂₈ H ₃₇ N O	Ocratoxina B	-	369,0998

- Massa específica não encontrada. Fonte: Autoria própria.

Já está bem estabelecido que *Metarhizium* e *Aspergillus* produzem numerosas micotoxinas frequentemente pertencentes à diferentes grupos. Por este motivo, métodos capazes de detectar várias toxinas em uma única etapa de preparo de amostra e detecção são muito desejáveis. Neste sentido, o sistema LCMS/MS parece ser a melhor ferramenta (ZÖLLNER; MAYER-HELM, 2006). O número destes tipos de métodos ainda é limitado devido à complexidade das matrizes como alimentos e amostras biológicas, bem como as diferenças químicas e físicas das diversas micotoxinas.

A busca de princípios bioativos de microrganismos é uma das áreas em que mais se investe nos países desenvolvidos, principalmente nas pesquisas de bioprospecção realizadas pelas indústrias farmacêuticas (DREYFUSS; CHAPELA, 1994). A utilização de produtos obtidos de fungos no controle biológico da agricultura vem crescendo de maneira marcante (POWELL, 1993). Destacam-se nesse processo a utilização de certos fungos como micoerbicidas, micoInseticidas ou micoparasitas. Devido à produção de grande quantidade e diversidade de metabólitos secundários, os fungos competitivos são considerados uma fonte valiosa de produtos com atividade farmacológica.

De acordo com as características micro-morfológicas de colônias, conídios e conidióforos as cepas fúngicas pertencem ao gênero *Aspergillus* seção *Flavi*(PITT,2009).

As micotoxinas são um grupo de substâncias que apresentam certa variabilidade nas características físico-químicas, por isso o desenvolvimento de

métodos para a determinação simultânea tem sido um desafio para os analistas. A técnica de análise metabolômica utilizando LC/MS, não necessita da limpeza das amostras. Vários trabalhos utilizando esta técnica foram publicados para análise de toxinas (ZÖLLNER; MAYER–HELM 2006).

Este trabalho foi publicado no VII SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA realizado de 11 a 13 de Setembro, na Universidade Estadual de Londrina- UEL. Com título: Análise Metabolômica De Extratos Orgânicos e Morfologia de Fungos Filamentosos Isolados de Insetos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Todos os isolados fúngicos previamente identificados como pertencentes ao gênero *Metarhizium spp*, apresentaram um potencial para atuar como inseticida natural. A metodologia do teste inseticida foi implementada na UTFPR/ IAPAR. Devido à alta taxa de mortalidade das testemunhas e dos tratamentos utilizados como controle, para futuros trabalhos, será repetido com uma concentração mais elevada de extratos. Também é necessário realizar o teste, in vivo, com os fungos isolados a partir da câmara úmida.

O gênero identificado para os seis isolados fúngicos foi *Aspergillus spp* e *Metarhizium spp*, devido à pesquisa dos metabólitos produzidos por esses dois gêneros fúngicos. A pesquisa metabolômica de fungos é importante para identificação dos fungos que parasitam insetos. Pesquisas futuras, como testes biológicos e inseticidas, com objetivo de substituir compostos químicos sintéticos e tóxicos por compostos de origem natural.

Uma abordagem simples baseada em espectrometria de massa de alta resolução foi proposta para a triagem de destruxinas e aflatoxinas conhecidas e a elucidação estrutural dessa classe de metabólitos foi estudada. Essa estratégia pode ser usada para avaliar a produção de metabólitos de fungos de entomopatogênicos, agentes de controle. Isso é de grande importância, mesmo que, no momento, não há informações suficientes sobre seus metabólitos. A estratégia proposta consistiu em um tratamento de amostra com base no processo de extração/partição e análise do extrato final utilizando um sistema UHPLC-Q-Exactive. O caminho da fragmentação de destruxinas também foi proposto e bancos de dados de acordo com a literatura foi construído incluindo massa exata, fórmula molecular e fragmentos de uma das massas do extrato em acetato com m/z (287,0916 e 259,0600) menções de cada destruição em conformidade com o via de fragmentação. Esse banco de dados foi utilizado para a identificação de 22 destruxinas conhecidas, 17 delas encontradas nesse trabalho. Encontrou-se também das 8 aflatoxinas descritas na literatura, das quais 7 foram identificadas nos extratos.

O trabalho realizado contribui para o desenvolvimento de meios alternativos de controle de praga por químicos sintéticos, o que contribuiu para uma agricultura mais saudável e sustentável, comprometida com o meio ambiente e saúde.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES. R. T.; FARIA M. **Pequeno Manual sobre Fungos Entomoatôgenicos**.
Platina. Df: Embrapa. 2010. 50 p.

ALVES. S. B. (Coord.) **Controle microbiano de insetos**. 2 ed. Piracicaba: FAELQ.
1998.1163p.

ASHA, Americo et al. **Biocidal activity of two marine green algal extracts against third instar nymph of *Dysdercus cingulatus* (Fab.) (Hemiptera: Pyrrhocoridae)**.
Jornal de Biopesticidas. Sao Paulo, p. 129-134. abr. 2012.

ÁVILA, C, J; PANIZZI, A, R. **Occurrence and damage by *Dichelops (Neodichelops) melacanthus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) on corn**.
Anais da Sociedade Entomológica do Brasil. v. 24. p.193-194. 1995.

ÁVILA, Crébio J.; DUARTE, Marcela M. Eficiência de inseticidas, aplicados nas sementes e em pulverização, no controle do percevejo barriga-verde *Dichelops melacanthus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae), na cultura do milho. **Bioassay**, On Line, p.1-6, jun. 2012. Anual. Disponível em: <https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:VaJVxdd_fNQJ:https://www.bioassay.org.br/bioassay/article/download/72/160+&cd=17&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br>. Acesso em: 17 set. 2019.

BARRIOS, Letícia Ferrazza. **Efeito do polissacarídeo ulvana sobre a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) e o percevejo barrigaverde, *Dichelops melacanthus* (Dallas, 1851) (Hemiptera: Pentatomidae)**. 2016. 34 f. TCC (Graduação) - Curso de Agronomia, Departamento de Agronomia, Universidade Federal da Fronteira Sul, Chapecó, 2016.

BIOLOGIA. Toda Toxina. 2012. Disponível em: <<https://www.todabiologia.com/saude/toxina.htm>>. Acesso em: 27 jul. 2019.

BRUSTOLIN, C.; BIANCO, R.; NEVES, P.m.o.j. **Inseticidas em Pré e Pós-Emergência do Milho (*Zea mays* L.), associados ao Tratamento de Sementes, sobre *Dichelops melacanthus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae)**. Revista Brasileira de Milho e Sorgo, [s.l.], v. 10, n. 3, p.215-223, 30 dez. 2011. Revista Brasileira de Milho e Sorgo. <http://dx.doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v10n3p215-223>.

CARVALHO, E, da S, M, ***Dichelops melacanthus* (Dallas, 1851) (Heteroptera: Pentatomidae) no sistema de plantio direto no sul do Mato Grosso do Sul:**

flutuação populacional. hospedeiros e parasitismo, 2007. 57p. Dissertação mestrado – Universidade Federal da Grande Dourados. Dourados. 2007.

COEX – Comitê Executivo de Fitossanidade do Rio Grande do Norte. Somando esforços para o desenvolvimento da fruticultura norterio-grandense. Mossoró: 2005. 9p. (Informativo).

DANIEL. Juliana et al. **Larvicidal Activity of *Beauveria bassiana* Extracts against *Aedes aegypti* and Identification of Beauvericins**. Journal Of The Brazilian Chemical Society. [s.l.]. p.1003-1013. 2016. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20160253>.

DELBONE. C. A.C.. LANDO. R. L. **Importância ecológica e evolutiva dos principais grupos de metabólitos secundários nas espécies vegetais**. Congresso de Educação do Norte Pioneiro. 10ª edição. UENP-CCNE-CLA Campus Jacarezinho. 2010. ISSN-1808-3579.

DREYFUSS, M.m.; CHAPELA, I.h.. Potential of Fungi in the Discovery of Novel, Low-Molecular Weight Pharmaceuticals. **Discovery Of Novel Natural Products With Therapeutic Potential**, [s.l.], p.49-80, maio 1994. Anual. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-7506-9003-4.50009-5>.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (Org.). **Controle Biológico**. 2015. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/tema-controle-biologico/sobre-o-tema>>. Acesso em: 27 abr. 2019.

ERTHAL JUNIOR. M.. GUARUS. IFF. **Controle biológico de insetos pragas. I Seminário Mosaico Ambiental: Olhares sobre o Ambiente**. Campos de Goyracazes. Rio de Janeiro. 2011

FARIA. M. R. de. MAGALHÃES. B. P. **O uso de entomopatogênicos no Brasil**. Rev. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento - nº 22 - setembro/outubro 2001.

GALLO. D.; NAKANO. O.; SILVEIRA NETO. S.; CARVALHO. RP.L.; BATISTA. G.C. de; BERTI FILHO. E.; PARRA. J.R.P; ZUCCHI. R.A.; ALVES. S.B. **Manual de entomologia agrícola**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres. 1988. 531p.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, 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, 2002, 920p

GRAVENA. S. **Os fungos no controle de insetos**. Cultivar. 2000. Disponível em <<http://www.grupocultivar.com.br/artigos/os-fungos-no-controle-de-insetos>> Acesso em 30 mar. 2018.

GROTH, Martin et al. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* isolates on *Nezara viridula* and *Dichelops melacanthus* in wheat crop. **Arquivos do Instituto Biológico**, [s.l.], v. 84, p.1-8, 17 nov. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657000032016>.

HO, Ying-ning; SHU, Lin-jie; YANG, Yu-liang. Imaging mass spectrometry for metabolites: technical progress, multimodal imaging, and biological interactions. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, [s.l.], v. 9, n. 5, p.1387-1398, 10 maio 2017. Anual. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/wsbm.1387>.

HOFFMAN E.; STROOBANT V., **Mass Spectrometry: Principles and Applications**, 3th Edition, John Wiley & Sons Ltd, 2007.

KAPOORE, Rahul Vijay et al. Influence of washing and quenching in profiling the metabolome of adherent mammalian cells: a case study with the metastatic breast cancer cell line MDA-MB-231. **The Analyst**, [s.l.], v. 142, n. 11, p.2038-2049, 04 fev. 2017. Anual. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c7an00207f>.

KHOOMRUNG, Sakda et al. Metabolomics and Integrative Omics for the Development of Thai Traditional Medicine. **Frontiers In Pharmacology**, [s.l.], v. 8, n. 5, p.1-11, 18 jul. 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2017.00474>.

KOKKONEN, Meri; JESTOI, Marika; RIZZO, Aldo. Determination of selected mycotoxins in mould cheeses with liquid chromatography coupled to tandem with mass spectrometry. **Food Additives And Contaminants**, [s.l.], v. 22, n. 5, p.449-456, maio 2005. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/02652030500089861>.

LEE, Mee Youn et al. Metabolomics-Based Chemotaxonomic Classification of *Streptomyces* spp. and Its Correlation with Antibacterial Activity. **Journal Of Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 25, n. 8, p.1265-1274, 28 ago. 2015. Semanal. Korean Society for Microbiology and Biotechnology. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1503.03005>.

LONDRINA. Pedro M. O. J. Neves. Instituto Agronômico do Paraná. **Utilização de beauveria bassiana no controle da broca-do-café hypothenemus hampei (ferrari) em lavoura de café no norte do paraná. 2005. Iapar.** Disponível em: <<http://www.sbicafe.ufv.br/handle/123456789/1919>>. Acesso em: 12 jun. 2019

LOPES. F. C. **Produção e análise de metabólitos secundários de fungos filamentosos.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. 2011.

LOPES. Adilson Lima (Org.). **Bactrocera carambolae infectada por Metarhizium anisopliae.** 2017. Embrapa Amapá. Disponível em: <https://www.embrapa.br/amapa/buscadeimagens//midia/busca/Metarhizium+anisopliae?p_auth=8phV06Cv>. Acesso em: 04 nov. 2018.

MASCARIN. G. M.. QUINTELA. E. D. **Técnica de produção do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* para uso em controle biológico.** Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão. 2013.

MARQUARDT, Ronald R.; FROHLICH, Andrzej A.. A review of recent advances in understanding ochratoxigenesis. **Journal Of Animal Science**, [s.l.], v. 70, n. 12, p.3968-3988, 1 dez. 1992. Anual. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.2527/1992.70123968x>.

MOSS, O.M. Mode of formation of ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, 13 (supplement), 5-9, 1996.

ORLANDELLI. R. C.. PAMPFILE. J. A. Fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* como agente de controle biológico de insetos pragas. **SaBios: Rev. Saúde e Biol.** v.6. n.2. p.79-82. mai./ago.. 2011.

PANIZZI, A. R. Suboptimal nutrition and feeding behavior of hemipterans on less preferred plant food sources. *Neotropical Entomology*, Londrina, v. 29, n. 1, p. 1-12, 2000.

PATTI. G.; et al. Innovation: Metalomics: the apogee of the omics trilogy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v. 13. n. 4. p. 263-269. 22 mar. 2012.

PEDRAS, M. Soledade C.; ZAHARIA, L. Irina; WARD, Dale E.. The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 59, n. 6, p.579-596, mar. 2002. Anual. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422\(02\)00016-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422(02)00016-x).

PITT, J.I. Corrections to species names in physiological studies on *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Journal of food Protection** 56:265–269. 1993.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. Fungi and Food Spoilage. Boston, **MA: Springer US**, 2009.

POWELL, K. A.. The commercial exploitation of microorganisms in agriculture. In: JONES, D. Gareth. **Exploration of Microorganisms**. 5. ed. Chapman And Hall: London: Springer, Dordrecht, 1993. Cap. 17. p. 441-459.

PINU, Farhana; VILLAS-BOAS, Silas; AGGIO, Raphael. Analysis of Intracellular Metabolites from Microorganisms: Quenching and Extraction Protocols. **Metabolites**, [s.l.], v. 7, n. 4, p.53-75, 23 out. 2017. Semestral. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/metabo7040053>.

PUNTENER. W. **Manual for field trials in plant protection**. Second edition. Agricultural Division Ciba-Geigy Limited. 1981.

RODRIGUES, P., VENÂNCIO, A., KOZAKIEWICZ, Z. and LIMA, N. 2009. A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section Flavi isolated from Portuguese almonds. **Int J Food Microbiol**. 129:187-193.

ROZA-GOMES, M. F.; SALVADORI, J. R.; PEREIRA, P. R. V. S.; PANIZZI, A. R. Injúrias de quatro espécies de percevejos pentatomídeos em plântulas de milho. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 41, n. 7, p. 1115-1119, 2011.

SUTTON, B. 1996. **A century of mycology**. Ed Cambridge University Press. USA. SUZUKI, Akinori; TAGUCHI, Hiroko; TAMURA, Saburo. Isolation and Structure Elucidation of Three New Insecticidal Cyclodepsipeptides, Destruxins C and D and Desmethyldestruxin B, Produced by *Metarrhizium anisopliae*. **Agricultural And Biological Chemistry**, [s.l.], v. 34, n. 5, p.813-816, maio 1970. Semestral. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/00021369.1970.10859690>.

VIANA, P.A.; COSTA, E.F. Controle da lagarta-docartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)(Lepidoptera:Noctuidae) na cultura do milho com inseticidas aplicados via irrigação por aspersão. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.27, n.3, p.451-458, 1998.

XU, Yong-jiang et al. Recent developments and applications of metabolomics in microbiological investigations. **Trac Trends In Analytical Chemistry**. [s.l.]. v. 56. n. 16. p.37-48. abr. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2013.12.009>.

WANG, Xiaohan et al. Structural Diversity and Biological Activities of Cyclic Depsipeptides from Fungi. **Molecules**, [s.l.], v. 23, n. 1, p.169-218, 15 jan. 2018. Anual. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules23010169>.

ZHANG, A. et al. Modern analytical techniques in metabolomics analysis. **The Analyst**. v. 137. n.2. p. 293-300. 2012.

ZÖLLNER, P.; MAYER-HELM, B. Trace mycotoxins analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmosphere pressure ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1136, p. 123-169, 2006.

ZUÑIGA, Cristal; ZARAMELA, Livia; ZENGLER, Karsten. Elucidation of complexity and prediction of interactions in microbial communities. **Microbial Biotechnology**, [s.l.], v. 10, n. 6, p.1500-1522, 19 set. 2017. Semestral. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1751-7915.12855>.