

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**INFLUÊNCIA DE ADJUVANTES NA CALDA DE
BIOINSETICIDAS BT E NA MORTALIDADE DE *Spodoptera*
*frugiperda***

Edimar Peterlini

Engenheiro Agrônomo

2024

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**INFLUÊNCIA DE ADJUVANTES NA CALDA DE
BIOINSETICIDAS BT E NA MORTALIDADE DE *Spodoptera
frugiperda***

Discente: Edimar Peterlini

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Da Costa Ferreira

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Antônio Polanczyk

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Entomologia Agrícola).

2024

P479i	<p>Peterlini, Edimar</p> <p>Influência de adjuvantes na calda de bioinseticidas bt e na mortalidade <i>Spodoptera frugiperda</i> / Edimar Peterlini. -- Jaboticabal, 2024</p> <p>57 f.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal</p> <p>Orientador: Marcelo Da Costa Ferreira</p> <p>Coorientador: Ricardo Antônio Polanczyk</p> <p>1. Bioinseticida. 2. Compatibilidade. 3. Mistura em tanque. 4. Tecnologia de Aplicação. I. Título.</p>
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: INFLUÊNCIA DE ADJUVANTES NA CALDA DE BIOINSETICIDAS BT E NA MORTALIDADE *Spodoptera frugiperda*


AUTOR: EDIMAR PETERLINI

ORIENTADOR: MARCELO DA COSTA FERREIRA

COORDENADOR: RICARDO ANTONIO POLANCZYK

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Agronomia (Entomologia Agrícola), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. MARCELO DA COSTA FERREIRA (Participação Presencial)
Departamento de Ciências da Produção Agrícola / FCAV UNESP Jaboticabal


Pesquisador Dr. HAMILTON HUMBERTO RAMOS (Participação Presencial)
Centro de Engenharia e Automação (IAC) / Jundiaí/SP


Prof. Dr. GUILHERME DUARTE ROSSI (Participação Presencial)
Departamento de Ciências da Produção Agrícola / FCAV UNESP Jaboticabal

Jaboticabal, 28 de fevereiro de 2024

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Edimar Peterlini - Filho de Carlos Peterlini e Conceição Aparecida Papaet Peterlini, nascido em Araruna, Paraná, Brasil, no dia 23 de julho de 1998. Em abril de 2016 ingressou no curso de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá, Campus de Umuarama, concluindo-o em julho de 2021, recebendo título de Engenheiro Agrônomo. Em janeiro de 2022 iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola) na Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV). Submetendo-se a defesa de dissertação em fevereiro de 2024

“Ninguém vai bater mais forte que a vida. Não importa como você bate e sim o quanto aguenta apanhar e continuar lutando; o quanto pode suportar e seguir em frente. É assim que se ganha.”

(S. Stallone)

*Aos meus pais Carlos e Conceição, meu
irmão Edicarlos, e minha noiva Fabiana.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de inspiração, iluminação e proteção, por estar ao meu lado em todos os momentos e nunca me desamparar.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Entomologia Agrícola da Universidade Estadual Paulista – UNESP.

Ao meu orientador Professor Dr. Marcelo da Costa Ferreira, por todas as conversas, paciência e ensinamentos durante o curso de pós-graduação, e na orientação desta pesquisa.

Ao meu coorientador Professor Dr. Ricardo Antônio Polanczyk pela excelente coorientação prestada durante a realização e condução da pesquisa e fornecer estrutura para realização de parte da pesquisa.

Aos meus pais por toda a educação e sempre me apoiarem e incentivarem em todas as minhas decisões e estarem ao meu lado nos momentos difíceis.

Ao meu irmão por todo os conselhos, apoio, e incentivos a buscar mais.

A minha noiva Fabiana pelo apoio, companheirismo, paciência e momentos felizes que tornam minha vida melhor.

Aos colegas e amigos de laboratório Núcleo de Estudos e Desenvolvimento em Tecnologia de Aplicação (NEDTA), Ana B. D. Spadoni, Maria T. S. Lacerda, Hilario C. de La Cruz, Gabriela Pelegrini, Aline D. P. Reis, pela ajuda durante a condução da minha pesquisa.

Aos colegas e amigos do laboratório LCMAP, Kelly C. Gonçalves, Paulo H. M. Silva, Nicholas Uehara, Gustavo Carneiro, Linda Pacherras e Lana L. B. Carvalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para minha educação e crescimento pessoal, que me proporcionaram chegar aqui.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	iii
ABSTRACT	v
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 Lagarta do cartucho	2
2.2 <i>Bacillus thuringiensis</i>	3
2.3 Mistura de tanque	4
2.4 Adjuvantes	5
2.5 Adjuvantes e Bt.....	6
3 REFERÊNCIAS	7
CAPÍTULO 2 - INFLUÊNCIA DE ADJUVANTES SOBRE AS CARACTERÍSTICAS DE CALDAS DE BT BIOINSETICIDA PARA O CONTROLE DE <i>S. frugiperda</i>	11
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 MATERIAIS E MÉTODOS	12
2.1 Definição dos tratamentos.....	12
2.2 Caracterização das caldas de Bt bioinseticidas	13
2.2.1 Tensão superficial e ângulo de contato	13
2.2.2 Espectro de gotas	14
2.2.3 Compatibilidade físico-química da calda	15
2.3 Análise dos dados.....	16
3 RESULTADOS	17
3.1 Características químicas das caldas.....	17
3.2 pH e Condutividade elétrica	17
3.3 Tensão superficial e ângulo de contato	19
3.4 Espectro de gotas	20

4	DISCUSSÃO.....	22
5	CONCLUSÃO	24
6	REFERÊNCIAS	25
CAPÍTULO 3 – COMPATIBILIDADE DE ADJUVANTES E BT BIOINSETICIDA PARA CONTROLE DA LAGARTA DO CARTUCHO		
28		
1	INTRODUÇÃO.....	29
2	MATERIAIS E MÉTODOS	30
2.1	Criação de <i>Spodoptera frugiperda</i>	30
2.2	Tratamentos utilizados nos experimentos	30
2.3	Compatibilidade <i>in vitro</i>	31
2.4	Testes de mortalidade de <i>Spodoptera frugiperda</i> para compatibilidade <i>in vitro</i>	32
2.5	Teste de mortalidade <i>Spodoptera frugiperda</i> para caldas de aplicação.....	32
2.6	Potencial hidrogeniônico (pH)	33
2.7	Análise dos dados.....	33
3	RESULTADOS	33
3.1	Crescimento vegetativo.....	33
3.2	Concentração de esporos	34
3.3	Classificação de compatibilidade dos adjuvantes	35
3.4	Mortalidade de <i>S. frugiperda</i> para compatibilidade <i>in Vitro</i>	36
3.5	Potencial hidrogeniônico (pH)	36
3.6	Mortalidade de <i>S. frugiperda</i> para caldas de pulverização de bioinseticida Bt	37
4	DISCUSSÃO.....	38
5	CONCLUSÃO	41
6	REFERÊNCIAS	42
CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....		
45		

INFLUÊNCIA DE ADJUVANTES NA CALDA DE BIOINSETICIDAS BT E NA MORTALIDADE *Spodoptera frugiperda*

RESUMO – A lagarta do cartucho *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) está entre os principais insetos desfolhadores de culturas como milho, sorgo, arroz e algodão, e vem desenvolvendo resistência ao controle com inseticidas químicos, mais populares. O uso de bioinseticidas sobretudo à base da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) vem ganhando força como forma de controle. Os bioinseticidas à base de Bt são comumente aplicados em mistura com outros produtos fitossanitários, incluindo os adjuvantes de calda. Os adjuvantes têm o objetivo de modificar parâmetros das caldas de aplicação a fim de proporcionar uma operação mais eficiente e uniforme, buscando garantir melhor aproveitamento dos produtos. Além de parâmetros relacionados à calda adjuvantes também apresentam efeito sobre a ação dos microrganismos. Assim, é de grande importância entender a influência dos adjuvantes sobre as características físico-químicas e biológicas da calda de aplicação do bioinseticida Bt. Dessa forma, objetivou-se avaliar os efeitos de 5 adjuvantes (Li, Fi, We, Pr e Tw) sobre características físico-químicas e biológicas do bioinseticida Bt. Para compatibilidade físico-química, as caldas foram preparadas em provetas de 250 mL com tampa, e avaliadas de 0 a 24 horas após o preparo da calda quanto a estabilidade, pH e condutividade elétrica. A tensão superficial e ângulo de contato foram analisados em tensiômetro de precisão. O espectro de gotas medido por difração de raios laser. A compatibilidade biológica *in vitro* foi avaliada misturando-se os adjuvantes ao meio de cultura e inoculando 5µL de calda de bioinseticida após solidificação, e avaliada após 7 dias quanto a tamanho de colônia e contagem de esporos. Foi preparada uma suspensão com esporos a 3×10^8 esporos mL⁻¹ e aplicada a dieta oferecida a lagartas de segundo ínstar *S. frugiperda*, após sete dias foi avaliada a mortalidade. Em relação a parâmetros físico-químicos, o adjuvante Fi apresentou o maior diâmetro mediano volumétrico, menor tensão superficial e ângulo de contato. O adjuvante Pr apresentou o menor valor de pH, maior condutividade elétrica em todos os horários avaliados e aumentou o Span acarretando espectro de gotas desuniforme. Para compatibilidade biológica *in vitro*, os adjuvantes Li e Tw apresentaram influência positiva sobre o Bt, Tw proporcionou maior tamanho de colônia e Li a maior mortalidade. Já Fi reduziu o tamanho de colônia, porém não interferiu na mortalidade,

sendo igual ao bioinseticida isolado. We e Pr prejudicaram o desenvolvimento do Bt, inibindo completamente o crescimento. Para mortalidade pela calda de Bt e adjuvantes aplicado sobre a dieta, as caldas de Bt e adjuvantes apresentaram mortalidade estatisticamente iguais ao bioinseticida isolado. Os efeitos observados para os testes *in vitro* são mitigados pela formulação do bioinseticida, indicando que apesar de existir influência dos adjuvantes no desenvolvimento do Bt, quando em mistura em calda de aplicação os adjuvantes, não afetaram sua capacidade inseticida.

Palavras-chave: Bioinseticida, compatibilidade, mistura em taque, tecnologia de aplicação

INFLUENCE OF ADJUVANTS TO BT BIOINSECTICIDE GROUNDINGS AND TO *Spodoptera frugiperda* MORTALITY

ABSTRACT - The fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) is among the main defoliating insects of crops such as corn, sorghum, rice, and cotton, and has been developing resistance to control with more popular chemical insecticides. The use of bioinsecticides, especially based on the bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt), has been gaining strength as a form of control. Bt-based bioinsecticides are commonly applied in mixtures with other phytosanitary products, including spray adjuvants. Adjuvants aim to modify application parameters to provide a more efficient and uniform operation, seeking to ensure better use of the products. In addition to parameters related to the spray, adjuvants also influence the action of microorganisms. Therefore, it is significant to understand the influence of adjuvants on the physicochemical and biological characteristics of the Bt bioinsecticide application mixture. Therefore, the objective was to evaluate the effects of 5 adjuvants (Li, Fi, We, Pr and Tw) on the physicochemical and biological characteristics of the Bt bioinsecticide. For physical-chemical compatibility, the syrups were prepared in 250mL graduated cylinders with lids and evaluated from 0 to 24 hours after preparing the syrup for stability, pH and electrical conductivity. Surface tension and contact angle were analyzed using a precision tensiometer. The droplet spectrum measured by laser beam diffraction. *In vitro* biological compatibility was evaluated by mixing the adjuvants with the culture medium and inoculating 5 μ L of bioinsecticide syrup after solidification and evaluated after 7 days for colony size and spore count. A suspension with spores was prepared at 3x10⁸ spores mL⁻¹ and applied to diet offered to second instar *S. frugiperda* caterpillars, after seven days mortality was evaluated. In relation to physicochemical parameters, the Fi adjuvant presented the highest volumetric median diameter, lowest surface tension and contact angle. The adjuvant Pr presented the lowest pH value, highest electrical conductivity at all times evaluated and increased the Span resulting in uneven droplet spectrum. For *in vitro* biological compatibility, the adjuvants Li and Tw showed a positive influence on Bt, Tw provided greater colony size and Li the highest mortality. Fi, on the other hand, reduced colony size, but did not interfere with mortality, being the same as the isolated bioinsecticide. We and Pr impaired the development of Bt, completely inhibiting growth. For mortality

due to the Bt mixture and adjuvants applied to the diet, the Bt mixtures and adjuvants presented mortality statistically equal to the isolated bioinsecticide. The effects observed in *in vitro* tests are mitigated by the bioinsecticide formulation, indicating that despite the influence of adjuvants on the development of Bt, when mixed in application spray the adjuvants did not affect its insecticidal capacity.

Keywords: Bioinsecticide, compatibility, tank-mix, application technology

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

A lagarta do cartucho *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) está entre os principais insetos desfolhadores de culturas como milho, sorgo, arroz e algodão. O hábito polífago desse inseto e a capacidade de desenvolver resistência aos métodos de controle mais comuns, juntamente com relatos de populações na África e Ásia fez com que fosse classificada como de “risco à segurança alimentar mundial” pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2017; Baudron *et al.*, 2019).

O seu controle é realizado comumente com a utilização de inseticidas químicos e plantas geneticamente modificadas. Porém, *S. frugiperda* vem desenvolvendo resistência a essas formas de controle. Assim, vem ganhando força a utilização de inseticidas microbiológicos, demonstrando ser uma ferramenta eficiente para o controle desse inseto. Dentre os microrganismos empregados destaca-se a bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt), representando mais de 50% dos inseticidas microbianos registrados no mundo. Os bioinseticidas a base Bt possuem os esporos e cristais como fontes combinadas de virulências, que contém as toxinas Cry, de atividade inseticida (Crickmore, 2006; Fiuza *et al.*, 2017), o que retarda a evolução da resistência.

Bioinseticidas Bt são aplicados via pulverização sobre os cultivos, em geral misturados a outros produtos químicos (Salvalaggio, *et al.*, 2017). A mistura em tanque tem a finalidade de melhorar aspectos ligados ao controle e ao desempenho operacional, misturando mais de um produto para o mesmo alvo, ou para alvos diferentes com objetivo de melhorar o espectro de controle da operação, bem como utilizar adjuvantes que tem como objetivo melhorar características inerentes a pulverização como espectro de gotas pulverizadas, ângulo de contato das gotas com a superfície foliar, pH e condutividade elétrica da calda que influenciam muitas vezes no desempenho do produto e sua correta colocação no alvo (Kissmann, 1997; Chaim, 2003; Santos *et al.*, 2019; Ferreira *et al.*, 2020). Essa combinação de produtos no reservatório do pulverizador também visa reduzir a necessidade de máquinas, ao passo que aproveita as operações para mais de um alvo de controle (Ferreira *et al.*, 1999).

Além desses parâmetros, quando misturados à calda de bioinseticidas os adjuvantes podem influenciar seu desempenho em campo, podendo ser positivos e melhorar a eficiência em campo que pode resultar em maior efeito residual, devido à parâmetros da tecnologia de aplicação, como maior cobertura da superfície tratada e melhor distribuição da calda aplicada no caso de bioinseticidas Bt, mas também podem ser negativos causando a inativação parcial ou por completo, por mortalidade ou inibição do seu desenvolvimento. Os adjuvantes são uma importante ferramenta para qualidade das pulverizações, mas ainda há estudos insuficientes sobre a sua influência sobre produtos biológicos, inclusive para Bt.

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi estudar a influência de diferentes adjuvantes sobre a calda de pulverização de um bioinseticida Bt, bem como estudar seus efeitos sobre o desenvolvimento da bactéria e sua capacidade inseticida.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Lagarta do cartucho

Dentro da ordem Lepidoptera a família Noctuidae é composta pelas principais espécies de importância agrícola. A fase larval desses insetos infesta as culturas se alimentando das folhas, prejudicando assim fotossíntese e, como consequência, reduzindo a produtividade. Dentre essas espécies a lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* se destaca pelo seu hábito polífago (Baudron *et al.*, 2019), podendo-se desenvolver em diversas culturas como arroz, milho, sorgo, algodão e hortaliças. A atenção global voltou-se para este inseto, após relatos em cultivos na África e Ásia, passando a representar assim “risco a segurança alimentar global” (FAO, 2017; Stokstad, 2017).

Spodoptera frugiperda (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) apresenta desenvolvimento holometabólico, que compreende as fases de ovo, larva, pupa e adultos (Luginbill, 1928). Os adultos são mariposas com cor cinza-escura, com as asas anteriores mosqueadas e as posteriores esbranquiçadas, com bordas acinzentadas, variando de 35 a 45 mm de envergadura (King e Saunders, 1984). A diferenciação entre machos e fêmeas é possível por duas manchas mais claras nas asas anteriores dos machos e ausentes nas fêmeas (Cruz, 1995).

Os adultos começam a voar no final do dia, aproveitando a redução da intensidade luminosa, em busca de plantas hospedeiras ideais para a oviposição. A longevidade média das mariposas é de aproximadamente 12 dias, e o período de oviposição normalmente se inicia no terceiro ou quarto dia após a emergência da fêmea. Esse período pode variar dependendo das condições de temperatura e da disponibilidade de fonte alimentar (Cruz, 1995; Luginbill, 1928).

A postura de ovos varia em número e quantidade, sendo influenciada pela fêmea, e pode abranger de 30 a 300 ovos por postura. O período de incubação dos ovos, em média, é de 3 dias a 25°C, mas essa fase também pode ser influenciada por variações térmicas, umidade relativa e pela planta hospedeira. O período larval tem duração média de 23 dias, subdivididos entre 5 ou 6 ínstar. Em milho, principal hospedeiro deste inseto, o período larval é adiantado, podendo variar de 12,0 a 18,0 dias, e em soja, sorgo e braquiária o período larval é de cerca de 14,0 dias (Viana e Potenza, 2000; Sá *et al.*, 2009).

Os métodos de controle mais utilizados são baseados no uso de inseticidas químicos, plantas geneticamente modificadas para expressão de toxinas inseticidas da bactéria *Bacillus thuringiensis* (plantas Bt), e microrganismos entomopatogênicos como fungos, vírus, bactérias e nematoides entomopatogênicos. Os inseticidas químicos e as plantas Bt apresentam frequentes problemas de relatos de resistência mais frequentes a cada ano com moléculas químicas perdendo eficiências e atualmente todas as tecnologias de plantas Bt disponíveis aos agricultores encontram populações resistentes confirmadas (Gutiérrez-Moreno *et al.*, 2019; Nascimento *et al.*, 2016; Carvalho *et al.*, 2013).

Dessa forma a utilização de microrganismos visando o controle dessa praga cresce a cada ano, sendo uma alternativa eficiente ao controle químico, no qual a bactéria *Bacillus thuringiensis* é a de maior sucesso (Fiuza *et al.*, 2017; Sanahuja *et al.*, 2011; de Maagd *et al.*, 2015).

2.2 *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (Bacillales: Bacillaceae) é uma bactéria gram-positiva presente nos mais diversos ambientes do planeta, sendo relatada em solos de áreas cultivadas, ambientes áridos e aquáticos, em plantas, restos vegetais e grãos

armazenados (Schnepd *et al.*, 1998). Durante o seu desenvolvimento biológico esta bactéria produz toxinas Vip na fase vegetativa e toxinas Cry que compõem estrutura na forma de cristais proteicos formados na fase de esporulação, que são tóxicas a insetos, ácaros e nematoides (Valicente *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2014; Van Frankenhuyzen, 2009; De Maagd *et al.*, 2003; Schnepd *et al.*, 1998).

O modo de ação do *Bacillus thuringiensis* (Bt) segue várias etapas no processo de afetar os insetos suscetíveis. O processo se inicia com a ingestão do complexo esporo-cristal do Bt, o cristal ingerido é então dissolvido no ambiente alcalino do intestino do inseto, formando as pró toxinas, essas são ativadas por proteases no intestino médio do inseto, as toxinas ativadas então ligam-se a receptores específicos localizados nas microvilosidades apicais das células colunares do intestino médio do inseto, as proteínas do Bt se inserem na membrana celular, formando poros que rompem as células do intestino médio, ocorrendo então a lise celular seguida da multiplicação de esporos e cristais no interior do intestino médio do inseto (Jurat-Fuentes e Crickmore, 2017; Schünemann *et al.*, 2014). Esse processo leva a uma septicemia, iniciando quando o pH do intestino do inseto é reduzido, e culminando na morte do inseto (Raymond *et al.*, 2008). Além dos efeitos letais do Bt nos insetos-praga, estudos, como os mencionados por Polanczyk (2015), também confirmam casos de efeitos subletais, adicionando uma dimensão adicional à compreensão da interação complexa entre o Bt e os insetos.

Bioinseticidas baseados em Bt têm sido com sucesso utilizados para controlar pragas desde a segunda metade do século XX, conforme evidenciado por estudos como os de Rosas-Garcia (2009), Sanahuja *et al.* (2011), Sanchis (2011) e Polanczyk *et al.* (2012). Esses bioinseticidas demonstraram eficácia no tratamento fitossanitário e domissanitário, destacando-se pela sua seletividade, baixo impacto ambiental e contribuição para práticas sustentáveis. A aplicação de bioinseticidas Bt nos cultivos é realizada através da pulverização que, em geral, é feita em mistura em tanque com outros produtos fitossanitários.

2.3 Mistura de tanque

A mistura em tanque de produtos fitossanitários tem o objetivo de aumentar o espectro de controle da pulverização, misturando produtos para diferentes alvos como

insetos e doenças, e além de misturar mais de um produto para o mesmo alvo com o objetivo de manejo de resistência (Cloyd, 2011; Das, 2013; Krause, 2014; Gandini *et al.*, 2020), além de reduzir custos operacionais (Ferreira *et al.*, 1999).

Porém, ao se tratar de ingrediente ativo biológico a mistura em tanque deve buscar além da compatibilidade química e espectro de controle, evitar possíveis danos aos microrganismos a fim de manutenção da viabilidade durante a aplicação. Variações em parâmetros da calda como pH e condutividade elétrica podem reduzir parcialmente ou por completo a viabilidade e eficiência dos microrganismos quando em misturas com mais produtos no tanque (Gong *et al.*, 2012). Atentando-se a esses detalhes a mistura em tanque de bioinseticidas com inseticidas químicos pode-se tornar positiva para o sucesso da pulverização em campo. Dentre os produtos que podem ser adicionados ao tanque do pulverizador estão os adjuvantes. Esses produtos têm como objetivo aprimorar as características da pulverização.

2.4 Adjuvantes

Os adjuvantes são compostos químicos utilizados na formulação de produtos fitossanitários ou adicionados à calda de pulverização, com o objetivo de modificar a eficácia do produto e as propriedades físico-químicas da solução (Hazen, 2000). Essas modificações visam minimizar possíveis problemas na aplicação, como a compatibilidade de produtos em misturas no tanque, a redução de deriva, o aumento da cobertura e molhamento dos alvos, a melhoria do espalhamento sobre as folhas e a aceleração da absorção do ingrediente ativo, proporcionando um desempenho mais eficiente (Mota, 2011; Wenzel *et al.*, 2003). Um único adjuvante não é capaz de desempenhar todas essas funções. No entanto, a combinação de diferentes adjuvantes pode atuar de maneira sinérgica no tanque de pulverização, desempenhando funções complementares (Costa *et al.*, 2003; Tu e Randall, 2003; Stock, 2000).

Os adjuvantes podem influenciar diretamente diversas características das caldas fitossanitárias. Com alterações nos valores de condutividade elétrica e potencial hidrogeniônico (pH), na tensão superficial e viscosidade da calda. Além disso, os adjuvantes podem afetar o tamanho e o tempo de evaporação das gotas, o ângulo de contato e, conseqüentemente, o espalhamento das gotas sobre as

superfícies. Também é esperado que influenciem a volatilidade das caldas depositadas, bem como a penetração, absorção, translocação e ação dos produtos fitossanitários (Mendonça *et al.*, 2007; Cunha e Alves, 2009; Cunha *et al.*, 2017).

O pH e a condutividade elétrica são características cruciais que podem impactar a degradação e absorção do produto fitossanitário pelas folhas da cultura e afetar diretamente a eficiência de produtos biológicos adicionados à calda. Essas propriedades têm a capacidade de influenciar a afinidade dos adjuvantes com as folhas, o que, por sua vez, pode dificultar a recomendação desses produtos, uma vez que interferem na eficácia e na interação dos componentes da calda fitossanitária (Cunha, et al, 2017).

2.5 Adjuvantes e Bt

Os adjuvantes têm o potencial de influenciar características físico-químicas e biológicas essenciais da calda, o que pode resultar em efeitos variados. Estudos indicam que adjuvantes podem afetar características físico-químicas da calda, conforme destacado por Santos *et al.* (2019). Além disso, os adjuvantes podem ter impactos biológicos significativos, podendo inibir ou estimular o crescimento vegetativo das colônias (Agostini *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2021).

A avaliação da compatibilidade entre adjuvantes e bioinseticidas Bt pode ser classificada em diferentes categorias de efeitos, sendo: efeitos deletérios que pode resultar em redução da eficácia do Bt ou na alteração negativa das propriedades físico-químicas da calda; efeitos nulos que indicam que a mistura não causa impactos significativos; e efeitos sinérgicos que refletem uma interação positiva entre os componentes e o bioinseticida (Morris, 1975; Kuzmanova, 1981; Seleena *et al.*, 1999).

A sensibilidade do Bt aos produtos fitossanitários não apenas está associada à molécula química de cada ingrediente ativo, mas também pode ser negativamente influenciada por outros fatores. A dosagem utilizada desses produtos e a presença de compostos adicionais nos produtos comerciais, como emulsificantes e outros adjuvantes, desempenham um papel significativo nessa sensibilidade (Morris *et al.*, 1977; Batista Filho *et al.*, 2001; Pinto *et al.*, 2012).

Portanto, a avaliação cuidadosa da compatibilidade entre Bt bioinseticidas e adjuvantes é essencial para garantir a eficácia desejada e evitar potenciais efeitos adversos na aplicação fitossanitária.

3 REFERÊNCIAS

- Agostini L, Otuka AK, Silva EA, Baggio MV, Laurentis VL, Duarte RT, Agostini TT, Polanczyk RA (2013) Compatibilidade de produtos à base de *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1911) com glifosato em diferentes dosagens, utilizado em soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **Ciência et Praxis** 6: 37-40.
- Batista Filho A, Almeida JEM, Lamas C (2001) Effect of thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. **Neotropical Entomology** 30: 437-447.
- Baudron F, Zaman-Allah MA, Chaipa I, Char, N, Chinwada P (2019) Understanding the factors influencing fall armyworm (*Spodoptera frugiperda* JE Smith) damage in African smallholder maize fields and quantifying its impact on yield. A case study in Eastern Zimbabwe. **Crop Protection** 120:141-150.
- Carvalho RA, Omoto C, Field LM, Williamson MS, Bass C (2013) Investigating the molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. **Plos One** 8: e62268.
- Chaim A, Castro VLS (2003) Tecnologia de aplicação de agrotóxicos. In: Freire FCO, Cardoso JE, Viana FMP (Ed.) **Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica p.571-624.
- Costa EAD, Almeida JEM, Loureiro ES, Sano AH (2003) Compatibilidade dos Adjuvantes AG 6202 e AgRho™ Dep-775 no Desenvolvimento *in vitro* dos Fungos Entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. **Revista da Sociedade dos Técnicos Alcooleiros e Açucareiros do Brasil** 21: 6-9.
- Crickmore N (2006) Beyond the spore – past and future developments of *Bacillus thuringiensis* as a biopesticide. **Journal of Applied Microbiology** 101: 616-619.
- Cruz, IA (1995) Lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS. **Circular Técnica** 21.
- Cunha JPAR, Alves GS (2009) Características físico-químicas de soluções aquosas com adjuvantes de uso agrícola. **Interciencia Caracas** 34:655-659.
- Cunha JPAR, Alves GS, Marques RS (2017) Tensão superficial, potencial hidrogeniônico e condutividade elétrica de caldas de produtos fitossanitários e adjuvantes. **Revista Ciência Agronômica** 48:261-270.
- de Maagd, RA (2015). *Bacillus thuringiensis*-based products for insect pest control. In: *Principles of Plant-Microbe Interaction: Microbes for Sustainable Agriculture* (ed. Lugtenberg, B.) 185-192.

- De Maagd RA, Bravo A, Berry C, Crickmore N, Schnepf HE (2003) Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annual Review of Genetics** 37:409–433.
- Dos Santos CAM, Do Nascimento J, Gonçalves KC, Smaniotto G, Zachin LF, Ferreira MC, Polanczyk RA (2021) Compatibility of Bt biopesticides and adjuvants for *Spodoptera frugiperda* control. **Scientific Reports** 11:5271
- FAO (2017) FAO Advisory Note on Fall Armyworm (FAW) in Africa. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 7
- Ferreira PHU, Thiesen LV, Pelegrini G, Ramos MFT, Pinto MMD, Costa Ferreira M (2020) Physicochemical properties, droplet size and volatility of dicamba with herbicides and adjuvants on tank-mixture. **Scientific Reports** 10:18833.
- Fiuza LM, Polanczyk RA, Crickmore N (2017) *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*. **Characterization and use in the field of biocontrol**. New York. 288p.
- Gong Y, Li M, Xu D, Wang H, He J, Wu D, Chen D, Qiu N, Bao Q, Sun M, Yu Z (2012). Comparative proteomic analysis revealed metabolic changes and the translational regulation of Cry protein synthesis in *Bacillus thuringiensis*. **Journal Proteomics** 75:1235-1246.
- Gutiérrez-Moreno R, Mota-Sanchez D, Blanco CA, Whalon ME, Terán-Santofimio H, Rodríguez-Maciél JC, DiFonzo C (2019) Field-Evolved Resistance of the Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) to Synthetic Insecticides in Puerto Rico and Mexico. **Journal of Economic Entomology** 112:792-802
- Hazen JL (2000) Adjuvants: terminology, classification and chemistry. **Weed Technology** 14: 773-784.
- Jurat-Fuentes JL, Crickmore N (2017) Specificity determinants for Cry insecticidal proteins: Insights from their mode of action. **Journal of Invertebrate Pathology** 142:5-10.
- King ABS, Saunders JL (1984) **The invertebrate pests of annual food crops in Central America**. London: Overseas Development Administration. 166 p.
- Kissmann KG (1998) Adjuvantes para caldas de produtos fitossanitários. In: Guedes JVC e Dornelles SB (Org) **tecnologia e segurança na aplicação de agrotóxicos: novas tecnologias**. Santa Maria: Departamento de defesa fitossanitária; sociedade de agronomia de Santa Maria, P.39-51.
- Kuzmanova I (1981) Study on the compatibility of *Bacillus thuringiensis* Berliner with three organophosphorus insecticides. **Gradinarska i Lozarska Nauka** 18:23-27.
- Luginbill PH (1928) The fall armyworm. **Technical Bulletin United States Department of Agriculture** 34:1-91.
- Mendonça CG, Raetano CG, Mendonça CG (2007) Tensão superficial estática de soluções aquosas com óleos minerais e vegetais utilizados na agricultura. **Engenharia Agrícola** 27:16-23.

Morris ON (1977) Compatibility of 27 chemical insecticides with *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki. **Canadian Entomologist** 109:855-864.

Morris ON (1975) Effect of some chemical insecticides on the germination and replication of commercial *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology** 26:199-204.

Mota AAB (2011) **Quantificação do ar incluído e espectro de gotas de pontas de pulverização em aplicações com adjuvantes**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” – UNESP, Botucatu.

Nascimento AR, Farias JR, Bernardi D, Horikoshi RJ, Omoto C (2016) Genetic basis of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to the chitin synthesis inhibitor lufenuron. **Pest Management Science** 72:810-815.

Pinto LMN, Dörr NC, Ribeiro APA, Salles SM de, Oliveira JV de, Menezes VG, Fiuza LM (2012) *Bacillus thuringiensis* monogenic strains: screening and interactions with insecticides used against rice pests. **Brazilian Journal of Microbiology** 43(2):618–626.

Polanczyk RA (2015) **Interação entre *Bacillus thuringiensis* (Bacillales: Bacillaceae) e *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) visando ao controle de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Erebidae), *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)** 97 f. Tese de Livre-Docência – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

Polanczyk RA, De Bortoli AS, De Bortoli CP (2012) *Bacillus thuringiensis* – based biopesticides against agricultural pests in Latin America. In: Larramendy, M.L.; Soloneski, S. (Eds.). **Integrated Pest Management and Pest Control - Current and Future Tactics**. Rijeka: Intech, 445-462.

Raymond B, Lijek RS, Griffiths RI, Bonsall MB (2008) Quantifying the reproduction of *Bacillus thuringiensis* HD1 in cadavers and live larvae of *Plutella xylostella*. **Journal of Invertebrate Pathology** 98:307-313.

Rosas-Garcia NM (2009) Biopesticide production from *Bacillus thuringiensis*: Anprospects. **Crop Protection** 19:669-676.

Sanchis V (2011) From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: history of the biopesticide *Bacillus thuringiensis*. A review. **Agronomy for Sustainable Development** 31:217-231.

Sanahuja G, Banakar R, Twyman RM, Capell T, Christou P (2011) *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. **Plant Biotechnology Journal** 9:283-300.

Sá VGM, Fonseca BVC, Boregas KGB, Waquil JM (2009) Sobrevivência e desenvolvimento larval de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros alternativos. **Neotropical Entomology** 38:108-115.

Schünemann R, Knaak N, Fiuza LM (2014) Mode of action and specificity of *Bacillus thuringiensis* toxins in the control of caterpillars and stink bugs in soybean culture. **ISRN Microbiology** 135675.

Seleena P, Lee HL, Chiang YF (1999) Compatibility of *Bacillus thuringiensis* serovar *Israelensis* and chemical insecticides for the control of *Aedes* mosquitoes. **Journal of Vector Ecology** 24:216-223.

Stock D, Briggs G (2000) Physiochemical properties of adjuvants: values and applications. **Weed Technology**. 14:798-806.

Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeiger DR, Dean DH (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 62:775-806.

Stokstad E (2017) New crop pest takes Africa at lightning speed. **Science** 356:473-474.

Tu M, Randall JM (2003) Adjuvants. In: Tu M, Hurd C & Randall JM **Weed control methods handbook, The Nature Conservancy**. Davis: TNC. p. 1-24

Viana PA, Potenza MR (2000) Avaliação de antibiose e não-preferência em cultivares selecionados com resistência à lagarta-do-cartucho. **Bragantia** 59:27-33.

Valicente, F, Lana, UGP, Pereira, ACP, Martins, JLA, Tavares, ANG (2018). Riscos à produção de biopesticida à base de *Bacillus thuringiensis*. **Circular Técnica 239**

Van Frankenhuyzen, K. (2009). Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **Journal Invertebrate Pathology** 101:1-16.

Wang P, Zhang C, Guo M, Guo S, Zhu Y, Zheng J, Zhu L, Ruan L, Peng D, Sun M (2014) Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* YBT-1518, a typical strain with high toxicity to nematodes. **Journal of Biotechnology** 171:1-2.

WENZEL IM, Batista Filho A, Almeida JEM, Costa EAD, Cintra ERR, Lima AM (2003) Efeito de Adjuvantes sobre *Verticillium lecanii* (Zimm), Viégas. **Arquivos do Instituto Biológico** 70(3):127-129.

CAPÍTULO 2 - INFLUÊNCIA DE ADJUVANTES SOBRE AS CARACTERÍSTICAS DE CALDAS DE BT BIOINSETICIDA PARA O CONTROLE DE *S. frugiperda*

Resumo: A bactéria gram-positiva *Bacillus thuringiensis* (Bt) representa um importante microrganismo utilizado no controle biológico de insetos sem danos ao ambiente. As toxinas Cry produzidas pelo Bt possuem atividade inseticida em diversas ordens de insetos. A qualidade das pulverizações do Bt, que tendem a ser feitas em mistura com outros produtos fitossanitários, está fortemente relacionado com o sucesso do efeito inseticida do Bt, adjuvantes estão entre os produtos que podem ser misturados a calda de bioinseticidas a base de Bt. O objetivo desse trabalho foi de ampliar os conhecimentos sobre a ação de adjuvantes sobre características da calda de bioinseticidas Bt. Foram avaliados: o efeito de adjuvantes sobre a calda de Bt (Li, Fi, We, Pr e Tw), a influência dos adjuvantes sobre a compatibilidade físico-química da calda, pH, condutividade elétrica, tensão superficial, ângulo de contato de gotas, diâmetro mediano volumétrico (DMV) e coeficiente de uniformidade (Span). As variações observadas foram relacionadas à formulação do bioinseticida, acontecendo igualmente em todas as caldas, não havendo relação com o adjuvante indicando compatibilidade. O adjuvante Pr reduziu o pH e aumentou a condutividade elétrica. Os adjuvantes Fi e We apresentaram os menores valores de tensão superficial e ângulo de contato, resultando em maior espalhamento das gotas. A calda com adjuvante Fi apresentou o maior DMV, todos os adjuvantes provocaram aumento do Span, resultando em pulverização mais desuniforme. Todos os adjuvantes modificaram parâmetros das caldas e o adjuvante Fi proporcionou as melhores características para calda de Bt.

1 INTRODUÇÃO

O controle biológico se consolidou como um dos pilares sustentadores do manejo integrado de pragas, utilizando inimigos naturais como predadores e parasitoides, e microrganismos entomopatogênicos como bactérias, vírus e nematoides, para controle e manejo de resistência de pragas.

Dentre os microrganismos, a bactéria Gram-positiva *Bacillus thuringiensis* (Bt), apresenta destaque por possuir alta especificidade, ao controlar insetos sem oferecer danos ao ambiente (Jurat-Fuentes e Crickmore, 2017). A atividade entomopatogênica dessa bactéria é devida a inclusões cristalinas compostas por proteínas denominadas de toxinas Cry (Bravo *et al.*, 2013). Tais proteínas conferem ao Bt atividade inseticida para diversas ordens de insetos, dentre elas Lepidoptera (Bravo *et al.*, 2017).

O desempenho de bioinseticida se relaciona fortemente com a qualidade da aplicação, já que a probabilidade de o inseto ingerir uma dose letal do agente biológico é aumentada com uma cobertura foliar maior e mais homogênea pela calda aplicada (Salvalaggio *et al.*, 2017). A pulverização tende a ser feita juntamente com outros produtos fitossanitários e adjuvantes. Os adjuvantes vêm ganhando notoriedade no uso juntamente com produtos fitossanitários por desempenhar melhorias na aplicação (Chapman *et al.*, 1998; Griesang *et al.*, 2017)

Alguns estudos relacionados ao uso de adjuvantes em caldas de Bt foram realizados por Santos *et al.* (2019), no qual a ação de adjuvantes foi estudada sobre bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk). Porém, as interações entre produtos fitossanitários e agentes biológicos variam de acordo com a espécie e linhagem dos patógenos utilizados e a sua interação com a formulação utilizada (Alves *et al.*, 1998). Ainda são necessários estudos sobre a interação de adjuvantes com outras subespécies de Bt, visando fornecer informações que permitam boas indicações e resultados das combinações em tanque.

Dessa forma este trabalho objetiva ampliar os conhecimentos sobre a ação de adjuvantes sobre as características da calda de aplicação de bioinseticida a base de *B. thuringiensis* var. *aizawai* (Bta).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Definição dos tratamentos

As análises foram conduzidas no Núcleo de Estudos e Desenvolvimento em Tecnologia de Aplicação (NEDTA), em delineamento experimental inteiramente ao acaso, com 6 tratamentos compostos pelo bioinseticida Bt isolado e em mistura com adjuvantes. Os produtos utilizados foram: bioinseticida a base de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* (Xentari®), adjuvante a base de lecitina e ácido propiônico (Li 700®), adjuvante a base de éter laurílico de polioxietileno (Fighter®), adjuvante a base de óleo essencial de laranja (Wetcit Gold®), adjuvante a base de ácido hidroxicarboxílico (Protac®), adjuvante polietileno sorbitol (Tween 80®).

Tabela 1: Tratamentos compostos do bioinseticida isolado e em mistura com adjuvantes.

Caldas*	Dosagens	i.a. dos produtos	Sigla tratamentos
Xentari®	425g ha ⁻¹	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i>	Xen
Xentari® + Li-700®	425g ha ⁻¹ + 0,02% v/v	Bt + Lecitina e Ácido Propiônico	Xen+Li
Xentari® + Fighter®	425g ha ⁻¹ + 0,1% v/v	Bt + Éter laurílico de polioxietileno	Xen+Fi
Xentari® + Wetcit Gold®	425g ha ⁻¹ + 0,15% v/v	Bt + Óleo de laranja	Xen+We
Xentari® + Protac®	425g ha ⁻¹ + 200g ha ⁻¹	Bt + Sulfatos e Ác. hidroxicarboxílico	Xen+Pr
Xentari® + Tween 80®	425g ha ⁻¹ + 0,1% v/v	Bt + Éster de polietileno sorbitol	Xen+Tw

*As dosagens são as recomendadas pelos fabricantes para o volume de calda de 100L ha⁻¹. i.a.: Ingrediente ativo.

2.2 Caracterização das caldas de Bt bioinseticidas

Para caracterizar o efeito dos adjuvantes sobre as caldas de aplicação do bioinseticida Bt foram analisados parâmetros físico-químicos descritos abaixo.

2.2.1 Tensão superficial e ângulo de contato

A tensão superficial das caldas e ângulo de contato formado entre a gota e a superfície depositada, foram avaliados pelo equipamento Contact Angle System OCA 15-plus (Dataphysics®). Foram realizadas quatro repetições para os 6 tratamentos mais 1 tratamento controle utilizando água. Uma câmera de alta resolução e velocidade (CCD, 60 imagens por minuto) para avaliação de deformação da gota

(tensão superficial) e do ângulo de contato. Os dados foram registrados a cada segundo por um minuto após a formação da gota. A avaliação da tensão superficial foi realizada pelo método da gota pendente, considerando a equação de Young-Laplace $\Delta P = 2\gamma / R$, em que ΔP é a variação de pressão entre superfícies, γ é a tensão superficial e R é o raio de curvatura da gota. Por esse método um micro injetor eletrônico foi calibrado para um volume de 3 μL , formando uma gota suspensa em uma agulha, a imagem capturada pela câmera é analisada por assimetria de eixos.

O ângulo de contato foi determinado pelo método da gota séssil depositada sobre a superfície plana artificial padrão de filme parafinado (Parafilm®). O ângulo de contato foi medido durante 60 segundos a partir do depósito da gota. Os dados gerados aos dez segundos após a formação da gota foram considerados para caracterizar as caldas fitossanitárias e comparação estatística, por estarem próximos do ponto de inflexão das curvas de tensão superficial e ângulo de contato, em relação ao tempo de avaliação.

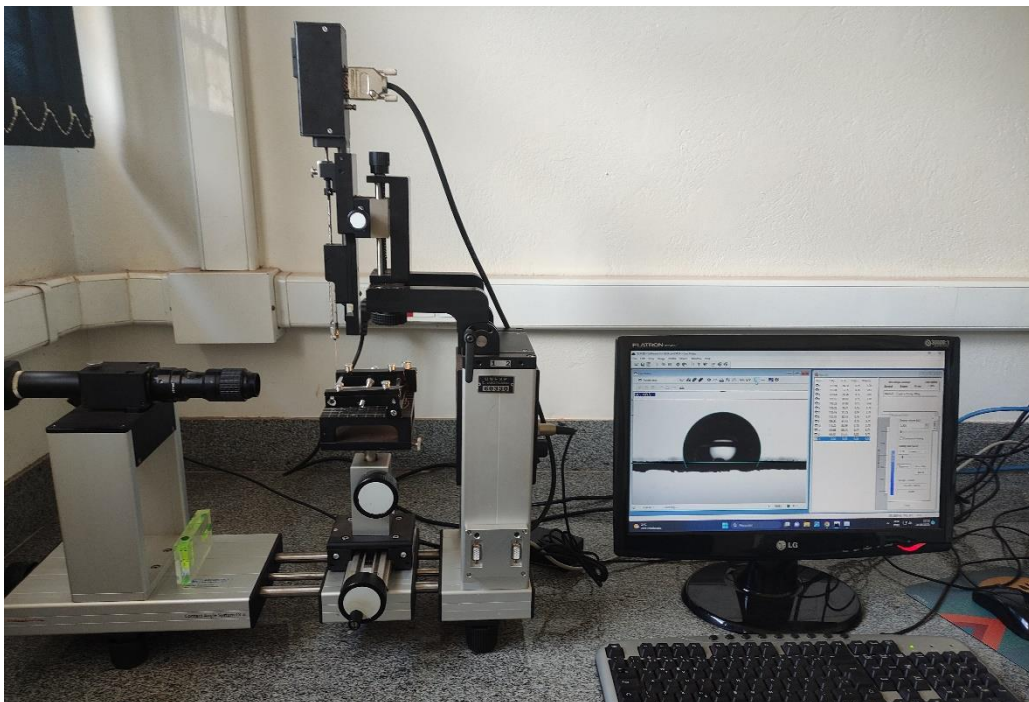


Figura 1: Contact Angle System OCA 15-plus (Dataphysics®).

2.2.2 Espectro de gotas

As gotas foram formadas com uma ponta do modelo XR11004, operando na pressão de 275 kPa (TeeJet, 2014), mantida constante por ar comprimido, sendo

determinado do diâmetro das gotas a partir do analisador de partículas por difração de raios laser (Mastersizer S®, versão 2.19).

A ponta de pulverização foi instalada à 40 cm do feixe de laser. Foi utilizado um oscilador longitudinal para o jato de calda atravessar transversalmente o laser durante o registro pelo aparelho, visando uma amostragem representativa das gotas produzidas pelo jato formado pela ponta de pulverização. O tempo despendido pelo oscilador para mover-se de um extremo ao outro do jato aplicado foi ajustado para 3 segundos.

Na caracterização do espectro das gotas, foi determinado o coeficiente de uniformidade de gotas ($SPAN = D_{v0,9} - D_{v0,1} / D_{v0,5}$) e o diâmetro mediano volumétrico (DMV).

Com o SPAN, analisa-se a variação do tamanho das gotas produzidas no espectro de gotas, sendo que quanto mais próximo de 0 estiver o valor de SPAN, mais homogêneo será o espectro. Ou seja, maior é o volume da calda pulverizado por gotas do tamanho preconizado.

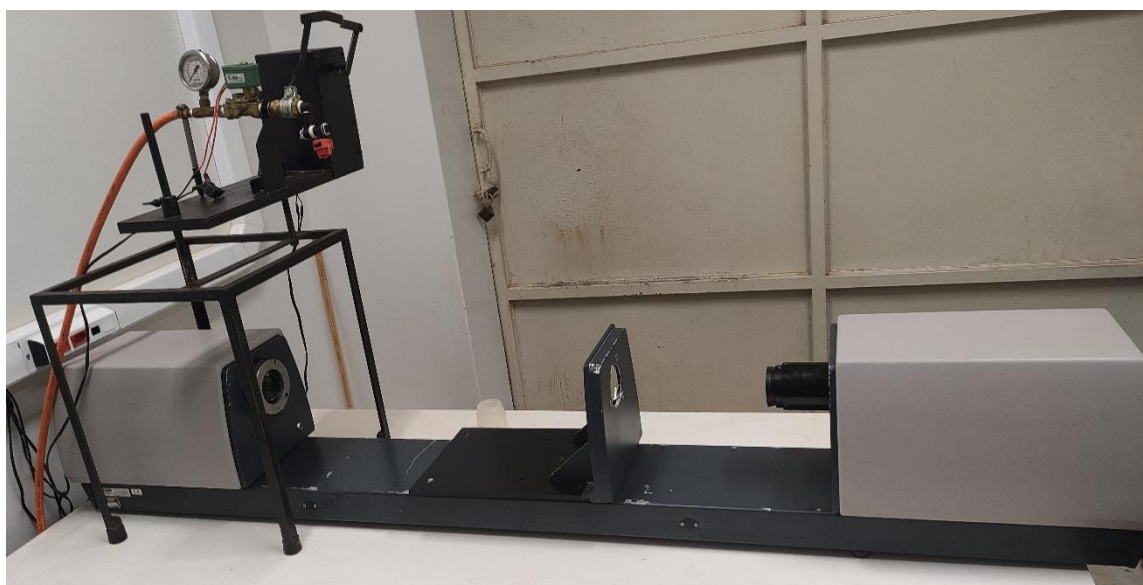


Figura 2: Analisador de tamanho de partículas por difração de raios laser (Mastersizer S®).

2.2.3 Compatibilidade físico-química da calda

No preparo das caldas foram utilizadas provetas de 250 mL com tampa, nas concentrações recomendadas de cada produto (Tabela 1). Os produtos líquidos foram dosados utilizando uma pipeta graduada de 1.000 μ L (LabMate®). O pH (pHmetro

QUIMIS® Q400AS) e a condutividade elétrica (Condutivimetro Marte® MB-11P) foram medidos após a mistura. O preparo das caldas e avaliações foram feitas em temperatura à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa à $65 \pm 5\%$.

A avaliação das caldas foi realizada segundo os procedimentos estabelecidos na ABNT NBR13875:2014 nos períodos de 0 hora (logo após a mistura das caldas) e após 2, 6 e 24 horas em período de repouso, sendo observados os efeitos das interações entre os produtos quanto a homogeneidade e heterogeneidade (floculação, sedimentação, separação de fases, formação de grumos e formação de cristais) e formação de espuma (ABNT, 2014). Na avaliação da floculação, formação de grumos e cristais foi utilizada peneira de tecido metálico com abertura nominal de $149 \mu\text{m}$ (100 Mesh), e considerado estruturas retidas que fossem visíveis.

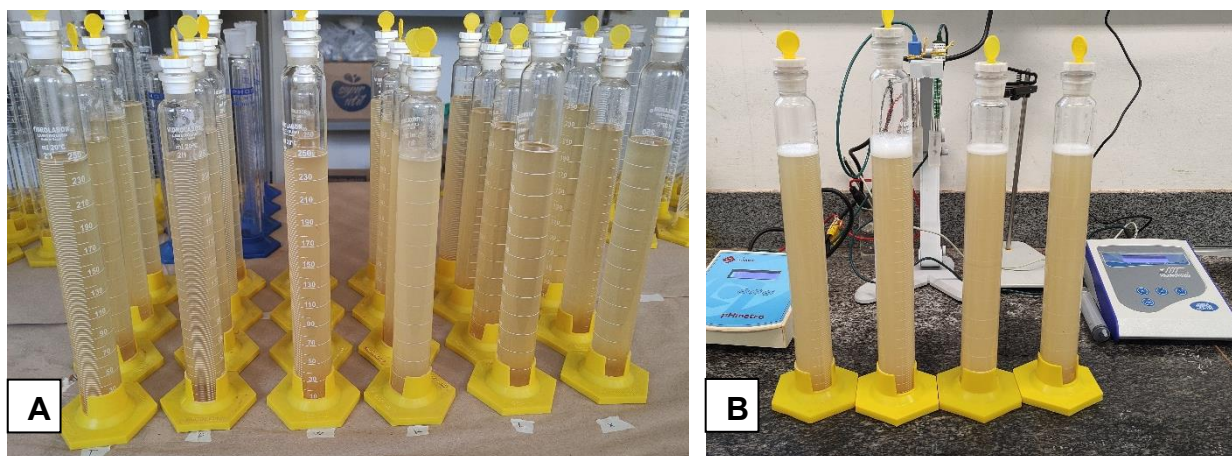


Figura 3: Análise de compatibilidade físico-química de caldas de bioinseticida Bt e adjuvante (A), pH e condutividade elétrica (B).

2.3 Análise dos dados

Os resultados foram submetidos aos testes de normalidade de resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk e de homogeneidade pelo teste de Levene, ambos ao nível de significância de 5%. Os resultados do experimento de tensão superficial, ângulo de contato, pH, condutividade elétrica, espectro de gotas e SPAN foram analisados pelo teste F e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%.

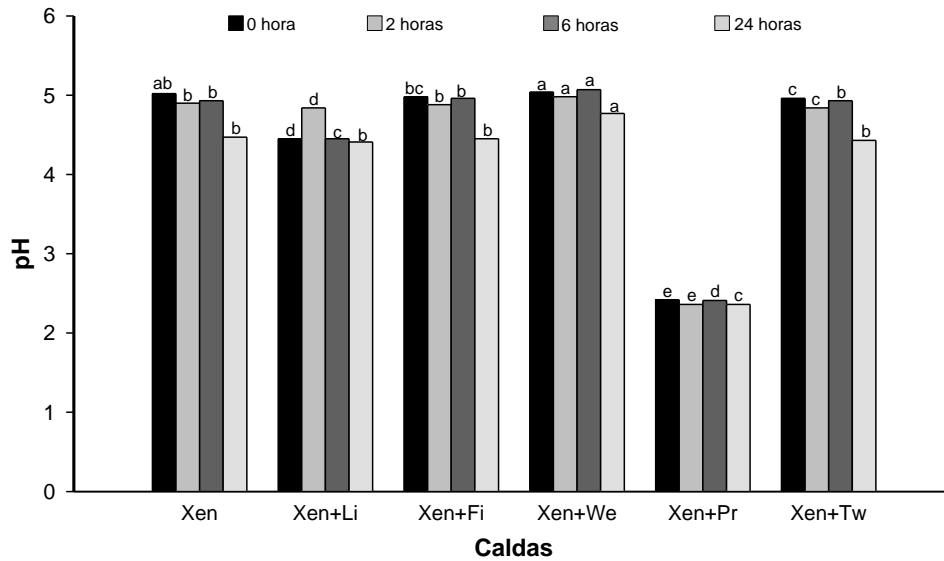


Figura 4: Caracterização do pH de calda até 24 horas após o preparo das caldas. *letras comparam diferenças entre as caldas para o mesmo horário de avaliação.

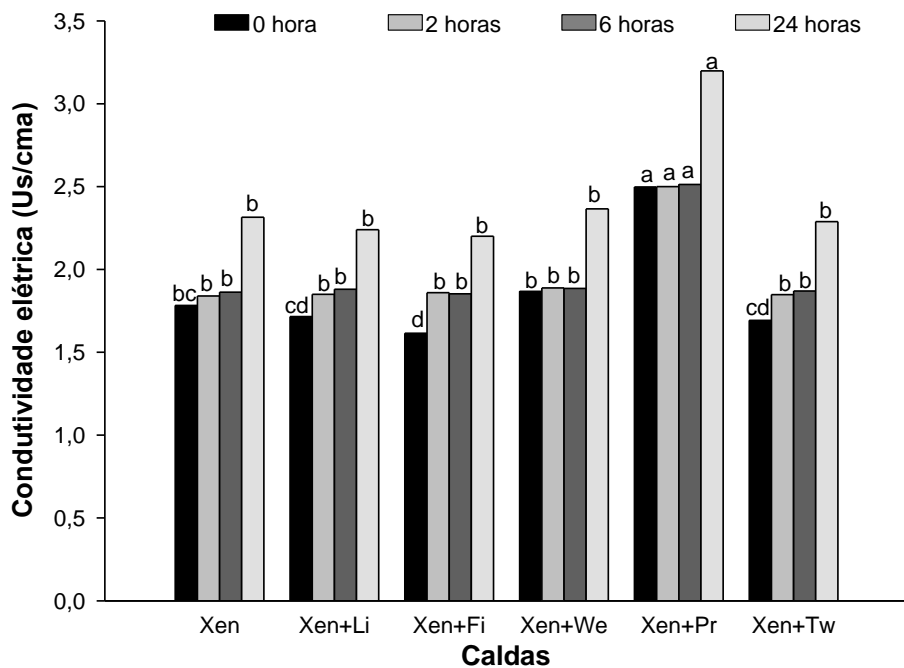


Figura 5: Caracterização da condutividade elétrica da calda até 24 horas após o preparo das caldas. *letras comparam diferenças entre as caldas para o mesmo horário de avaliação.

A condutividade elétrica (C.E.) das caldas apresentou variação ao decorrer do tempo de avaliação. Onde o menor valor de C.E. foi medido logo após o preparo e agitação da calda, aumentando em 2 horas, mantendo-se estável entre 2 e 6 horas, e apresentando os maiores valores de C.E. no horário de 24 horas após o preparo da calda. O adjuvante Pr apresentou os maiores valores de C.E. em todos os horários

avaliados, já os demais adjuvantes não apresentaram diferença entre si e para o bioinseticida isolado.

3.3 Tensão superficial e ângulo de contato

A adição dos adjuvantes Li, Fi, We e Tw proporcionaram redução nas tensões superficiais, com destaque para os adjuvantes Fi e We que proporcionaram as menores tensões. Já as maiores tensões observadas para calda do bioinseticida isolado (Xen), e calda com adição do adjuvante Pr, que não diferiram entre si. Todas as caldas apresentaram tensão superficial menor em relação a água.

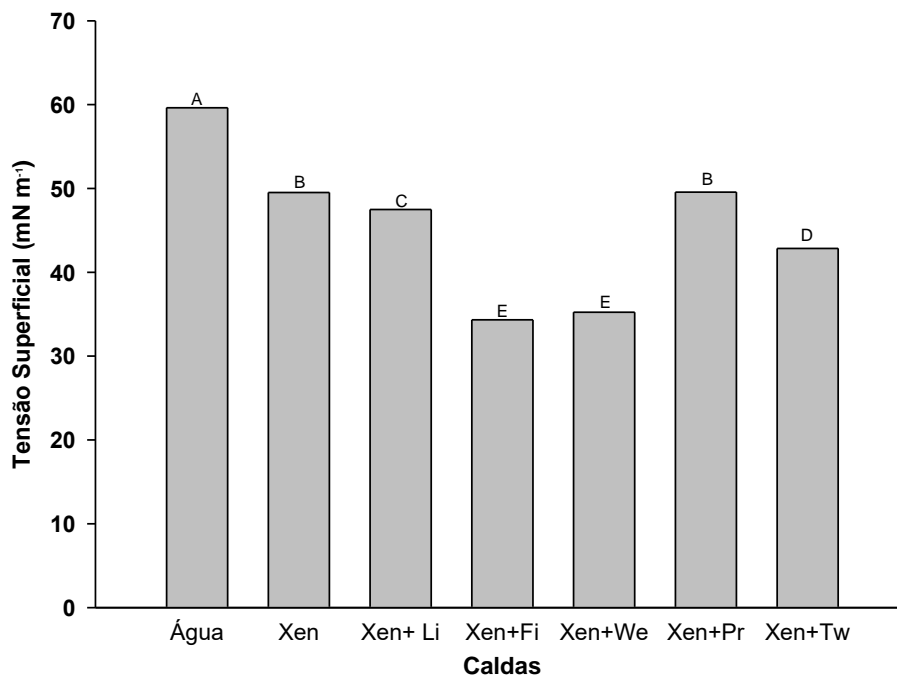


Figura 6: Valores médios de tensão superficial de gotas, em mN.m^{-1} , de caldas contendo bioinseticidas isolado ou em mistura com adjuvantes, referentes ao desdobramento entre a interação do fator inseticida com os adjuvantes. *letras comparam diferenças entre as caldas.

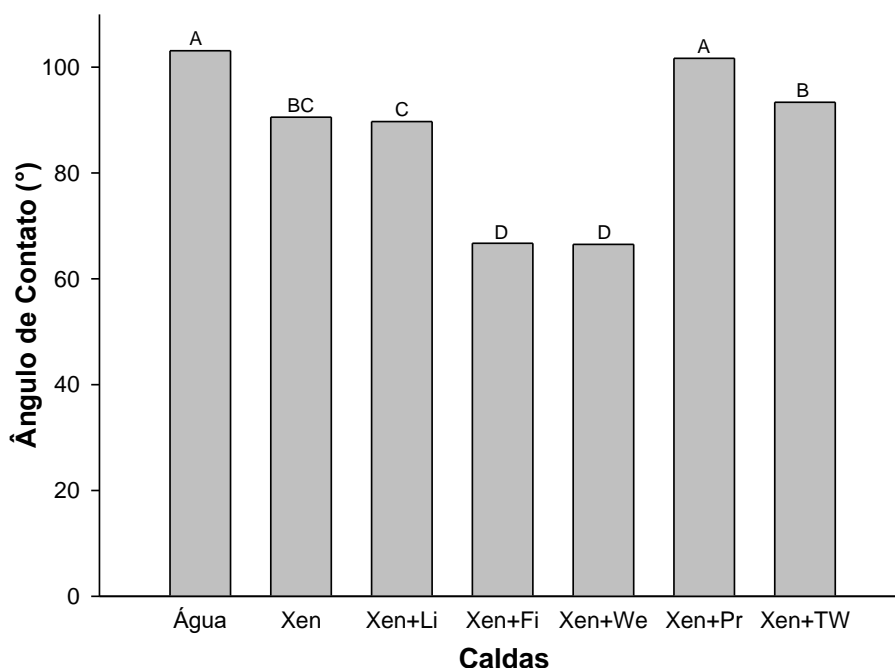


Figura 7: Valores médios de ângulo de contato de gotas, de caldas contendo inseticidas isolado ou em mistura com adjuvantes, referentes ao desdobramento entre a interação do fator inseticida com os adjuvantes.

3.4 Espectro de gotas

Três fatores foram considerados na análise do espectro de gotas: diâmetro mediano volumétrico (DMV), coeficiente de uniformidade (Span) e o percentual de gotas menores de 100 micrometros ($\% < 100 \mu\text{m}$).

Os adjuvantes Li e Fi apresentaram os maiores valores de DMV, com destaque para o adjuvante Fi que apresentou o maior DMV. As caldas contendo o bioinseticida isolado e em mistura com adjuvante We apresentaram o menor DMV não apresentaram diferenças para a água pura.

Para o Span, as caldas com adjuvante Pr e Tw apresentaram os maiores valores de Span, diferenciando-se das demais, já as caldas do bioinseticida isolado e em mistura com os adjuvantes Li, Fi e We não se diferenciaram entre si.

As caldas contendo os adjuvantes Fi e Li, apresentaram os menores percentuais de gotas menores que 100 micrometros. Já as caldas com somente o bioinseticida e o bioinseticida em mistura com o adjuvante We apresentaram os maiores percentuais. Todas as caldas apresentaram menores percentuais em relação a água.

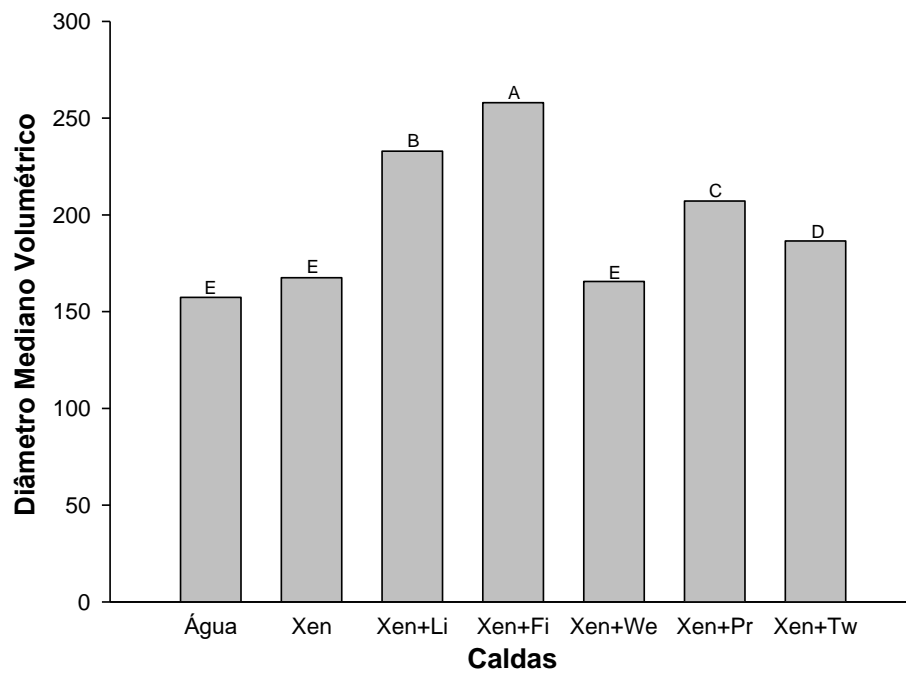


Figura 8: Diâmetro mediano volumétrico analisado das diferentes misturas de adjuvantes e bioinseticida. *Letras comparam diferenças pelo teste de Tukey a 5% de significância.

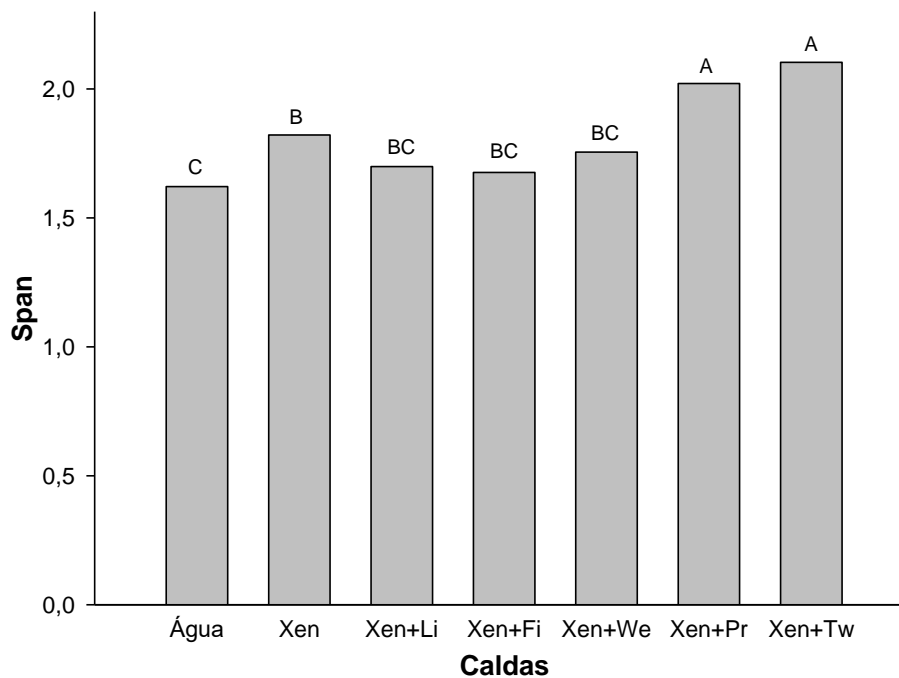


Figura 9: Coeficiente de uniformidade do espectro de gotas (Span) das caldas de bioinseticida e adjuvantes. *Letras comparam diferenças pelo teste de Tukey a 5% de significância.

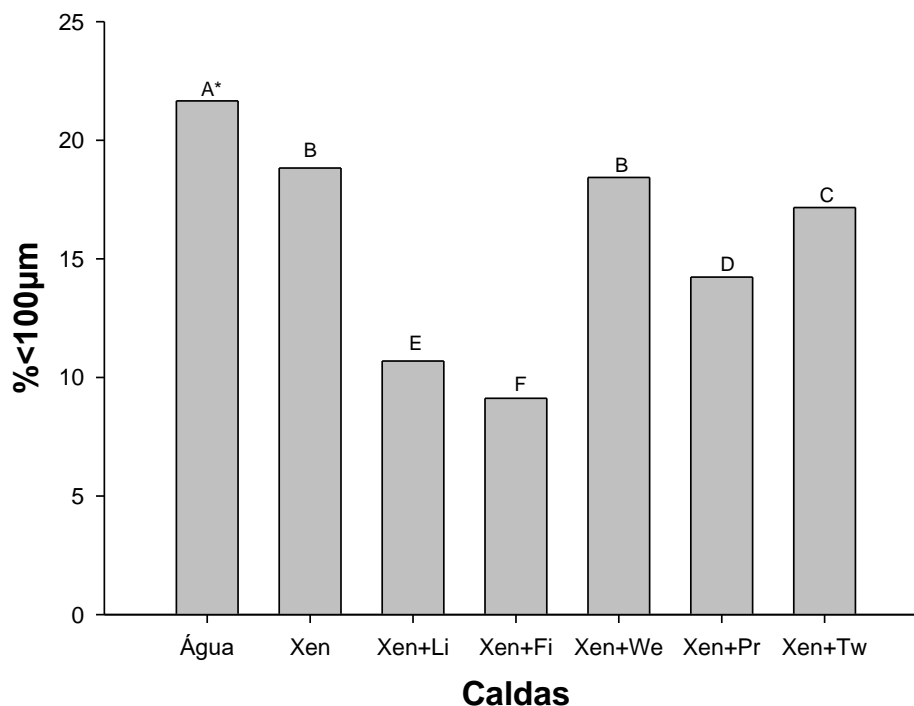


Figura 10. Percentual de gotas menores que 100µm. *Letras comparam diferenças pelo teste de Tukey a 5% de significância.

4 DISCUSSÃO

As caldas avaliadas apresentaram características semelhantes, sendo a sedimentação e formação de espuma nas primeiras horas após agitação. As variações nas características das caldas podem ser de ordem química dos ingredientes ativos, que podem reagir entre si e com os elementos presentes na água (Silva; Ferreira; Ferreira, 2007). Neste caso, por se tratar de uma formulação do bioinseticidas WG (grânulos dispersíveis em água), a sedimentação observada é resultado da ineficiência do bioinseticida em dispersar por completo, podendo ser uma deficiência da formulação (Sprankle *et al.*, 1975), dessa forma, como ocorreu a redispersão do conteúdo depositado no fundo da proveta, as caldas são consideradas compatíveis sob agitação segundo a NBR 13785 (ABNT, 2014). A espuma formada também pode estar relacionada característica da formulação do bioinseticida. A espuma é um fator prejudicial para operação de pulverização, uma vez que pode gerar derramamentos de calda com perdas de produtos e da segurança da atividade.

A adição do adjuvante Pr reduziu o pH e aumentou a condutividade elétrica para todos os horários após preparo da calda. Embora meios ácidos possam

beneficiar o desenvolvimento do Bt (Liu *et al.*, 1998), meios com pH abaixo de 3,0 podem solubilizar os cristais inseticidas antes da ingestão pelo inseto alvo prejudicando a eficiência do controle (El-Bendary, *et al.*, 2017; Gong, *et al.*, 2012). Essa acidificação maior na calda com adjuvante Pr, faz com que também seja maior a quantidade de íons disponíveis na calda. Uma elevada condutividade elétrica pode implicar em uma maior reatividade na calda, causando redução na eficiência dos produtos (Rheinheimer & Souza, 2000).

Dentre os principais objetivos da utilização de adjuvantes nas caldas de aplicação estão buscar ajustes no tamanho de gotas, estabilidades das caldas e melhoria na cobertura proporcionada pela pulverização (Ryckaert *et al.*, 2008; Marubayashi *et al.*, 2021). Os adjuvantes Fi e We apresentaram os menores valores de tensão superficial e ângulo de contato, indicando a influência direta da tensão superficial sobre o ângulo de contato (Salvalaggio *et al.*, 2017). Para o sucesso dos bioinseticidas Bt é necessária à sua ingestão pelo inseto alvo (Jurat-Fuentes & Crickmore, 2017; Schünemann *et al.*, 2014), um menor ângulo de contato da gota com a superfície proporciona um maior espalhamento da gota e por fim garante uma maior cobertura foliar, aumentando a probabilidade da ingestão do Bt pelo alvo (Salvalaggio *et al.*, 2017).

O adjuvante Fi também foi responsável pelo maior diâmetro mediano volumétrico de gotas (DMV), seguido de Li que apresentou o segundo maior DMV. Gotas maiores são menos suscetíveis à deriva, e apresentam menor potencial de evaporação, reduzindo assim o risco dos esporos da bactéria se tornarem inviáveis devido a desidratação, mantendo assim mais protegidos a exposição direta de raios ultravioleta (Sundaram e Sundaram, 1996; Antuniassi, 2012). Dessa forma, gotas maiores podem garantir maior tempo de persistência do Bt em ambientes desfavoráveis, garantindo assim maior eficiência do bioinseticida (FAO, 2007; Aguiar Júnior *et al.*, 2011).

Assim uma pulverização composta por gotas mais grossas proporciona uma aplicação mais eficiente e segura. Nesse sentido o Span indica a uniformidade do espectro de gotas, de modo que quanto mais próximo de 0, mais uniforme é a pulverização, proporcionando menor variação no tamanho das gotas em relação ao DMV. O Span é influenciado diretamente pela composição da calda (Mendonça *et al.*,

1999; Sijs e Bonn, 2020; Griesang *et al.*, 2022). As caldas contendo o bioinseticida isolado em mistura com os adjuvantes Li, Fi e We foram as que apresentaram os menores valores de Span, indicando que estes não interferiram na uniformidade da pulverização. Já os adjuvantes Pr e Tw apresentaram Span próximo de 2, indiciando um espectro de gotas menos uniforme e, portanto, menos eficiente.

Gotas menores que 100 micrometros são mais sensíveis à deriva que, caso corra, implicará em menor depósito da calda de bioinseticida Bt sobre a cultura, (Oliveira *et al.*, 2015). Os adjuvantes Fi e Li apresentaram os menores percentuais de gotas menores que 100 micrometros, com relação inversa com o DMV de forma que com maior DMV menor o percentual de gotas menores que 100 micrometros, dessa forma, contribuem para a melhor eficiência da pulverização, pois gotas maiores são mais pesadas e menos suscetíveis ao arraste por deriva e a perda por evaporação, reduzindo assim o dano ambiental (Damak *et al.*, 2016; Gil *et al.*, 2014).

Além da calda a ponta de pulverização escolhida bem como a pressão de trabalho modificam o espectro de gotas, interferindo no DMV e Span, implicando que uma pulverização eficiente seja de produtos químicos ou biológicos depende outros parâmetros além da calda de aplicação compatível (Ferreira *et al.*, 2013; Ferguson *et al.*, 2016).

5 CONCLUSÃO

Os adjuvantes demonstraram modificar as características relacionadas a pulverização do bioinseticida.

O adjuvante Fi apresentou melhores características quanto ao espectro de tamanho e uniformidade de gotas e ângulo de contato, proporcionando assim uma pulverização com menor suscetibilidade à deriva, e maior espalhamento. O adjuvante Pr reduziu o pH abaixo do ideal para bioinseticida, e proporcionou um espectro de gotas mais desuniforme e com menor capacidade espalhamento de gotas.

6 REFERÊNCIAS

- Aguiar Júnior HO, Raetano CG, Prado EP, Pogetto MHF DO A DaL, Christovam R DE S, Gimenes MJ, (2011) Adjuvantes e assistência de ar em pulverizador de barras sobre a deposição da calda e controle de *Phakopsora pachyrhizi* (Sydow & Sydow). **Summa Phytopathologica**, v.37, p.103-109
- ALVES SB, MOINO JUNIOR A, ALMEIDA JEM, Produtos fitossanitários e entomopatógenos. Em: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. 2ed. 4:217–238.
- Antuniassi UR (2012) **Tecnologias de aplicação: Conceitos básicos, inovações e tendências**. Botucatu: FCA UNESP.
- Associação Brasileira De Normas Técnicas (2014) **NBR 13875: Agrotóxico - Avaliação de compatibilidade físico-química**.
- Bravo A, Gómez I, Porta H, García-Gómez B, Rodriguez-Almazan C, Pardo L, Soberón M (2013) Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. **Microbial Biotechnology** 6:17–26.
- Bravo A, Pacheco S, Gómez I, García-Gómez B (2017) Insecticidal Proteins from *Bacillus thuringiensis* and Their Mechanism of Action. Em: FIUZA, L. M.; POLANCZYK, R. A.; CRICKMORE, N. (Eds.). ***Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*: Characterization and use in the field of biocontrol**. Cham: Springer International Publishing 53–66.
- Chapman PJ, Mattock S, Savage R (1998) Controls on the authorization and use of adjuvants with agrochemicals in the UK. **Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference – Pests and Diseases**. BCPC. Farmham 121-126.
- Damak M, Mahmoudi SR, Hyder MN, Varanasi KK (2016) Enhancing droplet deposition through in-situ precipitation. **Nature Communications** 7:1-9.
- Dos Santos CAM, Do Nascimento J, Gonçalves KC, Smaniotto G, Zachin LF, Ferreira MC, Polanczyk RA (2021) Compatibility of Bt biopesticides and adjuvants for *Spodoptera frugiperda* control. **Scientific Reports** 11:5271.
- El-Bendary MA, Elsoud MMA, Hamed SR, Mohamed SS (2017) Optimization of mosquitocidal toxins production by *Bacillus thuringiensis* under solid state fermentation using Taguchi orthogonal array. **Acta Biologica Szegediensis** 61, 135-140.
- Ferguson JC, Hewitt AJ, O'Donnell CC (2016) Pressure, droplet size classification, and nozzle arrangement effects on coverage and droplet number density using air-inclusion dual fan nozzles for pesticide applications. **Crop Protection** 89:231–238.
- Ferreira MC, Matuo T, Barbosa JC, (1999) Validação de modelo matemático para simulação da capacidade operacional de turboatomizadores em citros. **Engenharia Agrícola Jaboticabal** 19:99-110.

Ferreira MC, Lasmar O, Decaro Junior ST, Neves SS, Azevedo LH (2013) Qualidade da aplicação de inseticida em amendoim (*Arachis hypogaea* L.), com e sem adjuvantes na calda, sob chuva simulada. **Bioscience Journal** 29:1431-1440.

Gil E, Balsari P, Gallart M, Llorens J, Marucco P, Andersen PG, Fàbregas X, Llop J (2014) Determination of drift potential of different flat fan nozzles on a boom sprayer using a test bench. **Crop Protection** 56:58-68.

Gong Y, Li M, Xu D, Wang H, He J, Wu D, Chen D, Qiu N, Bao Q, Sun M, Yu Z (2012) Comparative proteomic analysis revealed metabolic changes and the translational regulation of Cry protein synthesis in *Bacillus thuringiensis*. **Journal Proteomics** 75:1235-1246.

Griesang F, Decaro RA, Santos CAM, Santos ES, Roque NHL, Ferreira MC (2017) How Much Do Adjuvant and Nozzles Models Reduce the Spraying Drift? Drift in Agricultural Spraying. **American Journal of Plant Sciences** 8(11):2785-2794.

Jurat-Fuentes JL & Crickmore N (2017) Specificity determinants for Cry insecticidal proteins: Insights from their mode of action. **Journal of Invertebrate Pathology** 142:5-10.

Liu BL & Tzeng YM (1998) Optimization of growth medium for production of spores from *Bacillus thuringiensis* using response surface methodology. **Bioprocess Engineering** 18:413-418.

Marubayashi RY, Oliveira RBD, Ferreira MDC, Roggia S, Moraes EDD, & Saab, OJ (2021) Redução da deriva da pulverização de inseticidas com diferentes adjuvantes e bicos de pulverização. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** 25:282-287.

Mendonça CG, Velini ED, Martins D, Mendonça CG, (1999) Efeitos de surfatantes sobre a tensão superficial e a área de molhamento de soluções de glyphosate sobre folhas de tiririca. **Planta Daninha** 13(3):355-365.

Oliveira RBD, Antuniassi UR, Gandolfo MA (2015) Spray adjuvant characteristics affecting agricultural spraying drift. **Engenharia Agrícola** 35:109-116

Rheinheimer DS E Souza RO (2000) Condutividade elétrica e acidificação de águas usadas na aplicação de herbicidas no Rio Grande do Sul. **Ciência Rural** 30:97-104.

Ryckaert B, Spanoghe P, Heremans B, Haesaert G, Steurbaut W, (2008) Possibilities to use tank-mix adjuvants for better fungicide spreading on triticale ears. **Journal Agriculture Food Chemical** 56:8041–8044.

Santos CAM, Santos RTS, Della'Vechia JF, Griesang F, Polanczyk RA, Ferreira MC, (2019) Effect of addition of adjuvants on physical and chemical characteristics of Bt bioinsecticide mixture. **Scientific Reports** 9:12525.

Schünemann R, Knaak N, Fiuza LM (2014) Mode of action and specificity of *Bacillus thuringiensis* toxins in the control of caterpillars and stink bugs in soybean culture. **ISRN Microbiology** 135675.

Sijs R, Bonn D (2020) The effect of adjuvants on spray droplet size from hydraulic nozzles. **Pest Management Science** 76:3487–3494.

Silva JF, Ferreira LR, Ferreira, FA (2007) Herbicidas: absorção, translocação, metabolismo, formulação e misturas. In: Silva, AA, Silva JF (Eds.). **Tópicos em manejo de plantas Daninhas** 118-154.

Sprankle P, Meggitt WF, Penner D (1975) Rapid inactivation of glyphosate in the soil. **Weed Science** 23:224-228.

Sundaram, A & Sundaram, KMS (1996). Effect of sunlight radiation, rainfall and droplet spectra of sprays on persistence of *Bacillus thuringiensis* deposits after application of dipel® 76af formulation onto conifers. **Journal Environmental Science** 31:1119-1154.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (2007). **Phytosanitary treatments for regulated pests**. IPPC FAO.

CAPÍTULO 3 – COMPATIBILIDADE DE ADJUVANTES E BT BIOINSETICIDA PARA CONTROLE DA LAGARTA DO CARTUCHO

Resumo: A lagarta do cartucho *Spodoptera frugiperda* é um inseto polífago e tem desenvolvido continuamente resistência aos principais inseticidas químicos e plantas Bt. Uma alternativa mais sustentável e com menor pressão de seleção para resistência é a utilização de bioinseticidas baseados em *Bacillus thuringiensis* (Bt) para seu controle. Entretanto as pulverizações de bioinseticidas são realizadas em misturas com produtos químicos que podem afetar a eficiência do bioinseticida. Assim este trabalho avaliou a compatibilidade entre Bt e adjuvantes no controle da lagarta do cartucho. Foi analisada a compatibilidade do bioinseticida Bt com 5 adjuvantes (Li, Fi, We, Pr e Tw). Para a compatibilidade, os adjuvantes Li e Tw apresentaram influência positiva sobre o Bt, já Fi, We e Pr prejudicaram o desenvolvimento do Bt. Quanto a influência dos adjuvantes misturados a calda do bioinseticida Bt, o adjuvante Pr reduziu o pH da calda abaixo de 3,0 sendo um nível crítico para sobrevivência do Bt. Porém, apenas We apresentou redução na mortalidade *S. frugiperda* em 0 e 2 horas após o preparo da calda, não diferindo das demais caldas, que não afetaram a mortalidade a partir de 6,0 horas após o preparo.

1 INTRODUÇÃO

O controle de insetos-fitófagos é uma das principais atividades realizadas visando manter o potencial produtivo das lavouras. Dentre esses insetos, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), popularmente conhecida como lagarta do cartucho, é uma espécie polífaga conhecida por afetar mais de 350 espécies de plantas (Kenis, 2023; Chen & Palli, 2023). O controle deste inseto é feito na maioria dos cultivos, por meio da pulverização de inseticidas químicos e plantas geneticamente modificadas.

Essas técnicas de controle vêm apresentando relatos cada vez mais frequentes de resistência (Bolzan *et al.*, 2019; Gutiérrez-Moreno *et al.*, 2019), por esses fatores o uso de bioinseticidas vem ganhando destaque. Bioinseticidas microbianos têm organismos vivos (bactérias, fungos e vírus) como ingrediente ativo, dentre esses microrganismos a bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) está presente em mais de 50% dos bioinseticidas do mercado, sendo o principal microrganismo utilizado nas formulações (de Maagd, *et al.*, 2015).

O modo de ação de Bt está relacionado a proteínas inseticidas produzidas durante sua fase de crescimento vegetativo (Vip) e esporulação (Cry), que possuem uma vasta gama de organismos alvo, como insetos, ácaros e nematoides (Valicente *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2014; Van Frankenhuyzen, 2009; De Maagd *et al.*, 2003; Schnepd *et al.*, 1998). A sua seletividade e especificidade se deve ao modo de ação. Após a ingestão de cristais e esporos por larvas de insetos suscetíveis, os cristais são solubilizados pelo pH alcalino do intestino médio e as protoxinas resultantes ativadas por proteases intestinais. As proteínas inseticidas ativadas se ligam a receptores intestinais específicos, formando poros, que resultam na lise celular. Com redução de pH no interior do inseto o esporo germina e causa a morte por septicemia (Valicente *et al.*, 2018; Bravo *et al.*, 2017; Vachon *et al.*, 2012).

A aplicação desses produtos nas áreas de cultivo é feita através da pulverização, com calda contendo somente o bioinseticida, ou em mistura com produtos químicos sintéticos (Salvalaggio *et al.*, 2017). Dentre esses produtos, a adição de adjuvantes é uma prática comum entre os produtores. Adjuvantes adicionados a calda modificam suas características físico-químicas como: tensão

superficial, condutividade elétrica e pH, visando elevar a eficiência da pulverização (Santos *et al.*, 2019).

Além de modificar características das caldas de aplicação, os adjuvantes podem afetar o desempenho do Bt bioinseticida, podendo ser tóxicos e inibir o seu desenvolvimento, parcial ou por completo. Por outro lado, podem elevar a virulência do Bt (dos Santos *et al.*, 2021; Mesnage e Antoniou, 2015). Ao estudar os efeitos de adjuvantes sobre bioinseticidas Bt, é possível selecionar e desenvolver adjuvantes que favoreçam o desempenho do Bt em formulações e em mistura de tanque para aplicação (Lin *et al.*, 2023).

Dessa forma, este trabalho objetivou estudar a compatibilidade entre Bt e adjuvante, assim como a eficiência das aplicações do bioinseticida no controle de *S. frugiperda*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Criação de *Spodoptera frugiperda*

Os espécimes utilizados neste trabalho foram obtidos de criação presente no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes Praga – LCMAP, Unesp/FCAV, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. Os adultos foram mantidos em gaiolas de PVC cilíndricas (35 x 30 cm), com dieta de solução de mel à 10%, e imaturos mantidos com dieta artificial (Greene *et al.*, 1976). As posturas foram coletadas diariamente, e as larvas individualizadas após a eclosão em potes de 7 cm de diâmetro e 5 cm de altura, contendo dieta artificial até atingirem o estágio de pupas, posteriormente acondicionadas em gaiolas para emergências dos adultos. A criação foi mantida em câmara climatizada com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $60\% \pm 10\%$, e fotoperíodo de 12:12 (luz:escuro).

2.2 Tratamentos utilizados nos experimentos

Para as avaliações de compatibilidade de Bt bioinseticidas e adjuvantes foram estabelecidos tratamentos seguindo a recomendação do fabricante.

Tabela 1: Produtos comerciais utilizados para composição das caldas para os testes realizados.

Caldas*	Dosagens	i.a. dos produtos	Sigla tratamentos
Xentari®	425g ha ⁻¹	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. aizawai	Xen
Xentari® + Li-700®	425g ha ⁻¹ + 0,02% v/v	Bt + Lecitina e Ácido Propiônico	Xen+Li
Xentari® + Fighter®	425g ha ⁻¹ + 0,1% v/v	Bt + Éter laurílico de polioxietileno	Xen+Fi
Xentari®+Wetcit Gold®	425g ha ⁻¹ + 0,15% v/v	Bt + Óleo de laranja	Xen+We
Xentari® + Protac®	425g ha ⁻¹ + 200g ha ⁻¹	Bt + Sulfatos e Ác. hidroxicarboxílico	Xen+Pr
Xentari® + Tween 80	425g ha ⁻¹ + 0,1% v/v	Bt + Éster de polietileno sorbitol	Xen+Tw

*Todas as dosagens são recomendadas pelos fabricantes para o volume de calda de 100L ha⁻¹. i.a.: Ingrediente ativo

2.3 Compatibilidade *in vitro*

O meio de cultura ágar nutriente (Kasvi®), utilizado como substrato, foi preparado com 23,0 gramas do Nutrient Agar® dissolvidos em 1 litro de água destilada, e autoclavado a 1 atm. por 40 minutos. Após atingir temperatura de 45°C, ponto em que o meio ainda não solidifica, o adjuvante na dose descrita na Tabela 2 foi adicionado e homogeneizado ao meio de cultura com o auxílio de um agitador magnético. A seguir, esse meio foi vertido em placas de Petri (9,0 cm Ø), totalizando 15 repetições/placas para cada tratamento. O experimento foi composto de 5 combinações de Bt bioinseticidas e adjuvante mais o Bt bioinseticidas isolado. Para a testemunha foi utilizado somente Nutrient Agar®.

Após solidificação do meio contendo o adjuvante foi inoculada uma alíquota de 5,0 µL da suspensão contendo Xentari® no centro da placa de Petri. A seguir, as placas inoculadas foram mantidas em câmaras de germinação (B.O.D.) por um período de sete dias, nas condições favoráveis ao desenvolvimento do Bt (28 ± 2°C), UR de 70 ± 10% e fotófase de 12 h. Sete dias após a inoculação, a área de colônia de cada placa/repetição (cm²) foi copiada para folha sulfite A4 branca e recortada com tesoura, sendo essa área mensurada com auxílio de um aparelho medidor de área foliar (modelo LI - 3100, Li-cor®).

Para a contagem dos esporos foram raspadas as colônias que se desenvolveram no meio de cultura, mais adjuvante. O material coletado foi transferido para tubos Falcon® com 10 mL de água estéril. Essa suspensão foi homogeneizada com auxílio de um agitador (Phoenix® Modelo AP56) por 60 segundos e 500 µL foram retirados para contagem dos esporos em câmara de Neubauer em microscópio ótico Zeiss® [28].

2.4 Testes de mortalidade de *Spodoptera frugiperda* para compatibilidade *in vitro*

Após o final do bioensaio anterior uma placa de Petri foi tomada aleatoriamente em cada tratamento para os testes de mortalidade de *S. frugiperda*. As colônias que cresceram em meio de cultura mais adjuvante foram raspadas e transferidas para um tubo Falcon com 10 mL de água destilada. O tubo foi agitado em vórtex para formar uma suspensão, ajustada para 3×10^8 esporos. mL⁻¹, com auxílio de câmara de Neubauer. A seguir, 70 µL da suspensão foi aplicada na superfície de dieta artificial (Greene *et al.*, 1976) disposta em 100 potes cilíndricos de acrílico de 2,5 cm de diâmetro por 1 cm de altura, cada um com uma lagarta de segundo ínstar de *S. frugiperda*, sendo 10 repetições (n=10). Os potes contendo as lagartas foram então levados a B.O.D e mantidos por 7 dias, com fotoperíodo de 12:12, temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Após este período foi avaliado a mortalidade, sendo considerada morta a lagarta que não apresentou movimento após ser tocada por pincel de cerdas macias.

2.5 Teste de mortalidade *Spodoptera frugiperda* para caldas de aplicação

Foram preparadas caldas de pulverização nas doses descritas na Tabela 1. Foi depositado 70 µL de calda com 0 hora logo após o preparo, 2, 6 e 24 horas após o preparo, sobre a dieta artificial de Greene *et al.* (1976), disposta em 100 potes cilíndricos de acrílico de 2,5 cm de diâmetro por 1 cm de altura, após período de secagem da calda foi adicionado uma lagarta de segundo ínstar de *S. frugiperda*, por repetição, com total de 10 repetições por horário (n=10). Os potes contendo as lagartas foram então levados a B.O.D e mantidos por 7 dias, com fotoperíodo de 12:12, temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Após este período foi avaliado a mortalidade, sendo

considerada morta a lagarta que apresentou movimento após ser tocada por pincel de cerdas macias.

2.6 Potencial hidrogeniônico (pH)

As caldas preparadas com bioinseticida e a adjuvantes utilizadas no ensaio anterior tiveram o pH medido antes da aplicação sobre a dieta nos diferentes tempos após o preparo com pHmetro QUIMIS® Q400AS, em temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa à $65 \pm 5\%$.

2.7 Análise dos dados

Os resultados foram submetidos aos testes de homoscedasticidade (Levene) e normalidade de resíduos (Shapiro-Wilk), ambos ao nível de significância de 5%. Os resultados dos testes de compatibilidade *in vitro* e pH da calda foram comparadas pelo teste F e as médias agrupadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. O teste de mortalidade para calda de aplicação foi analisado por modelo estatístico não paramétrico de Kruskal – Walis a 5% de significância.

A classificação de compatibilidade foi realizada conforme Alves *et al.* (1998), onde os valores de T entre 0 e 30 caracterizam mistura muito tóxica, 31 a 45 tóxica, 46 a 60 moderadamente tóxica e acima de 60 compatível. Essa escala se baseia nos valores médios da porcentagem de esporulação e crescimento das colônias de *B. thuringiensis*, sendo os valores de T calculados com a fórmula $(T = 20 * (CV) + 80 * (ESP) / 100)$, onde T = valor corrigido do crescimento vegetativo e esporulação para classificação do produto; CV = porcentagem de crescimento vegetativo em relação a testemunha; ESP = porcentagem de esporulação em relação a testemunha.

3 RESULTADOS

3.1 Crescimento vegetativo

A adição dos adjuvantes ao meio de cultura impactou de forma significativa o Bt. O tratamento Tw proporcionou crescimento vegetativo maior que o controle representado pelo tratamento Xen. Entretanto a adição dos adjuvantes Li e Fi reduziu do crescimento em relação ao Xen, sendo o adjuvante Fi o que apresentou a menor área de colônia entre todos os tratamentos. Os adjuvantes We e Pr, impediram

completamente o crescimento da bactéria, resultando em placas sem nenhuma colônia, impossibilitando os demais testes (Figura 1).

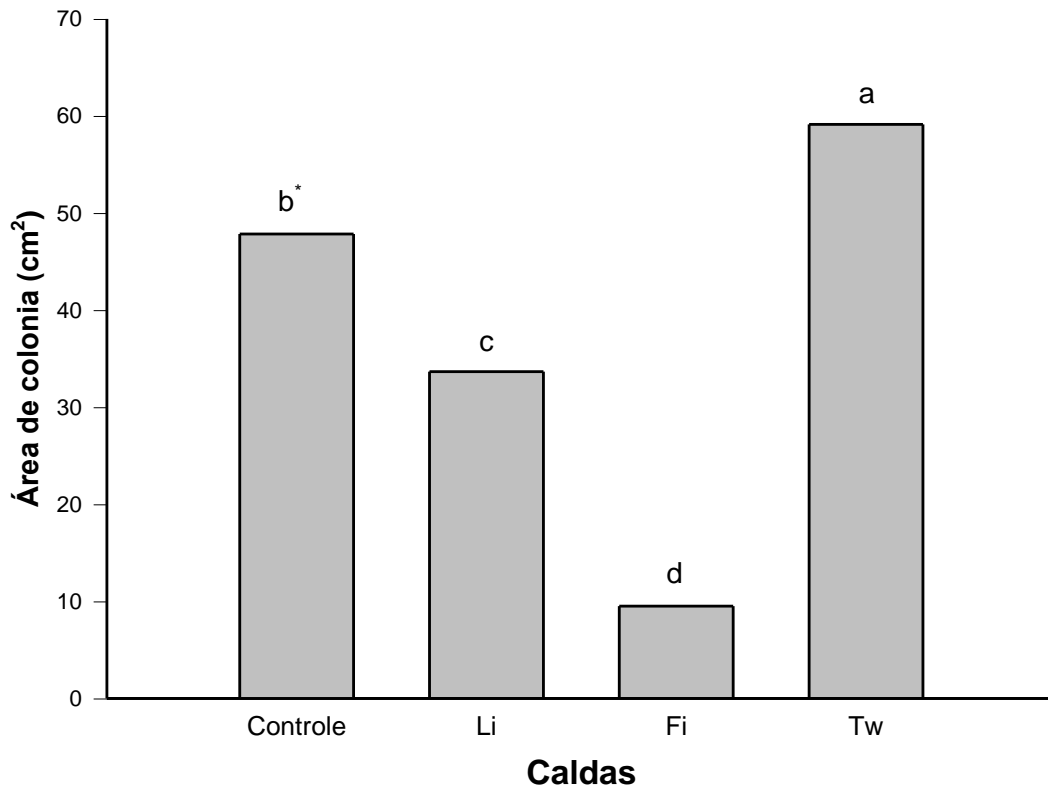


Figura 1. Tamanho médio de colônias das misturas de Bt bioinseticidas com adjuvantes. *Letras minúsculas comparam efeito entre tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de significância. Legenda: Controle – meio de cultura sem adjuvantes; Li – Li 700; Fi – Fighter; Tw – Tween 80.

3.2 Concentração de esporos

O adjuvante Li apresentou efeito aditivo com maior número de esporos dentre todos os tratamentos, enquanto Fi e Tw foram inferiores a Li e não se diferenciaram do controle quanto a concentração de esporos (Figura 2).

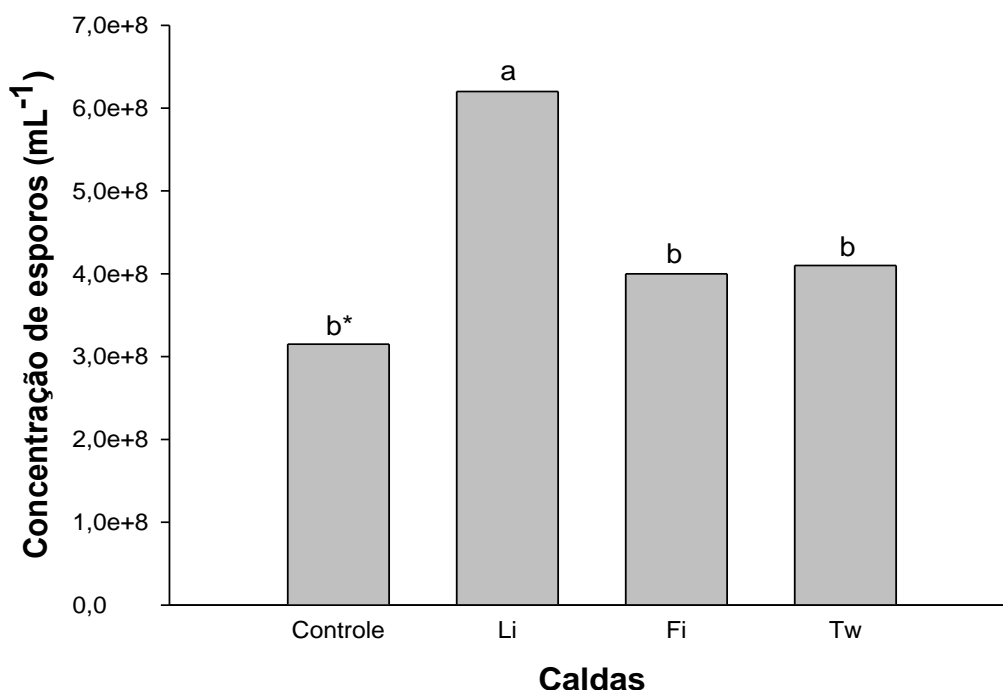


Figura 2. Contagem média de esporos obtidos das misturas de Bt bioinseticidas com adjuvantes *in vitro*. *Letras minúsculas comparam efeito entre tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de significância. Legenda: Controle – meio de cultura sem adjuvantes; Li – Li 700; Fi – Fighter; Tw – Tween 80.

3.3 Classificação de compatibilidade dos adjuvantes

Quanto a classificação de compatibilidade dos adjuvantes com o Bt bioinseticida através do valor de T, os adjuvantes Li, Fi e Tw foram classificados como compatíveis. Entretanto os adjuvantes We e Pr, foram classificados como muito tóxicos por inibirem completamente o desenvolvimento do Bt.

Tabela 2. Valores T para classificação do efeito dos adjuvantes sobre *Bacillus thuringiensis*.

Caldas	Valor T	Classificação
Xen + Li	151,85	Compatível
Xen + Fi	92,86	Compatível
Xen + Tw	115,83	Compatível
Xen + We	0	Muito tóxico
Xen + Pr	0	Muito tóxico

3.4 Mortalidade de *S. frugiperda* para compatibilidade *in vitro*

Todas as suspensões apresentaram mortalidade acumulada ao sétimo dia superior a 60%, a suspensão com adição do adjuvante Fi foi igual ao inseticida biológico isolado, a suspensão com adição de Li apresentou mortalidade superior a 80%, apresentando mortalidade superior ao inseticida biológico isolado. Já Tw apresentou mortalidade próxima a 80% não diferindo do Li e do bioinseticida isolado (Figura 3).

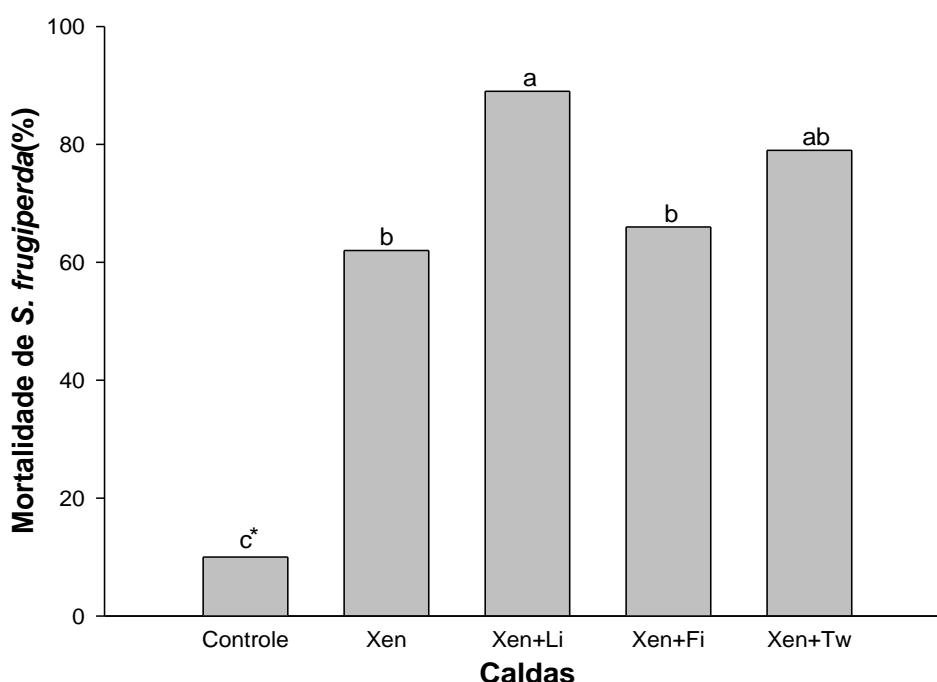


Figura 3. Mortalidade acumulada de *Spodoptera frugiperda* submetida a misturas dos adjuvantes e Bt bioinseticida no 7º dia após aplicação. *Letras minúsculas comparam efeito entre tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de significância. Legenda: Controle – meio de cultura sem adjuvantes; Li – Li 700; Fi – Fighter; Tw – Tween 80.

3.5 Potencial hidrogeniônico (pH)

Todas as caldas apresentaram pH na faixa entre 4,0 e 5,0 com exceção de Xen+Pr que apresentou pH inferior a 3,5. A calda Xen+We apresentou os maiores valores de pH em todos os horários de avaliação não diferindo de Xen (bioinseticida isolado) a 0 hora e diferindo nos demais horários. O adjuvante Pr apresentou os menores valores de pH em todos os horários de avaliação. A calda Xen+Fi não apresentou diferença do pH em relação a Xen isolado, a calda Xen+Tw diferiu de Xen

nos horários de 0 e 2 horas, e não diferiu nos horários de 6 e 24 horas. Para Xen+Li houve valores de pH menores que Xen nos horários de 0, 2 e 6 horas e semelhante no horário de 24 horas (Figura 4).

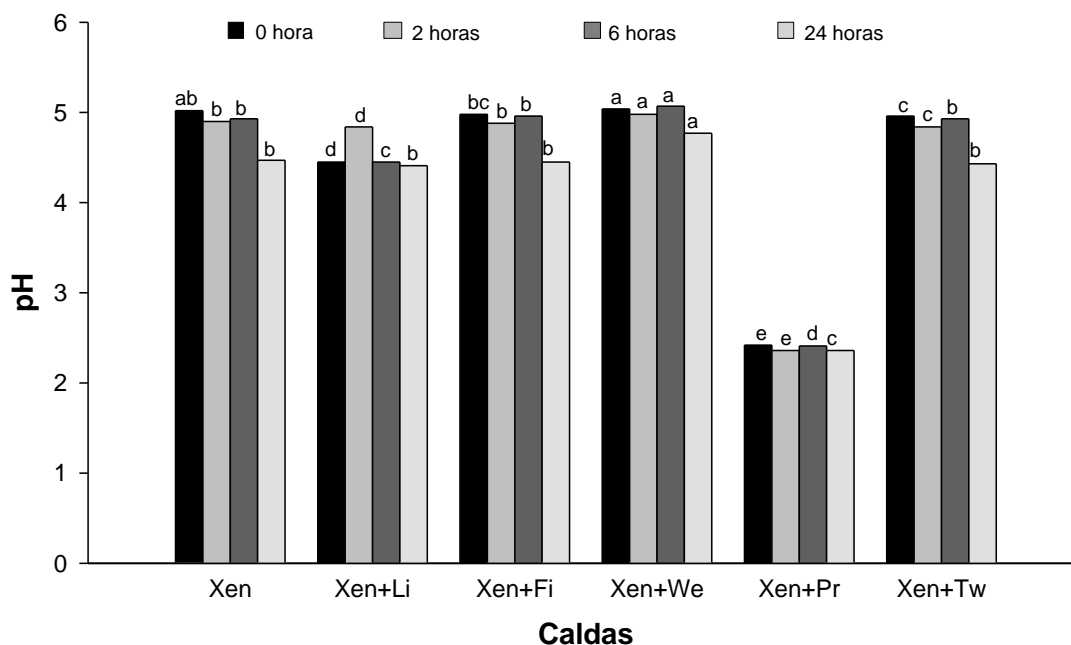


Figura 4. Potencial hidrogeniônico nos diferentes horários de repouso após agitação. *Letras minúsculas comparam diferenças entre tratamentos dentro de cada horário, pelo teste de Tukey a 5% de significância. Legenda: Xen – Xentari®; Xen+Li – Xentari® + Li 700®; Xen + Fi – Xentari® + Fighter®; Xen+We – Xentari® + Wetcit Gold®; Xen+Pr - Xentari® + Protac®; Xen+Tw – Xentari® + Tween 80®.

3.6 Mortalidade de *S. frugiperda* para caldas de pulverização de bioinseticida Bt

Nas avaliações do efeito dos adjuvantes sobre a mortalidade de *S. frugiperda*, com 70 µL de cada calda aplicada diretamente sobre a dieta artificial após 0, 2, 6 e 24 horas de preparo, todos os tratamentos resultaram em mortalidade maior que 80% sendo consideradas eficientes para as lagartas (Figura 5). As caldas não diferiram estatisticamente entre si dentro de cada horário e entre horários dentro de cada calda, exceto para a calda Xen+We, nas avaliações de 0 e 2 horas que resultaram em mortalidade menor que os demais tratamentos.

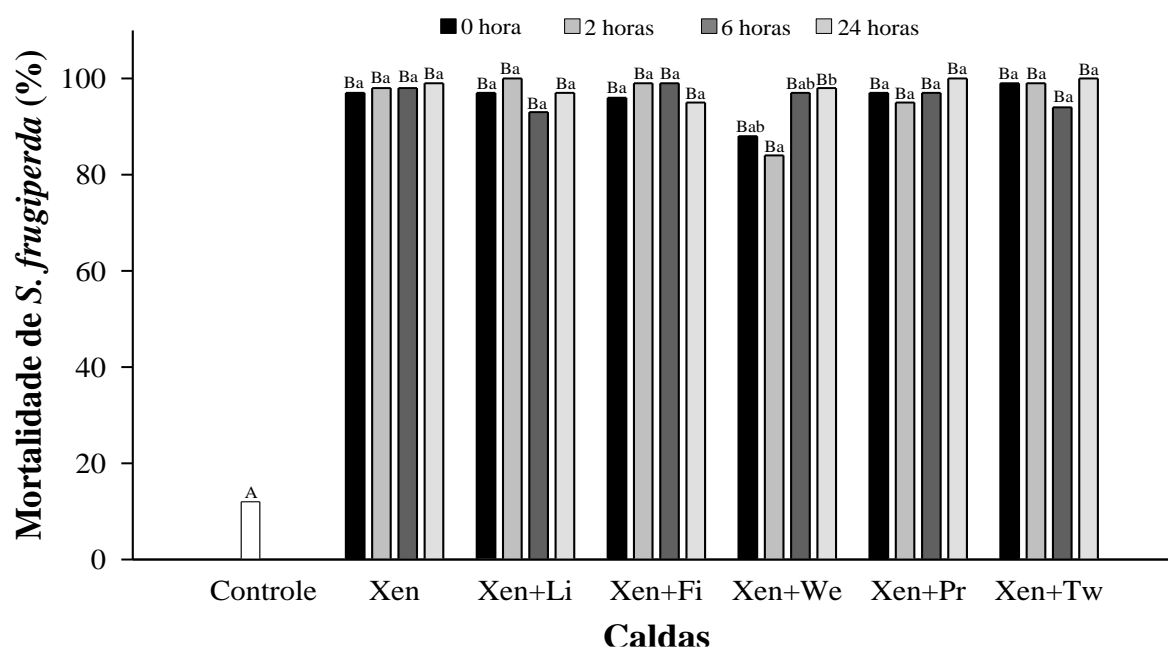


Figura. 5. Mortalidade acumulada de *Spodoptera frugiperda* submetida a misturas dos adjuvantes e Bt bioinseticida em diferentes horários no 7º dia após aplicação em diferentes horários após o preparo das caldas. *Letras maiúsculas comparam efeito entre caldas e minúsculas dos horários nas caldas pelo teste de Kruskal - Walis a 5% de significância. Legenda: Xen – Xentari®; Xen+Li – Xentari® + Li 700®; Xen + Fi – Xentari® + Fighter®; Xen+We – Xentari® + Wetcit Gold®; Xen+Pr - Xentari® + Protac®; Xen+Tw – Xentari® + Tween 80®.

4 DISCUSSÃO

Foram utilizadas duas maneiras para avaliar a ação dos adjuvantes sobre o bioinseticida Bt, os testes *in vitro* avaliaram o efeito da interação entre esporos de Bt e adjuvantes, enquanto o teste da mistura de calda avaliou essa interação sobre a ação inseticida do Bt formulado.

Adjuvantes tem potencial de modificar características físico-químicas das caldas de aplicação como, pH, condutividade elétrica e a tensão superficial. Dessa forma, o crescimento vegetativo de *B. thuringiensis* pode ser fortemente afetado por estas alterações no meio. O adjuvante Tw resultou em crescimento vegetativo maior. Este adjuvante é composto por Polissorbato 80, molécula que pode sofrer hidrólise e liberar ácido oleico (Kerwin, 2008), este ácido graxo é sintetizado pelo Bt com custo de ATP (Zhou *et al.*, 2018), assim, o Tw pode ter sofrido hidrólise e fornecido ácido oleico diretamente para as células de Bt, resultando em economia de energia e, portanto, em tamanho de colônia maior que os demais tratamentos.

Os adjuvantes Li e Fi proporcionaram o menor crescimento vegetativo da bactéria quando comparados ao meio de cultura isolado. Porém, quando se observa a esporulação para o adjuvante Li, composto de lecitina de soja e ácido propiônico, houve concentração de esporos maior que o bioinseticida isolado. O adjuvante Fi composto pelo surfactante Éter laurílico apresentou concentração de esporos semelhante ao bioinseticida isolado. Durante o crescimento de colônias de Bt, o início da esporulação é marcado pela redução na concentração de nutrientes no meio de cultura. O Li pode ter fornecido nutrientes, proporcionando que colônias menores produzissem um número maior de esporos em relação ao meio de cultura sem adjuvante, uma vez que os derivados de soja são utilizados por *B. thuringiensis* como fonte de carbono durante a fermentação (Khedher *et al.*, 2013; Ennouri *et al.*, 2013; Zghal, *et al.*, 2018).

A adição de Fi pode ter parcialmente inibido o crescimento de Bt, que resultou em um tamanho de colônia menor (Figura.1), este efeito pode ter sido revertido por meio do processo de biorremediação da bactéria, metabolizando o adjuvante e o aproveitando durante a fase de esporulação (Ferreira *et al.*, 2016), período em que as células de Bt são capazes de ativar rotas de metabolismo necrotróficas e podendo aproveitar moléculas possivelmente tóxicas durante o desenvolvimento vegetativo (Verplaetse *et al.*, 2015), resultando em concentração de esporo semelhante ao bioinseticida isolado e ao adjuvante Tw. Isso acrescenta elementos de discussão ao conhecimento tradicional dos mecanismos de resistência de organismos vivos em liberar propágulos em situação de estresse. No caso em particular, considerando tanto os efeitos sobre a esporulação quanto sobre o desenvolvimento vegetativo, denota-se mais um efeito provável de metabolização do que de biorremediação.

O meio de cultura contendo os adjuvantes Pr e We inibiram completamente o desenvolvimento vegetativo da bactéria. O adjuvante Pr reduziu significativamente o pH da calda de Bt (Figura 4). Valores de pH muito baixos podem provocar a inativação de toxinas e impactam diretamente na bioatividade do Bt (El-Bendary *et al.*, 2017; Gong, *et al.*, 2012). O adjuvante We possui em sua formulação óleo essencial de citros, estes apresentam compostos que inibem o desenvolvimento de microrganismos, como d-limoneno e linalol, no campo esses compostos têm a função de proteger o fruto contra patógenos e quando adicionados ao meio de cultura inibiram

completamente o desenvolvimento do Bt (Brahmi *et al.*, 2021; Fancello *et al.*, 2016). Dessa forma, para a classificação de compatibilidade definida por (Alves *et al.*, 1998), que considera o crescimento vegetativo esporulação em relação ao meio de cultura isolado, os adjuvantes Li, Fi e Tw foram classificados como compatíveis, já os adjuvantes We e Pr foram classificados como muito tóxicos com valor de $T = 0$, não permitindo o desenvolvimento de *B. thuringiensis* no meio de cultura.

Para a mortalidade de *S. frugiperda* o adjuvante Li e Tw apresentaram as maiores mortalidades nos testes *in vitro*. Colônias de Bt cultivadas em meios de cultura mais ricos em nutrientes podem apresentar maior virulência e como consequência maior mortalidade do hospedeiro (Mokhtarnejhad *et al.*, 2022). Assim, a lecitina e ácido propiônico que compõem Li, e ácido oleico de Tw podem, além da esporulação e crescimento vegetativo, ter favorecido uma maior concentração de toxinas de Bt, aumentando a mortalidade em relação ao bioinseticida isolado. Já a mortalidade proporcionada por Fi não diferiu do bioinseticida isolado, o que pode indicar que o adjuvante não foi aditivo quanto ao efeito do Bt, o que não é considerado um resultado negativo uma vez que o objetivo dos adjuvantes é modificar parâmetros físico-químicos das caldas visando a qualidade e a segurança da distribuição na forma de gotas. Efeitos positivos na eficácia de controle são considerados complementares.

Na avaliação da mortalidade de *S. frugiperda* com os adjuvantes aplicados diretamente sobre a dieta artificial, os adjuvantes Li, Fi, Pr e Tw não apresentaram efeito significativo sobre a eficácia do bioinseticida comercial nos horários avaliados. O adjuvante We resultou em menor mortalidade com calda aplicada 2,0 horas após o preparo, com a mortalidade equivalendo aos demais tratamentos às 6,0 horas e se mantendo às 24 horas. Este efeito pode ter ocorrido devido aos compostos antimicrobianos do óleo essencial de citrus como d-limoneno e linalol (Brahmi *et al.*, 2021) que compõem o adjuvante We, apresentam volatilidade, se dispersando e perdendo efeito antimicrobiano após cerca de 3,0 horas (Inouye *et al.*, 2006). Bioinseticidas comerciais possuem adjuvantes co-formulantes responsáveis por estabilizar a formulação, garantir a mistura em tanque e proteger os microrganismos (Lin *et al.*, 2023), assim mesmo os adjuvantes We e Pr apresentando efeito negativo sobre o desenvolvimento do Bt *in vitro* (Figura 1), o mesmo não pode ser observado

para eficiência inseticida na calda de aplicação, nos resultados obtidos neste trabalho, em que as caldas apresentaram mortalidade superior a 80%.

Com base nos resultados obtidos, a ação de adjuvantes no crescimento vegetativo e esporulação de Bt pode ser influenciada pela natureza e interação química dos produtos, bem como a sua concentração. Dessa forma, são recomendadas avaliações *in vitro* para verificar a compatibilidade de componentes isolados que podem compor uma formulação de bioinseticida, ativando e protegendo os organismos, mas não dispensa uma avaliação complementar em calda de aplicação, para confirmar que a combinação entre formulações tem efeito sobre ação do bioinseticida em aplicações de campo, uma vez que as origens de cada formulação são altamente diversificadas.

5 CONCLUSÃO

A influência dos adjuvantes sobre o Bt é evidente e importante. Para a avaliação *in vitro* há formulações dos adjuvantes que compatível (Li e Tw), ou incompatível (Fi, Pr e We) de alguma forma afetando o efeito inseticida. Isto indica que o desenvolvimento de formulações de Bt pode ser potencializado com alguns adjuvantes e deve-se evitar outros. A combinação de produtos formulados na calda, que visa aspectos da tecnologia de aplicação, não afetou o controle de *S. frugiperda*, exceto We (2,0 horas após o preparo da calda), indicando que compatibilidade do adjuvante na mistura em tanque requer uma avaliação direta dos produtos formulados.

6 REFERÊNCIAS

- Alves SB, Moino, AJ, Almeida, JEM. Produtos fitossanitário e entomopatógenos Eds: **Controle microbiano de insetos** (ed. Alves, S.B) 765-777 (FEALQ 1998).
- Bolzan A, Padovez FE, Nascimento AR, Kaiser IS, Lira EC, Amaral FS, Kanno RH, Malaquias JB, Omoto C (2019) Selection and characterization of the inheritance of resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to chlorantraniliprole and cross-resistance to other diamide insecticides. **Pest Management Science** 75:2682-2689.
- Brahmi F, Mokhtari O, *et al.* (2021) Chemical and biological characterization of essential oils extracted from *citrus* fruit peels. **Materials Today: Proceedings** 45:7796-7799
- Bravo A, Pacheco S, Gómez I, García-Gómez B (2017) Insecticidal Proteins from *Bacillus thuringiensis* and Their Mechanism of Action In: **Bacillus thuringiensis and Lysinibacillus sphaericus: Characterization and use in the field of biocontrol** (eds. FIUZA, LM, POLANCZYK, RA, CRICKMORE, N) 53-66 (Springer, Cham).
- Chen, X, Palli, SR (2023) Development of multiple transgenic CRISPR/Cas9 methods for genome editing in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Pest Science** 96:1637–1650.
- de Maagd, RA (2015) *Bacillus thuringiensis*-based products for insect pest control. In: **Principles of Plant-Microbe Interaction: Microbes for Sustainable Agriculture** (ed. Lugtenberg, B.) 185-192 (Springer Cham).
- De Maagd, RA, Bravo, A, Berry, C, Crickmore, N, Schnepf, HE (2003) Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annual Review of Genetics** 37:409-433.
- Dos Santos CAM, Do Nascimento J, Gonçalves KC, Smaniotto G, Zachin LF, Ferreira MC, Polanczyk RA (2021) Compatibility of Bt biopesticides and adjuvants for *Spodoptera frugiperda* control. **Scientific Reports** 11:5271.
- El-Bendary MA, Elsoud MMA, Hamed SR, Mohamed SS (2017) Optimization of mosquitocidal toxins production by *Bacillus thuringiensis* under solid state fermentation using Taguchi orthogonal array. **Acta Biologica Szegediensis** 61:135-140.
- Ennouri K, Khedher SB, Jaoua S, Zouari N (2013) Correlation between delta-endotoxin and proteolytic activities produced by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* growing in an economic production medium. **Biocontrol Science and Technology** 23:756-767.
- Fancello F, Petretto GL, *et al.* (2016) Chemical characterization, antioxidant capacity and antimicrobial activity against food related microorganisms of *Citrus limon* var. *pompia* leaf essential oil. **LWT - Food Science Technology** 69:579-585.

Ferreira, L, Rosales, E, Danko, AS, Sanromán, MA, Pazos, MM (2016) *Bacillus thuringiensis* a promising bacterium for degrading emerging pollutants. **Process Safety and Environmental Protection** 101:19-26.

Gong Y, Li M, Xu D, Wang H, He J, Wu D, Chen D, Qiu N, Bao Q, Sun M, Yu Z (2012) Comparative proteomic analysis revealed metabolic changes and the translational regulation of Cry protein synthesis in *Bacillus thuringiensis*. **Journal Proteomics** 75:1235-1246.

Greene, GL, Leppla, NC, Dickerson, WA. (1976) Velvetbean caterpillar: A rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economy Entomology** 69:487-488.

Gutiérrez-Moreno R, Mota-Sanchez D, Blanco CA, Whalon ME, Terán-Santofimio H, Rodríguez-Maciel JC, DiFonzo C (2019) Field-evolved resistance of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) to synthetic insecticides in Puerto Rico and Mexico. **Journal Economy Entomology** 112:792-802.

Inouye, S, Uchida, K, Maruyama, N, Yamaguchi, H, Abe, SA (2006) Novel method to estimate the contribution of the vapor activity of essential oils in agar diffusion assay. **Journal Japanese Social Medical Mycology** 47:91-98.

Kenis, M (2023) Prospects for classical biological control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in invaded areas using parasitoids from the Americas. **Journal Economy Entomology** 116:331-341.

Kerwin, BA (2008) Polysorbates 20 and 80 used in the formulation of protein biotherapeutics: structure and degradation pathways. **Journal of Pharmaceutical Science** 97:2924-2935.

Khedher SB, Jaoua S, Zouari N (2013) Application of statistical experimental design for optimization of bioinsecticides production by sporeless *Bacillus thuringiensis* strain on cheap medium. **Brazilian Journal of Microbiology** 44:927-933.

Lin F, Mao Y, Zhao F, Idris AL, Liu Q, Zou S, Guan X, Huang T (2023) Towards sustainable green adjuvants for microbial pesticides: Recent progress, upcoming challenges, and future perspectives. **Microorganisms** 11(2):364.

Mesnager R, Antoniou MN 2015 Ignoring adjuvant toxicity falsifies the safety profile of commercial pesticides. **Frontiers Public Health** 5:361.

Mokhtarnejhad E, Aramideh S, Rezazad Bari M, Safaralizadeh MH, Rezapanah MR, Forouzan M (2022) Improvement the media culture for spore/crystal production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and evaluate their virulence against second larval instar of *Ephestia kuehniella* L. **Iranian Journal Plant Protection Science** 52:97-113.

Salvalaggio AC, Costa N V, Moratelli G, Exteckoetter V, Podkowa CI, Cazzo VN (2017) Spreading drops of insecticide syrup with different doses of adjuvants on cassava leaves. **Scientia Agrária Paranaensis** 16:246–252.

Santos CAM, Santos RTS, Della'Vechia JF, Griesang F, Polanczyk RA, Ferreira MC (2019) Effect of addition of adjuvants on physical and chemical characteristics of Bt bioinsecticide mixture. **Scientific Reports** 9:12525.

Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 62:775-806.

Vachon, V, Laprade, R, Schwartz, JL (2012). Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. **Journal Invertebrate Pathology** 111:1-12.

Valicente, F, Lana, UGP, Pereira, ACP, Martins, JLA, Tavares, ANG (2018) Riscos à produção de biopesticida à base de *Bacillus thuringiensis*. **Circular Técnica** 239.

Van Frankenhuyzen, K. (2009) Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **Journal Invertebrate. Pathology** 101:1-16.

Verplaetse E, Slamti L, Gohar M, Lereclus D (2015) Cell Differentiation in a *Bacillus thuringiensis* Population during Planktonic Growth, Biofilm Formation, and Host Infection. **Applied and Environmental Microbiology** 6:3.

Wang P, Zhang C, Guo M, Guo S, Zhu Y, Zheng J, Zhu L, Ruan L, Peng D, Sun M (2014) Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* YBT-1518, a typical strain with high toxicity to nematodes. **Journal of Biotechnology** 171:1-2.

Zghal RZ, Kharrat M, Rebai A, Khedher SB, Jallouli W, Elleuch J, Ginibre C, Chandre F, Tounsi S (2018) Optimization of bio-insecticide production by Tunisian *Bacillus thuringiensis israelensis* and its application in the field. **Biological Control** 124:46-52.

Zhou P, Chen Y, Lu Q, Qin H, Ou H, He B, Ye J (2018) Cellular metabolism network of *Bacillus thuringiensis* related to erythromycin stress and degradation. **Ecotoxicology Environmental Safety** 160:328-341.

CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho abordou a influência de adjuvantes diferentes para parâmetros ligados a pulverização, bem como modificam aspectos da biologia do Bt e influenciam a eficácia do controle. Um próximo passo a ser tomado pode ser a avaliação dos componentes da formulação dos adjuvantes em separado, a fim de identificar a relação de cada componente com os efeitos observados. A grande quantidade de produtos no mercado tanto bioinseticida quanto adjuvantes torna oneroso testar todas as combinações possíveis.

Para além da simples interação entre o microrganismo usado com ingrediente ativo, a compatibilidade entre esses produtos em influenciada pelos co-formulantes presentes no bioinseticida. Dessa forma seria interessante uma organização dentro das empresas que formulam os produtos para compartilhamento de informações quanto a compatibilidade. Pode-se criar um banco de dados com interação entre os microrganismos e moléculas químicas, possibilitando o desenvolvimento de adjuvantes voltados diretamente para utilização em conjunto com microrganismos, bem como desenvolvimento de formulações mais eficazes.