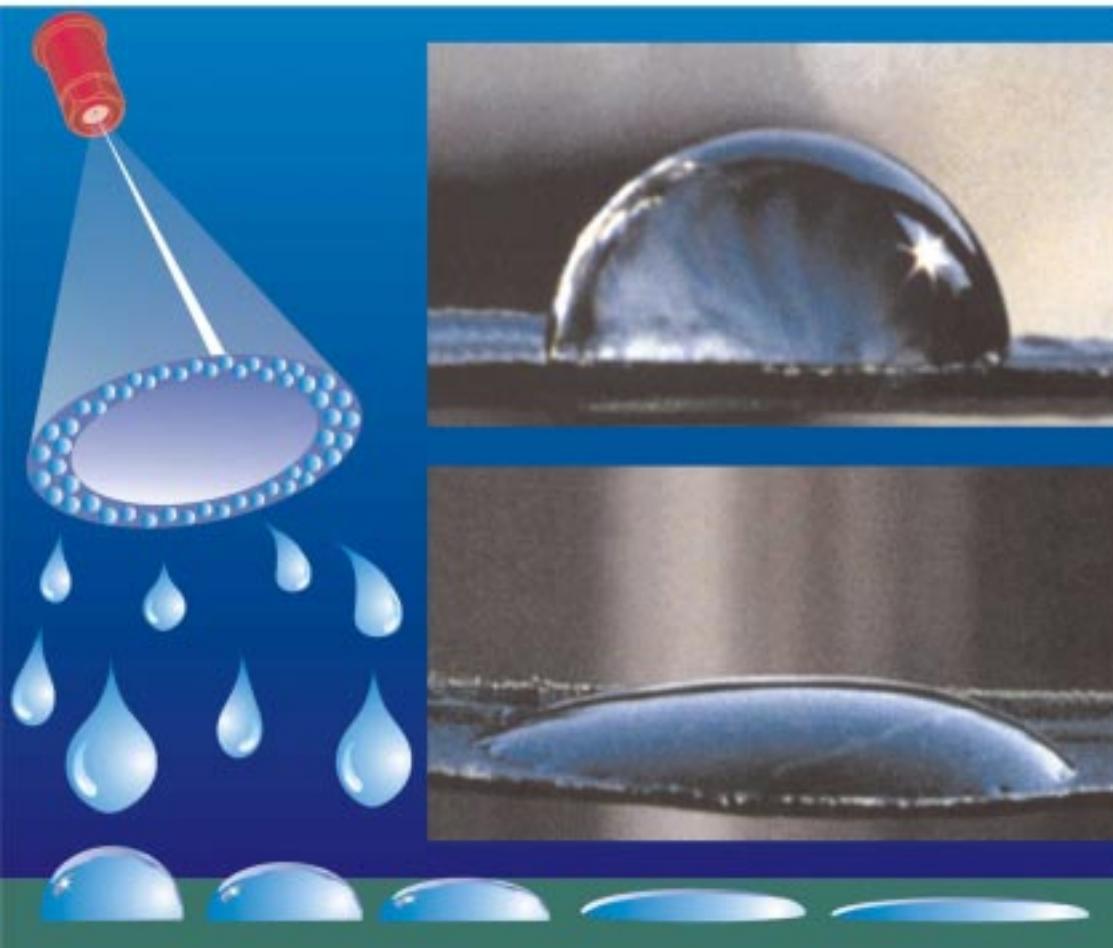


Espalhamento e Eficiência de uma Formulação de Fungo à Base de Óleo Adjuvante Emulsionável





*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

ISSN 1676-918X

Agosto, 2001

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 6

Espalhamento e Eficiência de uma Formulação de Fungo à Base de Óleo Adjuvante Emulsionável

Roberto Teixeira Alves
Maria Alice S. Oliveira
Roy Paul Bateman
Chris Prior
Simon R. Leather

Brasília, DF
2001

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Cerrados

BR 020, Km 18, Rod. Brasília/Fortaleza

Caixa Postal 08223

CEP 73301-970 Planaltina - DF

Fone: (61) 388-9898

Fax: (61) 388-9879

<http://www.cpac.embrapa.br>

sac@cpac.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Ronaldo Pereira de Andrade*

Secretária-Executiva: *Nilda Maria da Cunha Sette*

Membros: *Maria Alice Bianchi, Leide Rovênia Miranda de Andrade, Carlos Roberto Spehar, José Luiz Fernandes Zoby*

Supervisão editorial: *Nilda Maria da Cunha Sette*

Revisão de texto: *Maria Helena Gonçalves Teixeira /
Jaime Arbués Carneiro*

Normalização bibliográfica: *Dauí Antunes Correa*

Capa: *Wellington Cavalcanti*

Editoração eletrônica: *Leila Sandra Gomes Alencar /
Jussara Flores Oliveira*

Foto da capa: *Godschmidt Chemical Corporation*

1ª edição

1ª impressão (2001): tiragem 300 exemplares

Todos os direitos reservados.

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

CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Cerrados.

E77 Espalhamento e eficiência de uma formulação de fungo à base de óleo adjuvante emulsionável / Roberto Teixeira Alves ... [et al.]. – Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2001. 14 p. – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Cerrados, ISSN 1676-918X ; n.6)

1. Controle biológico - praga. 2. Praga - controle biológico. 3. Fungo - praga. 4. Micoinseticida. I. Alves, Roberto Teixeira. II. Série.

632.96 - CDD 21

© Embrapa 2001

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução	7
Material e Métodos	7
Resultados	9
Discussão	10
Conclusões	13
Referências Bibliográficas	13

Espalhamento e Eficiência de uma Formulação de Fungo à Base de Óleo Adjuvante Emulsionável

Roberto Teixeira Alves¹

Maria Alice Santos Oliveira²

Roy Paul Bateman³

Chris Prior⁴

Simon R. Leather⁵

Resumo - O objetivo deste trabalho foi quantificar duas vantagens (bom espalhamento e eficiência) do uso de formulações de fungo em óleos adjuvantes emulsionáveis (OAE) em relação a outras formulações utilizadas no controle biológico de pragas. O espalhamento de conídios do fungo *Metarhizium anisopliae*, formulados em diferentes concentrações (1%, 5%, 10%, 15%, 20% e 25%) de OAE Codacide®, foram comparados entre si, com uma formulação-padrão de água com 0,05% Tween 80, com uma formulação em óleo puro de amendoim e uma formulação da mistura de óleos minerais (50% Shellsol T e 50% Ondina EL) sobre uma superfície hidrofóbica de papel siliconado. Em seguida, realizou-se um bioensaio para comparação da eficiência das diferentes formulações de fungo, exceto a mistura de óleos minerais sobre larvas do coleóptero *Tenebrio molitor*. Os resultados demonstraram que os primeiros 30 minutos são suficientes para que as formulações atinjam o espalhamento máximo. Quando a concentração de OAE aumenta, o espalhamento também melhora. As formulações oleosas espalharam mais que as formuladas à base de água. Concentrações de OAE entre 5% e 25% aumentaram a infectividade do fungo e foram mais eficientes que o fungo em água com Tween e tão eficientes quanto às oleosas.

Termos para indexação: controle biológico, *Metarhizium anisopliae*, micoinseticidas.

¹ Eng. Agrôn., Ph.D., Embrapa Cerrados, ralves@cpac.embrapa.br

² Eng. Agrôn., M.Sc., Embrapa Cerrados, alice@cpac.embrapa.br

³ Ph.D., CABI Bioscience, Silwood Park, Buckhurst Road, Ascot, Berks, SL5 7TA, UK

⁴ Ph.D., The Royal Horticultural Society, Wisley, Woking, Surrey, GU23 6QB, UK

⁵ Ph.D., Silwood Centre for Pest Management, Department of Biology, Imperial College, Silwood Park, Buckhurst Road, Ascot, Berks, SL5 7PY, UK

Spreading and Effectiveness of an Emulsifiable Adjuvant Oil Fungal Formulation

Abstract - *The spreading of an emulsifiable adjuvant oil fungal formulation was compared at different concentrations to standard water plus Tween and oil-based fungal formulations. In addition, the effectiveness of the emulsifiable oil formulation was compared at different concentrations to a standard water plus Tween and to an oil-based formulation in a bioassay on Tenebrio molitor mortality. Aerial conidia of Metarhizium anisopliae were formulated and applied on silicone treated papers to measure spreading and applied to Tenebrio molitor larvae to calculate the average survival time. Comparisons of drop spreading rates after application showed that 30 minutes were adequate for maximum spread for all tested fungal formulations. When the concentration of the emulsifiable adjuvant oil was increased, spreading also increased. Oil-based formulations like peanut oil and 50% Shellsol T plus 50% Ondina EL spread more rapidly than water-based formulations. Concentrations of adjuvant oil between 5% and 25% enhanced fungal infectivity more than water plus 0.05% Tween 80 and were as effective as peanut oil fungal formulation.*

Index terms: biological control, Metarhizium anisopliae, mycoinsecticides.

Introdução

Produtos à base de fungos, utilizados no controle de insetos, são chamados de micoinseticidas e podem desempenhar importante papel em uma agricultura moderna e sustentável. Para isso, o desenvolvimento de formulações é essencial e necessita de mais conhecimentos.

Estudos laboratoriais sobre formulação de fungos em óleos adjuvantes emulsionáveis para controle biológico de pragas foram desenvolvidos pela Embrapa Cerrados para servirem de base a futuros trabalhos de campo sobre as interações cultura-praga-micoinseticida-pulverização.

Formulações em óleo emulsionável se misturam com água, permitindo a aplicação do micoinseticida com equipamentos convencionais já utilizados pelos produtores rurais ([Alves et al., 2000a](#)), além de aumentarem a infectividade do fungo ([Alves et al., 1998a](#)), diminuir a evaporação ([Alves et al., 2000b](#)) e minimizarem a ação deletéria dos raios ultravioletas sobre os conídios ([Alves et al., 1998b](#)).

O objetivo deste trabalho foi comparar o espalhamento e a eficiência de uma formulação do fungo *Metarhizium anisopliae* em óleo adjuvante emulsionável com formulações em água com Tween e em óleos minerais e vegetais puros.

Material e Métodos

Experimento sobre o espalhamento de diferentes formulações de fungo

Conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, isolado 299984 foram suspensos em um volume de 10 mL das seguintes formulações: água mais 1%, 5%, 10%, 15%, 20% e 25% do óleo adjuvante emulsionável Codacide[®] (Microcide Ltd., U.K.); água mais 0,05% Tween 80 (Sigma[®] Chemicals, U.K.); óleo puro de amendoim (Sigma[®] Chemicals, U.K.); e em uma mistura 1:1 de dois óleos parafínicos refinados, Shellsol T (Alcohols Ltd., U.K.) mais Ondina EL (Shell Oil Co., U.K.), respectivamente.

Os conídios foram misturados com os óleos adjuvantes, em seguida, adicionou-se água para se obter suspensões homogêneas. Todas as concentrações

conidiais foram calibradas na dose de 10^4 conídios/ μ l com o auxílio de uma câmara de Neubauer.

Depois da calibração, gotas (13 por repetição) com volume de 1 mL de cada formulação de fungo foram aplicadas sobre papéis-filtro, tratados com silicone (Whatman International Ltd., U.K.), com um microaplicador Burkard. Esses papéis foram mantidos a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e $50 \pm 3\%$ de umidade relativa do ar (U.R.), onde o diâmetro de cada gota foi medido 30, 60 e 120 minutos após a aplicação, com uma gratícula ocular ajustada em um microscópio estereoscópico.

Esse experimento apresentou um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial, composto de dois fatores: formulações com nove níveis (nove formulações diferentes) e tempo com três níveis (30, 60 e 120 minutos) e quatro repetições.

Bioensaio utilizando diferentes formulações de fungo

Larvas de *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae) com 1,5 a 2,0 cm de comprimento e 60 dias de idade foram utilizadas como insetos-teste, pelos fatos de proporcionarem respostas bastante confiáveis em bioensaios, serem de fácil criação, de fácil manuseio e, por isso, serem amplamente utilizada como inseto-modelo por cientistas de diferentes países do mundo.

Conídios provenientes do mesmo lote dos utilizados no experimento anterior foram formulados com os mesmos produtos e aplicados nos insetos com o microaplicador Burkard. Os insetos da testemunha receberam somente as formulações sem conídios. A mistura com os dois óleos minerais não foi incluída nesse experimento porque mostrou-se tóxica às larvas de *T. molitor*. Dessa forma, usou-se 16 tratamentos (formulações diferentes com a metade sem conídios e a outra metade na dose de 10^4 conídios/inseto) e quatro repetições.

Realizou-se um teste de viabilidade ([Moore et al., 1993](#)) dos conídios de cada formulação antes do início do bioensaio. Os resultados mostraram 100% de viabilidade para todas as amostras.

No bioensaio, as larvas foram colocadas individualmente em placas de Petri com 5 cm de diâmetro e 2 cm de profundidade, contendo um papel filtro e um pedaço de cenoura fresca. O volume de 1 μ l de cada formulação foi aplicado na

região intersegmental entre o tórax e o abdome. Em seguida, os insetos foram incubados a $25 \pm 0,5$ °C, 50 ± 3 % U.R. e 24 h de escuro. A mortalidade foi acompanhada diariamente durante 14 dias. Os insetos mortos foram incubados em câmaras úmidas para confirmar a infecção causada pelo fungo.

O tempo médio de sobrevivência ("average survival time") para cada tratamento foi calculado pela análise de sobrevivência de Kaplan-Meier, utilizando o programa SPSS® para Windows™ ([Norusis & SPSS® Inc., 1993](#)).

Resultados

Os resultados da análise de variância não mostraram diferenças significativas entre os três tempos de medição do diâmetro das gotas. O diâmetro do espalhamento médio das formulações foram 3,15; 3,17 e 3,18 mm depois de 30, 60 e 120 minutos, respectivamente. Porém, a análise revelou diferenças significativas entre os espalhamentos das diferentes formulações do fungo *M. anisopliae* (Figura 1).

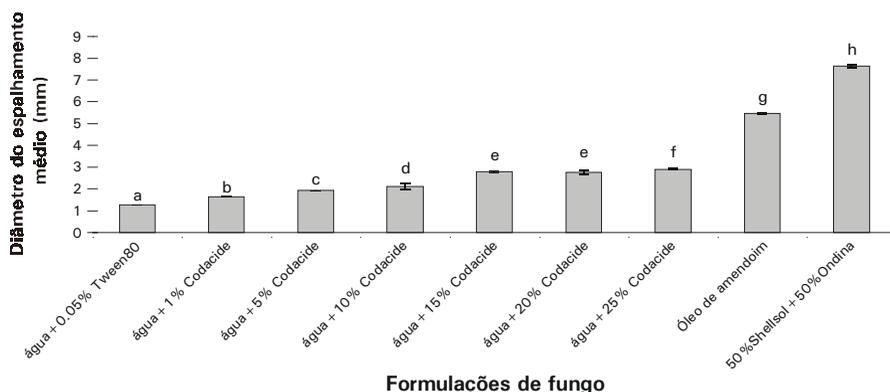


Figura 1. Diâmetro do espalhamento médio, com erro padrão, de formulações de fungo sobre papel tratado com silicone, a 25 ± 1 °C e 50 ± 3 % U.R.

Nota: Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

Os resultados da análise do tempo médio de sobrevivência das larvas de *T. molitor* revelaram diferenças significativas entre as diferentes formulações do fungo *M. anisopliae* ([Figura 2](#)).

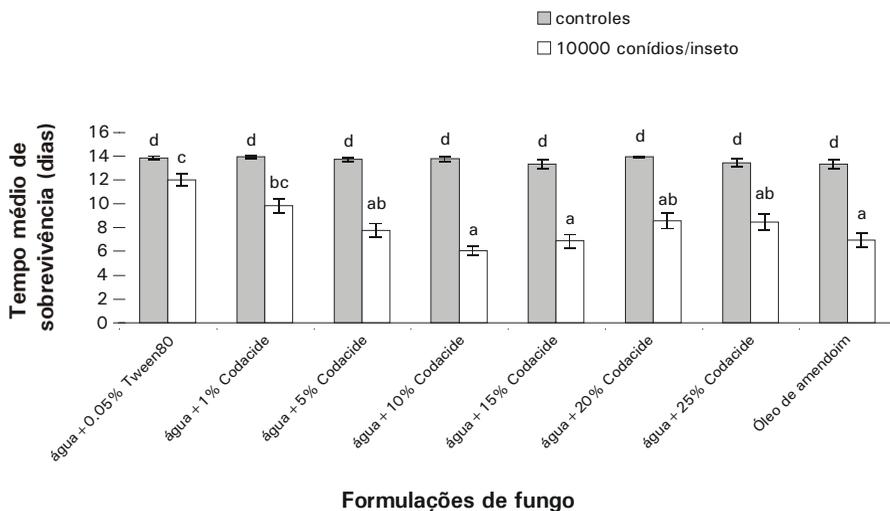


Figura 2. Tempo médio de sobrevivência, com erro-padrão, de larvas *Tenebrio molitor* inoculadas com diferentes formulações com e sem conídios.

Nota: Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

Discussão

Comparações entre os tempos de espalhamento das gotas mostraram que os primeiros 30 minutos são suficientes para se obter valor máximo para todas as formulações à base de água ou de óleo testadas. Esse método de comparação de espalhamento de gotas é simples, rápido, barato e fornece resultados confiáveis na comparação entre formulações sobre superfícies hidrofóbicas semelhantes às encontradas na maioria das cutículas dos insetos ([Prior et al., 1988](#); [Borges, 1998](#)).

Um aumento na concentração do óleo adjuvante emulsionável incrementou o espalhamento das formulações de fungo sobre superfícies hidrofóbicas ([Figura 1](#)) devido à diminuição da tensão superficial do líquido, pois esses tendem a se espalhar mais que outros líquidos com alta tensão superficial ([Clark et al., 1998](#); [Miller, 1998](#); [Nayayanan, 1996](#); [Sun & Foy, 1998](#)).

O grau com que uma gota se espalha sobre uma superfície como a cutícula de um inseto, por exemplo, é geralmente caracterizado por um ângulo de contato entre a superfície sólida e a tangente da gota. Formulações que contêm maior concentração de óleo adjuvante emulsionável diminuem mais a tensão superficial do líquido e como consequência o ângulo de contato é consideravelmente menor que no caso de formulações sem concentrações ou com baixas concentrações desse óleo ([Maas, 1971](#)).

As formulações à base de óleos puros espalharam-se num grau mais elevado devido à baixa tensão superficial que apresentam. Isso explica os resultados de espalhamento obtidos das diferentes formulações de fungo testadas.

Um rápido espalhamento pode aumentar o número de conídios em contato com a cutícula do inseto. Por sua vez, pode ser uma desvantagem para formulações com baixa viscosidade e alta volatilidade porque pequenas gotas apresentam alta proporção entre área de superfície e volume ([Bateman, 1996](#)). Por isso, em ambientes secos, pode ocorrer uma evaporação maior e mais rápida das formulações com alta taxa de espalhamento que de outras com uma taxa menor, apesar dos conídios não evaporarem.

Os resultados do bioensaio, comparando a eficiência das diferentes formulações de fungo sobre larvas de *T. molitor* ([Figura 2](#)), mostraram que 5% é a porcentagem mínima de óleo adjuvante emulsionável a ser adicionada aos conídios e água para manter a mesma eficiência de uma formulação à base de óleo puro nas condições deste trabalho.

Cutículas de insetos e conídios aéreos de fungos como *Beauveria bassiana* e *M. anisopliae*, por exemplo, são hidrofóbicos ([Prior et al., 1988](#); [Jenkins et al., 1998](#)). Após a formulação dos conídios com óleos adjuvantes emulsionáveis, haverá maior afinidade para que eles fiquem mais aderidos e se espalhem melhor sobre a cutícula do inseto. Um mesmo volume dessa formulação fúngica irá se espalhar melhor que um volume equivalente de conídios formulados em água com Tween 80. Dessa forma, a proporção de conídios, em contato com a cutícula do inseto, é aumentada com a presença de óleo adjuvante emulsionável ([Alves et al., 1998a](#)).

Concentrações de 5% ou mais de óleo adjuvante emulsionável melhoram a adesão da suspensão de conídios à cutícula do inseto, provavelmente facilitada

pelas propriedades cutinofílicas desse óleo, permitindo que número muito maior de conídios alcancem as membranas suscetíveis da região intersegmentar dos insetos como discutido por [Prior et al. \(1988\)](#).

O espalhamento de formulações de fungo com 5% de óleo adjuvante emulsionável não foi igual ao de formulações com 10% ou mais, ou igual ao do óleo de amendoim, porém foi tão eficiente para matar os insetos no bioensaio quanto estes ([Figura 2](#)). Portanto, não é necessário pulverizar formulações com altas concentrações de óleo adjuvante emulsionável que terão um alto índice de espalhamento, porque estarão mais sujeitas à alta evaporação e também serão menos econômicas.

Emulsões de fungo com a proporção adequada de óleo adjuvante emulsionável, quando pulverizadas com o equipamento próprio, apresentam grande potencial para o controle biológico de insetos-praga em condições ambientais favoráveis ([Alves et al., 2000c](#)).

Conclusões

- Comparações entre os tempos de espalhamento das gotas mostraram que os primeiros 30 minutos são suficientes para se obter um valor máximo para todas as formulações à base de água e à base de óleo que foram testadas;
- Quando se eleva a concentração do óleo adjuvante emulsionável, o espalhamento das formulações de fungo sobre superfícies hidrofóbicas também aumenta;
- Formulações à base de óleos puros espalharam-se num grau mais elevado que as formulações à base de água;
- Resultados do bioensaio demonstraram que 5% é a porcentagem mínima de óleo adjuvante emulsionável a ser adicionada aos conídios e à água para manter a mesma eficiência de uma formulação à base de óleo puro, nas condições deste trabalho.

Referências Bibliográficas

- ALVES, R. T.; BATEMAN, R. P. Development of mycopesticides formulations and application techniques. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY, 21.; BRAZILIAN CONGRESS OF ENTOMOLOGY, 18., 2000, Foz de Iguassu. **Abstracts**. Londrina: Embrapa Soja, 2000c. p. 509.
- ALVES, R. T.; BATEMAN, R. P.; PRIOR, C.; LEATHER, S. R. Effects of simulated solar radiation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* in different formulations. **Crop Protection**, Surrey, v. 17, p. 675-679, 1998b.
- ALVES, R. T.; BATEMAN, R. P.; PRIOR, C. Performance of *Metarhizium anisopliae* formulations with oil adjuvants on *Tenebrio molitor*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ADJUVANTS FOR AGROCHEMICALS, 5., 1998, Memphis. **Proceedings**. Memphis: [s.n.], 1998a. v. 1, p. 170-175.
- ALVES, R. T.; BATEMAN, R. P.; PRIOR, C.; LEATHER, S. R. Evaluation of application techniques of an emulsifiable adjuvant fungal formulation. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY, 21.; BRAZILIAN CONGRESS OF ENTOMOLOGY, 18., 2000, Foz de Iguassu. **Abstracts**. Londrina: Embrapa Soja, 2000a. p. 512.
- ALVES, R.T.; BATEMAN, R.P.; PRIOR, C.; LEATHER, S. R. Volatility comparisons of different formulations used to apply mycoinsecticides. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY, 21.; BRAZILIAN CONGRESS OF ENTOMOLOGY, 18., 2000, Foz de Iguassu. **Abstracts**. Londrina: Embrapa Soja, 2000b. p. 512.
- BATEMAN, R. P. Formulation & application of insect pathogens. **Lubilosa Technical Bulletin**, (Ascot, U.K.), v. 4, p. 1-74, 1996.
- BURGES, H. D. Formulation of mycoinsecticides. In: BURGES, H. D. (Ed.). **Formulation of microbial biopesticides, beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1998. p. 131-185.
- CLARK, T.; THOMAS III, J. M. HM9425A - a novel spreader/sticker for agricultural use. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ADJUVANTS FOR AGROCHEMICALS, 5., 1998, Memphis. **Proceedings**. Memphis: [s.n.], 1998. v. 1, p. 193-203.

JENKINS, N. E.; HEVIEFO, G.; LANGEWALD, J.; CHERRY, A. J.; LOMER, C. J. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. **Biocontrol News and Information**, Walling Ford, v. 19, n. 1, p. 21N-31N, 1998.

MAAS, W. **ULV application and formulation techniques**. Amsterdam: N.V. Philips-Duphar, 1971. 165 p.

MILLER, P. C. H. Spray application and adjuvants: challenges and opportunities. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ADJUVANTS FOR AGROCHEMICALS, 5., 1998, Memphis. **Proceedings**. Memphis: [s.n.], 1998. v. 1, p. 367-376.

MOORE, D.; BRIDGE, P. D.; HIGGINS, P. M.; BATEMAN, R. P.; PRIOR, C. Ultra-violet radiation damage to *Metarhizium flavoviride* conidia and the protection given by vegetable and mineral oils and chemical sunscreens. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v. 122, p. 605-616, 1993.

NAYAYANAN, K. S. Macro and microemulsion technology and trends. In: FOY, C. L.; PRITCHARD, D. W. (Ed.). **Pesticide formulation and adjuvant technology**. Boca Raton: CRC, 1996. p. 115-174.

NORUSIS, M. J. **SPSS® for Windows advanced statistics release 6.0**. Chicago: SPSS®, 1993. 578 p.

PRIOR, C.; JOLLANDS, P.; LE PATOUREL, G. Infectivity of oil and water formulations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to the cocoa weevil pest *Pantorhytes plutus* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 52, p. 66-72, 1988.

SUN, J.; FOY, C. L. Effects of conventional adjuvants, organosilicones, and their blends on surface tension, wettability, and herbicidal efficacy. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ADJUVANTS FOR AGROCHEMICALS, 5., 1998, Memphis. **Proceedings**. Memphis: [s.n.], 1998. v. 1, p. 336-341.