

Londrina, PR / Novembro, 2024

## Método para avaliação do impacto de compostos epicuticulares sobre fungos entomopatogênicos no filoplano





*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Soja  
Ministério da Agricultura e Pecuária*

ISSN 2176-2937

## **Documentos 469**

Novembro, 2024

# **Método para avaliação do impacto de compostos epicuticulares sobre fungos entomopatogênicos no filoplano**

---

*Guilherme Julião Zocolo  
Tamires Doroteo de Souza  
Daniel Ricardo Sosa-Gómez*

**Embrapa Soja**  
Londrina, PR  
2024

### **Embrapa Soja**

Rod. Carlos João Strass, s/n  
Acesso Orlando Amaral, Distrito da Warta  
CEP 86065-981  
Caixa Postal 4006  
Londrina, PR  
Fone: (43) 3371 6000  
www.embrapa.br/soja

www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações da Embrapa  
Soja

Presidente  
*Roberta Aparecida Carnevalli*  
Secretária-executiva

*Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite*

Membros

*Claudine Dinali Santos Seixas, Clara Beatriz  
Hoffmann-Campo, Fernando Augusto  
Henning, Ivani de Oliveira Negrão Lopes,  
Leandro Eugênio Cardamone Diniz, Maria  
Cristina Neves de Oliveira, Mônica Juliani  
Zavaglia Pereira e Norman Neumaier*

Edição executiva

*Vanessa Fuzinatto Dall' Agnol*

Revisão de texto

*Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite*

Normalização

*Valéria de Fátima Cardoso*

Projeto gráfico

*Leandro Sousa Fazio*

Diagramação

*Marisa Yuri Horikawa*

*Ilustração da capa*

*Guilherme Julião Zocolo*

Publicação digital: PDF

### **Todos os direitos reservados**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,  
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

### **Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Embrapa Soja

---

Zocolo, Guilherme Julião

Método para avaliação do impacto de compostos epicuticulares sobre fungos entomopatogênicos no filoplano / Guilherme Julião Zocolo, Tamires Doroteo de Souza, Daniel Ricardo Sosa-Gómez – Londrina : Embrapa Soja, 2024.

25 p. – (Documentos / Embrapa Soja, ISSN 2176-2937 ; n. 469)

1. Fungo entomógeno. 2. Fungo para controle biológico. 3. Controle microbiano. I. Souza, Tamires Doroteo de. II. Sosa-Gómez, Daniel Ricardo. III. Título. IV. Série.

CDD (21. ed.) 576

---

# Autores

---

## **Guilherme Julião Zocolo**

Bacharel em Química, doutor em Química Analítica, pesquisador da Embrapa Soja, Londrina, PR.

## **Tamires Doroteo de Souza**

Engenheira-florestal, mestre em Agronomia (Entomologia Agrícola), doutoranda em Ciências (Entomologia) pela Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

## **Daniel Ricardo Sosa-Gómez**

Graduado em Zoologia Agrícola, doutor em Ciências Biológicas, pesquisador da Embrapa Soja, Londrina, PR.



# Apresentação

---

O presente documento detalha uma metodologia inovadora para avaliar o impacto de compostos epicuticulares de plantas sobre a aderência e viabilidade de fungos entomopatogênicos. Esta técnica permite compreender como componentes da superfície foliar, como lipídios e ceras, interferem na eficácia desses fungos como agentes de controle biológico de pragas.

O método aborda desde a extração dos compostos epicuticulares até sua interação com fungos, promovendo uma análise detalhada dos fatores que influenciam a adesão e germinação dos conídios nas folhas de soja e algodão.

Desta forma, a Embrapa Soja disponibiliza a pesquisadores e estudantes a aplicação dessa metodologia, que permite isolar e caracterizar compostos que favorecem ou não a ocorrência de doenças que afligem populações de insetos-praga da soja e cultivos associados, contribuindo assim para os estudos de técnicas de controle microbiano de insetos de importância agrícola.

*Alexandre Lima Nepomuceno*

Chefe-geral

Embrapa Soja





# Sumário

---

Introdução .....	9
Metodologia .....	10
Extração de Lipídios Epicuticulares .....	10
Ensaio de Atividade dos Fungos nos Extratos .....	10
Avaliação de Viabilidade e Vigor dos Conídios .....	11
Controle e Padrões de Referência .....	13
Cromatografia dos Extratos Epicuticulares .....	13
Extração e Derivatização .....	14
Análise por CG-EM .....	16
Considerações finais .....	21
Referências .....	22



## Introdução

---

A incidência de epizootias (surto de doenças caracterizados por um número incomum de casos nas populações de insetos) em insetos-praga é um fenômeno cujas causas ainda são parcialmente compreendidas, especialmente no que diz respeito aos diversos fatores da planta hospedeira que influenciam a fixação, persistência, viabilidade, vigor e virulência das unidades infectivas dos fungos.

Estudos sugerem que os lipídios epicuticulares podem tanto favorecer quanto interferir na germinação de conídios de fungos entomopatogênicos, além de afetar suas aderência (Sosa-Gómez et al., 1997; Inyang et al., 1999) e virulência contra os insetos (Inyang et al., 1999).

Esses compostos também podem impactar aspectos morfológicos dos fungos, como o tamanho das células dos apressórios, nas etapas iniciais do processo de infecção (Inyang et al., 1999).

As interações entre planta, entomopatógeno e inseto hospedeiro são frequentemente complexas. Por exemplo, em plantas de ervilha (*Pisum sativum*), a prevalência do fungo *Pandora neoaphidis* foi maior em populações do pulgão *Acyrtosiphum pisum*, associadas a linhagens de ervilha com menor quantidade de cera epicuticular, em comparação com linhagens irmãs com maior produção de cera (Duetting et al., 2003).

Experimentos adicionais indicaram maiores adesão e germinação dos conídios de *P. neoaphidis* em superfícies foliares das linhagens com cera reduzida, o que pode explicar a maior taxa de infecção. No entanto, quando ceras de superfície extraídas, de ambas as linhagens, foram testadas em bioensaios, não houve diferença significativa na germinação dos conídios. Isso sugere que a interação depende do contexto específico e que as estratégias de adesão variam com os níveis de hidrofobicidade das superfícies. Por exemplo, *Zoophthora radicans* utiliza uma fixação mediada por materiais mucilaginosos hidrofílicos (Boucias; Pendland, 1998), enquanto fungos do gênero *Neozygitis* aderem por meio de papilas adesivas (Carner, 1976;

Boucias; Pendland, 1998; Kalkar, 2005). Essas diferenças representam variações significativas nas estratégias de aderência em relação aos conídios hidrofóbicos (Boucias et al., 1988).

O objetivo do trabalho foi definir um método para avaliar o impacto de compostos epicuticulares das plantas hospedeiras sobre a aderência e a viabilidade de propágulos de fungos entomopatogênicos.

## Metodologia

Etapas na avaliação das interações compostos epicuticulares com fungos entomopatogênicos

### Extração de Lipídios Epicuticulares

**Coleta e Preparação das Folhas:** As folhas ou folíolos devem ser lavados com solventes de polaridades variadas, como etanol e hexano. A extração com hexano, em particular, dissolve seletivamente os componentes da cera foliar. Para evitar a extração de componentes internos das células, os tempos de exposição devem ser curtos. Para cromatografia gasosa, é importante que os solventes utilizados sejam de pureza adequada.

**Determinação da Área Foliar:** A área foliar de cada folíolo deve ser mensurada para calcular a concentração de compostos extraídos por unidade de área foliar. Os pecíolos não devem ser incluídos, pois as lagartas consomem apenas a área foliar.

### Ensaio de Atividade dos Fungos nos Extratos

**Preparação das Lâminas de Cultura:** Aplique uma camada fina ( $\pm 2$  mm) de meio de cultura sobre lâminas de microscopia esterilizadas. Adicione 100  $\mu$ L dos extratos epicuticulares em cada lâmina. A seguir, nebulize microgotas de suspensão de conídios sobre os extratos (Figura 1). O meio de cultura deve ser adequado à espécie de fungo entomopatogênico: utilize SMAY (neopeptona, maltose, ágar e

extrato de levedura) para *Metarhizium rileyi* (Bell, 1975; Alves, 1986) e BDA (batata-dextrose-ágar) para espécies de *Beauveria*, *Metarhizium* e *Cordyceps* (Alves, 1986).

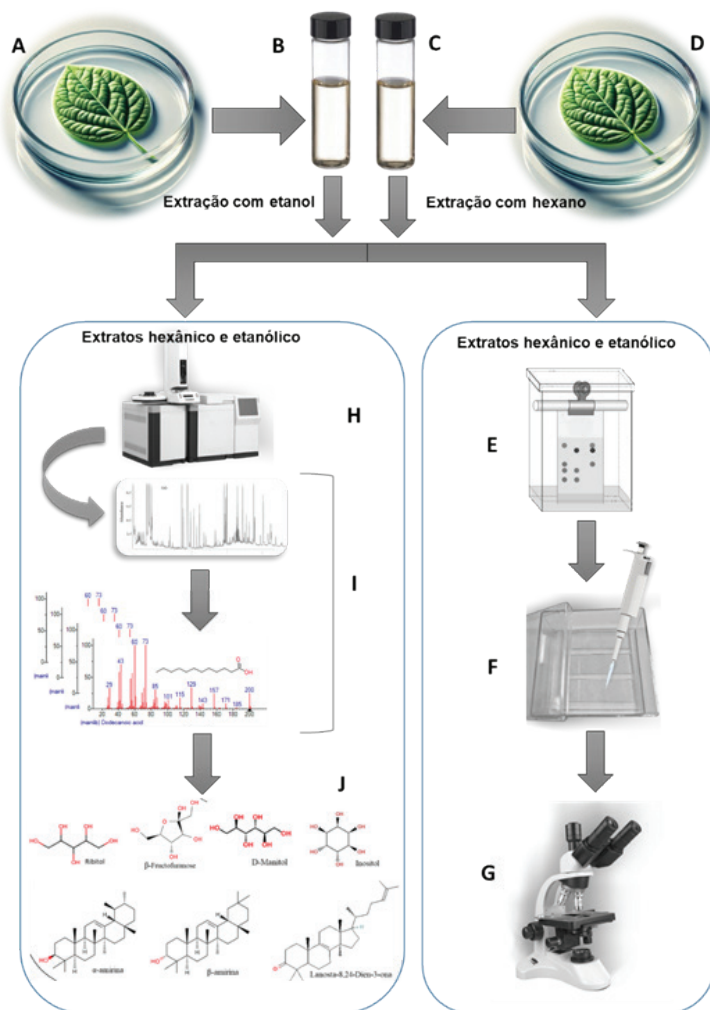
**Preparação e Aplicação da Suspensão de Conídios:** Raspe cuidadosamente as colônias fúngicas com uma espátula para remover os conídios sem extrair o meio de cultura, evitando a interferência de nutrientes no ensaio. Prepare a suspensão de conídios em água estéril com 0,01% de Tween 80, agitando vigorosamente por 1 minuto para homogeneizar. Aplique a suspensão com um nebulizador portátil (ex.: G-Tech Nebulizador Compact DC1) ou pulverizador Devilbiss, depositando finas gotículas sobre as lâminas com meio de cultura, dispostas em caixas de poliestireno (Gerbox, 11 cm x 11 cm x 3,5 cm). Inclua lâminas de controle para verificar a densidade de conídios depositados, utilizando microscópio óptico com aumento de 400x e contraste de fases, garantindo uma densidade de 20 a 30 conídios por campo.

**Manutenção das Lâminas:** As lâminas com o meio de cultura e conídios devem ser mantidas sobre papel de filtro estéril saturado com água autoclavada para garantir umidade constante. Prepare lâminas com agarose ultrapura 1,5% para aplicar apenas os extratos e verificar a presença de nutrientes, pois a agarose ultrapura não contém elementos que estimulam a germinação dos conídios.

## Avaliação de Viabilidade e Vigor dos Conídios

**Determinação da Viabilidade:** Após 16 a 24 horas, quantifique a viabilidade dos conídios observando 100 conídios por lâmina e considerando germinados aqueles com tubo germinativo superior ao diâmetro do conídio.

**Determinação do Vigor dos Conídios:** Para avaliação do vigor, desidrate os conídios em dessecadores a uma umidade inferior a 8% por 20 a 24 horas. Suspenda novamente os conídios e nebulize-os sobre os extratos, como descrito anteriormente. Mantenha as lâminas em condições de alta umidade e faça a quantificação em intervalos de 8 horas, classificando-os como:



**Figura 1.** Fluxograma das etapas de análise dos compostos cuticulares. Detalhes: 1A e 1B) Extração dos lipídios com etanol, 1C e 1D) Extração com hexano, 1E) Análise por cromatografia em camada delgada, 1F a 1G) Ensaio de atividade dos extratos em conídios, 1H a 1J) Identificação dos compostos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, utilizando a Espectrooteca NIST® para comparação de açúcares e terpenos.

- Conídios vigorosos: tubo germinativo longo, superior ao diâmetro ou largura do conídio.
- Conídios sem vigor: tubo germinativo curto, igual ou menor que o diâmetro dos conídios.

## Controle e Padrões de Referência

**Controles Positivos e Negativos:** Utilize controles positivos com meios ricos em nutrientes (BDA, SMAY ou YPSS) e controles negativos com suportes sem nutrientes (agarose ultrapura) para estabelecer parâmetros de comparação.

**Método de Redução de Teor de Água:** Para estimar o vigor, reduza o teor de água dos conídios para menos de 8%, como descrito por Faria et al. (2022), o que permite avaliar a tolerância ao dano por embebição. A desidratação dos conídios deve ser realizada em desidrador ou recipiente hermético com sílica-gel ou sulfato de cálcio por um mínimo de 6 horas ou overnight. A umidade final pode ser verificada com medidores de atividade de água, e as avaliações de vigor devem ser conduzidas em intervalos de 6 a 8 horas, com duração específica para cada espécie.

## Cromatografia dos Extratos Epicuticulares

### Cromatografia em Camada Delgada (TLC)

**Preparação da Câmara de Cromatografia:** A câmara de cromatografia deve estar saturada com a fase móvel e completamente fechada durante a corrida para evitar a evaporação da fase móvel e assegurar fluxo uniforme por capilaridade (Robards et al., 1994).

**Manuseio das Placas:** Use luvas para manusear as placas de sílica-gel, evitando contaminação com resíduos de gordura dos dedos.

**Escolha dos Eluentes:** Utilize como fase móvel uma solução de 2 partes de hexano para 1 parte de acetato de etila, ou 1 parte de hexano para 1 parte de acetato de etila, dependendo da polaridade desejada.

**Aplicação das Amostras:** As amostras devem ser aplicadas nas placas utilizando capilares graduados, a uma distância de 1 cm acima do nível do eluente.

**Visualização dos Compostos:** A visualização dos componentes pode ser realizada de forma não destrutiva, utilizando luz ultravioleta (254 nm ou 365 nm) ou luz negra (380-430 nm). Alternativamente, pode-se usar vapor de iodo para a visualização dos compostos.

**Eluição e Teste de Atividade Biológica:** Após a separação, os lípidios podem ser eluídos da sílica e submetidos a testes de atividade biológica, da mesma forma que os extratos originais.

## **Cromatografia a Gás Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)**

**Identificação de Compostos Ativos:** Compostos com atividade inibitória ou que favorecem a fixação, germinação e vigor dos fungos podem ser analisados por CG-EM para caracterização.

**Configuração da Análise:** Para identificar os compostos extraídos das folhas de algodão e soja que influenciam a fixação e germinação dos fungos, as frações são analisadas em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas operando em modo de ionização por impacto de elétrons (IE). A identificação qualitativa dos compostos é realizada por comparação com bibliotecas NIST e Wiley.

## **Extração e Derivatização**

### **Preparação dos Extratos**

**Pesagem e Solubilização:** Pese 10 mg de extrato seco (de hexano ou etanol) e transfira para frascos individuais. Solubilize cada extrato em 200 µL de piridina.

**Adição de MSTFA:** Adicione 200 µL de MSTFA (N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida) à solução com piridina.

**Incubação:** Incube a mistura em banho-maria a 37 °C por 30 minutos para derivatização.



**Filtragem e Armazenamento:** Filtre as amostras usando filtros de PTFE (porosidade de 0,20  $\mu\text{m}$ ) e armazene os filtrados em frascos de 2 mL a 4 °C por até 24 horas antes da análise por CG-EM.

## **Derivatização com MSTFA**

**Objetivo da Derivatização:** O processo de derivatização aumenta a volatilidade dos compostos com grupos funcionais polares (-OH, -SH, -NH e -COOH), tornando-os mais adequados para análise em CG-EM. O MSTFA reage com esses grupos, substituindo os hidrogênios ativos por grupos trimetilsilil (TMS), o que aumenta a volatilidade e a estabilidade.

**Necessidade de Oximação em Extratos Polares:** Em extratos polares contendo açúcares, recomenda-se uma reação de oximação antes da silylação para estabilizar as formas cíclicas de açúcares (como frutose e glicose), reduzindo o tautomerismo e evitando múltiplos picos.

**Reagentes de Oximação e Sililação:** Para garantir a precisão na análise, o cloridrato de metoxiamina e MSTFA são os reagentes preferidos para estudos metabolômicos (Dettmer et al., 2007; Ruiz-Matute et al., 2011).

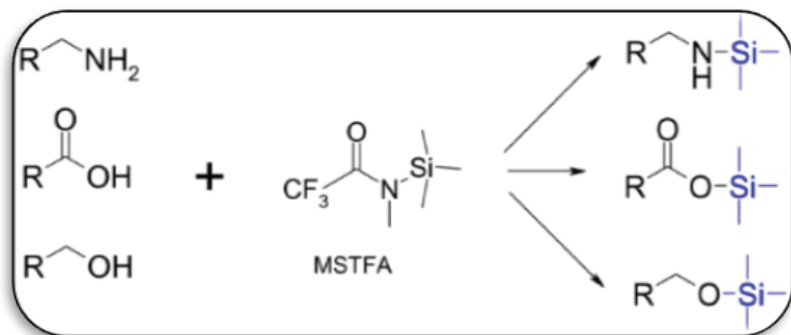
### **Reação de Derivatização:**

#### **Reagentes:**

MSTFA (*N*-Metil-*N*-(trimetilsilil) trifluoroacetamida)

Piridina (como solvente e base catalítica)

**Reação:** O MSTFA reage com grupos hidroxila, carboxila ou amina (Figura 2), substituindo o hidrogênio ativo por um grupo trimetilsilil (TMS). A piridina atua como catalisador básico, neutralizando o subproduto trifluoroacetato.



**Figura 2.** Esquema geral de derivatização química de metabólitos por silição usando derivados de trimetilsilil, por exemplo,  $N$ -metil- $N$ -(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA). A formação de derivados de MSTFA envolve o deslocamento de um grupo de saída  $N$ -metiltrifluoroacetamida pelo analito.

Esse procedimento facilita a análise por cromatografia gasosa, pois a derivatização aumenta a volatilidade dos compostos, permitindo uma detecção mais precisa no CG-EM.

## Análise por CG-EM

**Configuração da Coluna e Injeção:** A análise é realizada em uma coluna HP-5MS (5% fenil-metil polisiloxano), com dimensões de 30 m x 0,25 mm x 1,0  $\mu$ m (Agilent Technologies). O gás de arraste utilizado é o hélio, com fluxo de 1 mL/min. A injeção é feita no modo “split” (1:10), com volume de 1  $\mu$ L a uma temperatura de 260  $^{\circ}$ C.

**Perfil Térmico do Forno:** O forno inicia a 120  $^{\circ}$ C (mantido por 3 minutos) e é aquecido gradualmente a 320  $^{\circ}$ C, a uma taxa de 3  $^{\circ}$ C/minuto.

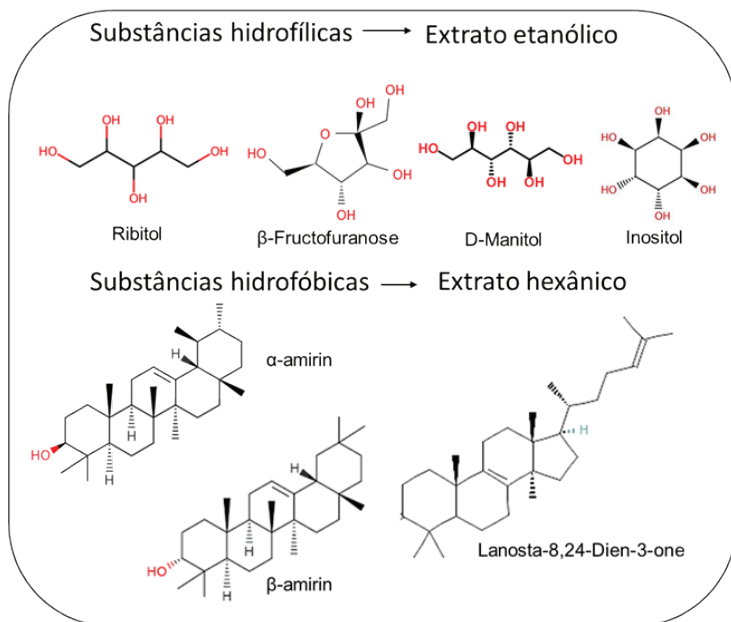
**Configuração do Espectrômetro de Massas:** Operando em modo de impacto de elétrons (IE) a 70 eV, o espectrômetro realiza varredura de massa entre 40 e 660 m/z.

**Identificação de Compostos:** A identificação dos derivados de trimetilsilano (TMS) é realizada por comparação com o banco de dados NIST (versão 2.0). Os índices de retenção linear (IRL) são

comparados com uma série de n-alcenos (C8-C30), conforme o método de Van Den Dool e Kratz (1963).

Como exemplo, foram analisadas as substâncias químicas presentes nos extratos etanólicos e hexânicos das folhas de algodão e soja, revelando uma composição complexa e distinta entre os solventes. Essa diferença pode ter implicações significativas no impacto e na interação das plantas com fungos entomopatogênicos.

A Tabela 1 apresenta, como exemplo, compostos identificados, com seus respectivos tempos de retenção ( $t_R$ ), índices de retenção (IR), picos principais de  $m/z$  e correspondências de percentuais relativos de área (%). A análise revelou uma variedade de compostos, cujas presença e intensidade variaram, conforme os procedimentos de fixação e germinação aplicados. A Figura 3 mostra as estruturas químicas dos compostos identificados.



**Figura 3.** Substâncias químicas identificadas nos extratos hexânico e etanólico, utilizadas para a extração da cera epicuticular das folhas de algodão e soja.

**Tabela 1.** Substâncias químicas identificadas nos extratos hexânico e etanólico, utilizados para a extração da cera epicuticular das folhas de algodão e soja, com seus respectivos tempos de retenção (tR em minutos), índices de retenção, íons representativos (m/z) e suas áreas relativas, além da porcentagem (%) de correspondência em relação ao banco de dados do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST 2.0) e índices de retenção (IR).

Pico	Substância <sup>1</sup>	tR (min)	IRexp	IRlit	R. Match <sup>2</sup>	Íons representativos (m/z)	Algodão Etano <sup>4</sup>	Algodão Hexano <sup>4</sup>	Soja Etano <sup>4</sup>	Soja Hexano <sup>4</sup>
3	Ribitol	19.29	1761	1766	91.6	73 (BP3), 103, 147, 205, 217, 307	-	-	+	-
4	β-Fructofuranose	22.38	1855	1856	90.9	73 (BP3), 147, 204, 217, 218, 437	-	-	++	-
7	D-Manitol	26.17	1974	1979	92.5	73 (BP3), 103, 147, 205, 217, 319	++	-	+	-
8	Inositol	26.87	1995	2000	68.3	43, 73 (BP3), 74, 88, 101, 217	+	-	++	+
12	β-Amirina	59.64	3346	3348	86.6	69, 73, 75, 203, 218 (BP3), 219	++	+	+	++
13	α-Amirina	60.31	3381	3382	91.5	73, 75, 189, 190, 218 (BP3), 219	++	+	+	++
14	Lanosta-8,- 24-Dien-3-ona*	61.16	>3000	3327	82.7	55, 69, 73 (BP3), 75, 95, 207	+	++	-	+

<sup>1</sup>Compostos como derivados de TMS; tR = tempo de retenção; IRexp = índice de retenção experimental; IRlit = índice de retenção da literatura; <sup>2</sup>R. Match é uma medida de confiança na identificação de um composto com base na comparação espectral com variação de 0% a 100%; <sup>3</sup>BP = Base peak (o íon mais abundante no espectro de massas, chamado de pico base é definido como 100%, e todos os outros picos são registrados em relação a este valor); 4++ = alta intensidade, + = baixa intensidade; - = não detectado.

Interações dos compostos epicuticulares com os fungos entomopatogênicos

A análise comparativa dos extratos das ceras epicuticulares das folhas de soja e algodão, ambas permissivas à ocorrência de epizootias causadas por *M. rileyi* (Allen et al., 1971; Devi et al., 2003), oferece informações importantes sobre fatores inerentes à planta que podem afetar a dinâmica desses fenômenos.

As relações com o microambiente de fungos entomopatogênicos têm sido escassamente estudadas e sua importância pode ter sido subestimada, uma vez que os fatores que operam no micro-habitat podem ter influência nos numerosos de casos de doença durante as enzootias/epizootias nas populações de insetos.

A composição química da epicutícula das folhas dos dois materiais, foi determinada pela extração com solventes polares e apolares, revelando uma variedade de compostos com características hidrofílicas e hidrofóbicas (Tabela 1 e Figura 3), os quais desempenham papéis essenciais na interação planta-entomopatogêno, influenciando diretamente a aderência, germinação e persistência dos fungos nas superfícies foliares.

Os resultados das análises por CG-EM indicaram uma variação significativa na presença de açúcares entre os extratos de soja e algodão (Tabela 1). A comparação das intensidades das substâncias nos extratos hexânico e etanólico das ceras epicuticulares dessas plantas revelou diferenças marcantes tanto na presença quanto na intensidade dos compostos analisados.

No algodão, as substâncias D-Manitol,  $\beta$ -Amirina e  $\alpha$ -Amirina apresentam alta intensidade no extrato etanólico, enquanto, no extrato hexânico,  $\beta$ -Amirina e  $\alpha$ -Amirina aparecem em baixa intensidade, e D-Manitol não é detectado. Já a substância Lanosta-8,24-Dien-3-ona exibe alta intensidade no extrato hexânico e baixa intensidade no etanólico.

Na soja,  $\beta$ -Fructofuranose é encontrada em alta intensidade exclusivamente no extrato hexânico, enquanto D-Manitol e Inositol aparecem em ambos os extratos, com alta intensidade no hexânico e baixa intensidade no etanólico.  $\beta$ -Amirina e  $\alpha$ -Amirina também são

detectadas com alta intensidade tanto no extrato etanólico quanto no hexânico, indicando uma distribuição mais uniforme desses triterpenos entre os solventes, o que sugere concentrações elevadas dessas substâncias na cera epicuticular das folhas de soja. Em contraste, Lanosta-8,24-Dien-3-ona não foi detectada no extrato etanólico e apresentou-se em baixa concentração no extrato hexânico.

A diferença na composição química entre os extratos pode impactar a eficácia dos fungos como agentes de controle biológico, pois influencia a capacidade de adesão desses microrganismos às superfícies foliares dos hospedeiros (Inyang et al., 2000). Açúcares, como  $\beta$ -frutofuranose e ribitol, contribuem para esse processo, seja como substratos energéticos ou, no caso do ribitol, participando no metabolismo de armazenamento de ácidos graxos (Corina; Munday, 1971).

As substâncias apolares encontradas em ambas as plantas são essenciais para a composição da cera epicuticular e aumentam a hidrofobicidade das folhas, o que facilita a adesão de conídios de fungos dos gêneros *Metarhizium*, *Beauveria* e *Cordyceps*. Esses fungos têm maior sucesso em superfícies com maior produção de compostos hidrofóbicos (Greenfield et al., 2014). No entanto, a presença de certos triterpenos pode dificultar a germinação de fungos entomopatogênicos devido às suas propriedades de defesa química (Andrade et al., 2017).

Além disso, interações com estearamidas (C15 a C21), originárias de *Psocoptera* como *Liposcelis bostrychophila* e de fungos entomopatogênicos, podem também resultar em redução da adesão dos conídios, evidenciando uma dinâmica complexa nessas interações (Lord; Howard, 2004).

A soja demonstrou uma composição química mais favorável à adesão de fungos entomopatogênicos em comparação ao algodão. Compostos como Inositol e Manitol, conhecidos por aumentarem a tolerância ao estresse oxidativo, termotolerância e resistência à luz UV-B, podem também contribuir para a virulência dos fungos (Rangel et al., 2006; Wang et al., 2012). Estudos anteriores indicam que superfícies hidrofóbicas, como as de plantas com maior quantidade de cera epicuticular, promovem maior adesão e persistência de fungos

entomopatogênicos com conídios aéreos secos (Holder; Keyhani, 2005).

Além disso, a presença do triterpenos Lanosta-8,24-Dien-3-ona em altas concentrações na cera epicuticular do algodão, sugere que essa molécula pode ter uma potencial para defesa química dessas plantas, desempenhando um papel significativo na resistência a fungos e bactérias patogênicos (Bawazeer; Rauf, 2021), ou seja, nesse caso a molécula em questão poderia afetar ao fungo entomopatogênico.

Estudos sobre a viabilidade e o vigor dos conídios, força de adesão ao substrato e interações com a microtopografia foliar podem fornecer informações relevantes sobre os impactos no processo epizootiológico. Evidências relatadas por Jeffree et al. (1975) indicam que, em estudos de recristalização de ceras epicuticulares, a estrutura cristalina é fortemente influenciada pelas propriedades químicas e físicas dos compostos, inerentes à cera em si, e não pelas características da membrana cuticular subjacente ou por mecanismos de extrusão ou transporte da cera para a superfície da planta. Assim, os comportamentos observados nesses estudos podem refletir respostas reais das plantas e auxiliar no entendimento das interações epicuticulares com agentes patogênicos.

## Considerações finais

Este documento apresenta um método para extrair, isolar e detectar compostos químicos presentes nas ceras epicuticulares de folhas de soja e algodão. Os resultados deste estudo evidenciam o papel crucial da composição química dos compostos epicuticulares na adesão e persistência de fungos entomopatogênicos em superfícies foliares. A diversidade de substratos vegetais, com diferentes perfis de açúcares, álcoois, ácidos graxos e triterpenos, pode atuar de maneira diferenciada, favorecendo ou dificultando processos como a adesão inicial, fixação, viabilidade e conidiogênese dos fungos (Wang et al., 2012). Esses achados corroboram a literatura existente, que destaca a influência dos níveis de hidrofiliabilidade/hidrofobicidade e

da composição química epicuticular na eficácia de fungos entomopatogênicos como agentes de biocontrole. Seja por meio de conídios secos, papilas adesivas ou estratégias de fixação baseadas em substâncias mucilaginosas, essas características químicas demonstram-se essenciais para a efetividade de tais agentes no controle de populações de insetos-praga. A compreensão aprofundada desses mecanismos abre novas perspectivas para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes e ambientalmente sustentáveis no manejo de pragas agrícolas.

## Referências

- ALLEN, G. E.; GREENE, G. L.; WHITCOMB, W. H. An epizootic of *Spicaria rileyi* on the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, in Florida. **Florida Entomologist**, v. 4, n. 2, p.189-191, 1971.
- ALVES, S. B. Técnicas de laboratório. In: ALVES, S. B. (coord.) **Controle Microbiano de Insetos**. São Paulo: Manole, 1986. p. 237-277.
- ANDRADE, B. S.; MATIAS, R.; CORRÊA, B. O.; OLIVEIRA, A. K. M.; GUIDOLIN, D. G. F.; ROEL, A.R. Phytochemistry, antioxidant potential and antifungal of *Byrsonima crassifolia* on soil phytopathogen control. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 1, p. 140-146, 2017. DOI: 10.1590/1519-6984.166532.
- BAWAZEER, S.; RAUF, A. In vitro antibacterial and antifungal potential of Amyrin-Type triterpenoid isolated from *Datura metel* Linnaeus. **BioMed Research International**, v. 1, 1543574, 2021. 5 p. DOI: 10.1155/2021/1543574.
- BELL, J. V. Production and pathogenicity of the fungus *Spicaria rileyi* from solid and liquid media. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 26, p. 129-130, 1975. DOI: 10.1016/0022-2011(75)90180-9.
- BOUCIAS, D. G.; PENDLAND, J. C.; LATGE, J. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 7, p. 1795-1805, 1988. DOI: 10.1128/aem.54.7.1795-1805.1988.



BOUCIAS, D. G; PENDLAND, J. C. Entomopathogenic Fungi: "Perfect" Phyla. In: BOUCIAS, D. G; PENDLAND, J. C. (ed.). **Principles of Insect Pathology**. Boston: Springer, 1998. p. 287-319. DOI: 10.1007/978-1-4615-4915-4\_9.

CARNER, G. R. A description of the life cycle of *Entomophthora* sp. in the two-spotted spider mite. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 28, n. 2, p. 245-254, 1976. DOI: 10.1016/0022-2011(76)90130-0.

CORINA, D. L; MUNDAY, K. A. Studies on polyol function in *Aspergillus clavatus*: a role for mannitol and ribitol. **Journal of General Microbiology**, v. 69, n. 2, p. 221-227, 1971. DOI: 10.1099/00221287-69-2-221.

DETTMER, K.; ARONOV, P. A.; HAMMOCK, B. D. Mass spectrometry-based metabolomics. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 26, n. 1, p. 51-78, 2007. DOI:10.1002/mas.20108.

DEVI, K. U.; MOHAN, C. H. M.; PADMAVATHI, J.; RAMESH, K. Susceptibility to fungi of cotton bollworms before and after a natural epizootic of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (Hyphomycetes). **Biocontrol Science and Technology**, v. 13, n. 3, p. 367-371, 2003. DOI: 10.1080/0958315031000110373.

DUETTING, P. S.; DING, H.; NEUFELD, J.; EIGENBRODE, S. D. Plant waxy bloom on peas affects infection of pea aphids by *Pandora neoaphidis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 84, n. 3, p. 149-158, 2003. DOI: 10.1016/j.jip.2003.10.001.

FARIA, M.; MASCARIN, G. M.; SOUZA D. A. de; LOPES, R. B. **Controle de qualidade de produtos comerciais à base de fungos para o manejo de invertebrados (insetos, ácaros, nematoides) em sistemas agropecuários**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2022. 48 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 377).

GREENFIELD, B. P. J.; LORD, A. M.; DUDLEY, E.; BUTT, T. M. Conidia of the insect pathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*, fail to adhere to mosquito larval cuticle. **Royal Society Open Science**, v. 1, n. 2, p. 140-193, 2014. DOI: 10.1098/rsos.140193.

HOLDER, D. J.; KEYHANI, N. O. Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to substrata. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5260-5266, 2005. DOI:10.1128/aem.71.9.5260-5266.2005.

INYANG, E. N.; BUTT, T. M.; BECKETT, A.; ARCHER, S. The effect of crucifer epicuticular waxes and leaf extracts on the germination and virulence of *Metarhizium anisopliae* conidia. **Mycological Research**, v. 103, n. 4, p. 419-426, 1999. DOI: 10.1017/S0953756298007333.

INYANG, E. N.; MCCARTNEY, H. A.; OYEJOLA, B.; IBRAHIM, L.; ARCHER, S. A. Effect of formulation, application and rain on the persistence of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* on oilseed rape. **Mycological Research**, v. 104, n. 6, p. 653-661, 2000. DOI: 10.1017/S0953756200002641.

JEFFREE, C. E.; BAKER, E. A.; HOLLOWAY, P. J. Ultrastructure and recrystallization of plant epicuticular waxes. **New Phytologist**, v. 75, p. 539-549, 1975. DOI: 10.1111/j.1469-8137.1975.tb01417.x.

KALKAR, O. An SEM study of the sporulation process of *Pandora neoaphidis* and *Neozygites freseni*. **Turkish Journal of Biology**, v. 29, n. 3, p. 137-147, 2005.

LORD, J. C.; HOWARD, R. W. A proposed role for the cuticular fatty Amides of *Liposcelis bostrychophila* (Psocoptera: Liposcelidae) in preventing adhesion of entomopathogenic fungi with dry-conidia. **Mycopathologia**, v. 158, n. 2, p. 211-217, 2004. DOI: 10.1023/b:myco.0000041837.29478.78.

RANGEL, D. E. N.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Growth of *Metarhizium anisopliae* on non-preferred carbon sources yields conidia with increased UV-B tolerance. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 93, n. 2, p. 127-134, 2006. DOI: 10.1016/j.jip.2006.05.011.

ROBARDS, K.; HADDAD, P. R.; JACKSON, P. E. **Principles and practice of modern chromatographic methods**. Amsterdam: Elsevier, 1994. 495 p.

RUIZ-MATUTE, A. I.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, O.; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, S.; SANZ, M. L.; MARTÍNEZ-CASTRO, I. Derivatization of carbohydrates for GC and GC-MS analyses. **Journal of**

**Chromatography B**, v. 879, n. 17-18, p. 1226-1240, 2011. DOI: 10.1016/j.jchromb.2010.11.013.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; BOUCIAS, D. G.; NATION, J. L. Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the Southern Green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 69, n. 1, p. 31-39, 1997. DOI: 10.1006/jjipa.1996.4619.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, p. 463-471, 1963. DOI: 10.1016/s0021-9673(01)80947-x.

WANG, Z. L.; LU, J. D.; FENG, M. G. Primary roles of two dehydrogenases in the mannitol metabolism and multi-stress tolerance of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 8, p. 2139-2150, 2012. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2011.02654.x.

