

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**SELEÇÃO DE SURFACTANTES E FOTOPROTETORES
PARA A FORMULAÇÃO DE *Beauveria bassiana* VISANDO
O CONTROLE DE *Dactylopius opuntiae* EM PALMA
FORRAGEIRA**

Polyane de Sá Santos
Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2009

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**SELEÇÃO DE SURFACTANTES E FOTOPROTETORES
PARA A FORMULAÇÃO DE *Beauveria bassiana* VISANDO
O CONTROLE DE *Dactylopius opuntiae* EM PALMA
FORRAGEIRA**

Polyane de Sá Santos

**Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Monteiro
Co-Orientador: Dr. Carlos Alberto Tuão Gava**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

Jaboticabal – São Paulo

Maio de 2009

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

POLYANE DE SÁ SANTOS – Filha de Lourival Cícero dos Santos e Maria Avaneide de Sá Santos, nasceu em 14 agosto de 1980, em Petrolina/PE. Em 2005 concluiu o curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, pela faculdade de Formação de Professores de Petrolina, Universidade de Pernambuco, recebendo o título de Bióloga. Foi bolsista de iniciação científica durante a graduação, pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, PIBIC/CNPq, realizando pesquisas na área de Ciências de Alimentos, com ênfase em Fisiologia Pós-Colheita, na Embrapa Semi-Árido em Petrolina/PE. Em 2007 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Jaboticabal/SP, com linha de pesquisa em Ecologia Microbiana, desenvolvendo trabalhos com formulações de fungos entomopatogênicos.

A única maneira de prever o futuro é inventá-lo.

Peter Drucker

*Aos meus pais, **Lourival** e **Avaneide** e ao meu
irmão **Fabiano** por estarem juntos comigo em toda a
jornada da minha vida,*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a **Deus** pela saúde, força e coragem os quais me presenteou durante todo trabalho, me mostrando sempre a luz do otimismo, Obrigada Senhor!

Aos meus **pais, irmão e família** que estiveram comigo em todos os momentos, me incentivando e me fazendo lembrar principalmente dos valores que me fizeram chegar até aqui...

À **Universidade Estadual Paulista – UNESP - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV – Câmpus de Jaboticabal / SP** por todo apoio e atenção durante o curso.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq** pela concessão da bolsa de mestrado.

À **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Semi-Árido**, através da Diretoria Executiva e Divisão de Recursos Humanos por ceder suas instalações laboratoriais.

À **Financiadora de Estudos e Projetos – FINEP** – pelo auxílio financeiro.

À **Oxiten** pela doação de seus produtos.

Ao **Prof. Dr. Antonio Carlos Monteiro**, pela orientação, dedicação e principalmente pela acolhida na universidade que me fez sentir em “casa” e à vontade para realização deste trabalho.

Ao **Dr. Carlos Alberto Tuão Gava** pela sua valiosa contribuição no desenvolvimento das atividades, pelos conselhos e serenidade diante das dificuldades.

Ao **Prof. Dr. José Carlos Barbosa** – pelo auxílio na realização das análises estatísticas.

Ao **Prof. José Moacir Marin** e a **Profa. Margarete Camargo** pela participação e sugestões atribuídas ao trabalho na banca examinadora de qualificação.

Ao **Dr. Laerte Antonio Machado** e a **Profa. Margarete Camargo** pelas importantes considerações feitas na banca examinadora de defesa

Aos colegas do laboratório de Microbiologia – Unesp - FCAV - **Carime, Dinalva, Aline Almeida, Aline Botelho, Flávia, Lucas, Ana Carolina, Manuela, Marcos, Luciana e Nancy**, pela acolhida, amizade e companheirismo.

À **Edna**, secretária do Laboratório de Microbiologia – Unesp – FCAV – pelo espírito de doação, estando sempre disposta a ajudar e incentivar.

À turma do Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Semi-Árido – **Ernando, Michelly Élen, Marcionila, Adriana Carla, Ana Paula, Anne Caroline, Tamires e Aparecida** pelo carinho, amizade e apoio no desenvolvimento das atividades.

Ao pessoal do **Laboratório de Entomologia** da Embrapa por todo o auxílio concedido no desenvolvimento dos trabalhos com a cochonilha.

Aos motoristas da Embrapa, **Diniz e Francisco** pela disponibilidade de ajudar em todos os momentos em que houve a necessidade de transporte para o desenvolvimento dos experimentos.

Ao meu amigo **Cherre Sade**, por todo incentivo, apoio, carinho, atenção e principalmente pelo seu caráter. Amigo pode sempre contar comigo!

Às repúblicas **Zoonna e Farfaruai** e também a **Maria Tereza, Amanda e Juliano**, pela convivência e por compartilharem comigo dos momentos de conquista de uma boa parte deste trabalho.

Às minhas grandes amigas, **Juliana Brito, Carime, Elaine, Vanessa Sato, Selma e Fúlvia** pelo afeto, momentos de descontração e felicidade de estar juntas, adoro vocês!

Aos colegas e amigos que conquistei durante o curso pela excelente convivência e companhia. Vocês foram essenciais na construção desta história!

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e conclusão deste curso.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
RESUMO	vi
SUMMARY	viii
CAPÍTULO 1: CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO GERAL	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1. O Semi-árido Nordeste	4
3.2. A palma forrageira (<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill.)	5
3.3. <i>Dactylopius opuntiae</i> (Cockerell) (Hemiptera: Dactylopiidae)	6
3.4. Controle biológico	7
3.5. Fungos entomopatogênicos	9
3.6. <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuill.	11
3.7. Formulações à base de fungos entomopatogênicos	12
4. REFERÊNCIAS	13
CAPÍTULO 2: Seleção de surfactantes e análise da dispersão de conídios para formulação de fungo entomopatogênico	21
RESUMO	21
SUMMARY	22
1. INTRODUÇÃO	23
2. MATERIAL E MÉTODOS	24
2.1. Obtenção do inóculo do isolado LCB63 de <i>Beauveria bassiana</i>	24
2.2. Número de colônias do isolado LCB63 de <i>Beauveria bassiana</i> submetido a diferentes concentrações de surfactantes	25
2.3. Efeito de doses de surfactantes na germinação de conídios do isolado LCB63 de <i>Beauveria bassiana</i>	25

	Página
2.4. Dispersão de conídios do isolado LCB63 de <i>Beauveria bassiana</i> sob efeito de diferentes índices de balanço-hidrofílico-lipofílico (HLB).....	27
2.5. Análise estatística.....	28
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4. CONCLUSÕES.....	34
5. REFERÊNCIAS.....	34
CAPÍTULO 3: Seleção de fotoprotetores para formulação de <i>Beauveria bassiana</i> a ser aplicada no controle de <i>Dactylopius opuntiae</i>.....	37
RESUMO.....	37
SUMMARY.....	39
1. INTRODUÇÃO.....	41
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
2.1. Obtenção do inóculo do isolado LCB63 de <i>Beauveria bassiana</i>	43
2.2. Compatibilidade de fotoprotetores ao isolado LCB63 de <i>Beauveria Bassiana</i>	44
2.3. Seleções de fotoprotetores para proteção de conídios do isolado LCB63 de <i>Beauveria bassiana</i> expostos à radiação solar.....	44
2.4. Efeito de doses de fotoprotetores na germinação de conídios do isolado LCB63 de <i>Beauveria bassiana</i> após exposição à radiação solar e UV artificial.....	46
2.5. Mortalidades de ninfas de primeiro ínstar de <i>Dactylopius opuntiae</i> após o tratamento com formulação em óleo do isolado LCB63 de <i>Beauveria bassiana</i>	47
2.6. Análise estatística.....	47
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4. CONCLUSÕES.....	56
5. REFERÊNCIAS.....	57

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2	Página
Figura 1. Número de colônias do isolado LCB63 de <i>Beauveria bassiana</i> cultivado em meio de Martin (1950) contendo diferentes concentrações de surfactantes, e incubado em BOD a $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 5 dias.....	29
Figura 2. Germinação do isolado LCB63 de <i>Beauveria bassiana</i> quando submetido ao efeito de doses de diferentes surfactantes aos 10 (A) e 120 minutos (B) de exposição às soluções.....	31
Figura 3. Geminação de conídios do isolado LCB63 de <i>Beauveria bassiana</i> quando submetidos à exposição física de soluções a 0,1% de Unitol L/20 e de Ultrane NP/100 com diferentes percentuais de HLB nos intervalos de 10 minutos e 120 minutos.....	33
Capítulo 3	
Figura 1. Variação da temperatura, umidade relativa do ar e radiação solar total durante a execução do experimento para seleção de fotoprotetores.....	46
Figura 2. Viabilidade do isolado LCB63 de <i>Beauveria bassiana</i> após exposição dos conídios a diferentes concentrações dos fotoprotetores lipossolúveis.....	49

Página

- Figura 3.** Viabilidade de conídios do isolado LCB63 de *Beauveria bassiana* após exposição à radiação solar sob ação de diferentes concentrações de fotoprotetores..... 52
- Figura 4.** Viabilidade de conídios do isolado LCB63 de *Beauveria bassiana* após exposição à radiação ultravioleta sob ação de diferentes concentrações de fotoprotetores..... 54
- Figura 5.** Mortalidade de ninfas de primeiro ínstar de *Dactylopius opuntiae* após pulverização com formulações contendo fotoprotetor Oxibenzona e isolado LCB63 de *Beauveria bassiana*..... 55

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2	Página
Tabela 1. Surfactantes testados para verificação da compatibilidade com o isolado LCB63 de <i>Beauveria bassiana</i>	26
Tabela 2. Combinações de surfactantes de acordo com o índice de balanço hidrofílico-lipofílico (HLB) determinado pelo ábaco de HLB.....	27
Tabela 3. Número de conídios dispersos de isolado LCB63 de <i>Beauveria bassiana</i> quando submetido à exposição em 0,1% de Unitol L/20 e Ultranex NP/100 com diferentes índices HLB, após agitação a 150rpm em temperatura ambiente.....	32
 Capítulo 3	
Tabela 1. Descrição físico-química de fotoprotetores usados nos testes de compatibilidade com o isolado LCB63 de <i>Beauveria bassiana</i>	45
Tabela 2. Influência da radiação solar na germinação do isolado LCB63 de <i>Beauveria bassiana</i> sob efeito de fotoprotetores na concentração de 1%.....	50

SELEÇÃO DE SURFACTANTES E FOTOPROTETORES PARA A FORMULAÇÃO DE *Beauveria bassiana* VISANDO O CONTROLE DE *Dactylopius opuntiae* EM PALMA FORRAGEIRA

RESUMO - Nos últimos anos o ataque da *Dactylopius opuntiae*, conhecida como cochonilha-do-carmim, à palma forrageira no Nordeste, tem causado grandes prejuízos principalmente na região da Paraíba, Pernambuco e Alagoas. Uma alternativa em desenvolvimento para o controle da praga é a seleção de fungos patogênicos e virulentos ao inseto. Neste estudo foi proposta a avaliação de produtos a serem usados como componentes da formulação de bioinseticidas, para o preparo de caldas a serem aplicadas no controle da cochonilha. Foi utilizado o isolado LCB63 de *Beauveria bassiana* previamente selecionado quanto à patogenicidade e virulência ao inseto. Avaliou-se a exposição do isolado a diferentes concentrações (0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5 e 1,0%) de surfactantes (Unitol L/20, Ultranex NP/100, Ultratan D, Surfion 3403, Surfion 5409, Sabão OMO[®], Detergente neutro Ypê[®]) através do crescimento de colônias, germinação após exposição temporária aos produtos e a influência do balanço hidrofílico-lipofílico (HLB) na dispersão e viabilidade de conídios. Em outro experimento, avaliou-se a tolerância dos conídios do isolado à radiação solar e ultravioleta em fluxo laminar sob efeito de diferentes concentrações de fotoprotetores (Neo Heliopan AV, Neo Heliopan E1000, Oxibenzona, Amido e Leite) em diferentes períodos de exposição. Finalmente, verificou-se a mortalidade de ninfas de *D. opuntiae* utilizando-se formulações contendo os surfactantes e fotoprotetores que apresentaram os melhores resultados nos experimentos anteriores. Unitol L/20 e Ultranex NP/100 não apresentaram efeito deletério na formação de colônias, e Surfion 5409, detergente neutro Ypê[®] e sabão OMO[®], apresentaram grande toxicidade ao fungo. Não houve interferência de Unitol L/20, Ultranex NP/100 e Ultratan D na germinação dos conídios nos primeiros 10 minutos de exposição aos surfactantes. Após 120 minutos, houve grande redução da germinação a partir da concentração 0,5%, com exceção de Ultranex NP/100. A dispersão dos conídios foi adequada nas soluções com índices HLB entre 6,4 e 13,3, obtendo-se grande germinação dos

conídios dispersos nestas soluções nos dois períodos avaliados. Na seleção de fotoprotetores, houve grande redução da germinação do fungo exposto à radiação solar sob efeito do amido, apesar do aumento da concentração do produto. O aumento da concentração de Oxibenzona incrementou a germinação dos conídios e no tratamento com Neo Heliopan E1000 a porcentagem de germinação manteve-se em torno de 50%, a partir da concentração de 1%. Na exposição à radiação ultravioleta, tratamentos com fotoprotetores lipossolúveis aumentaram a proteção dos conídios, cuja germinação atingiu 73,71% para Oxibenzona e 51,82% para Neo Heliopan E1000, enquanto o amido proporcionou baixa proteção, com germinação de 37,4%. A adição dos produtos aumentou a eficiência da formulação, destacando-se como mais promissoras as formulações I e II que promoveram 49,87% e 72,21% de mortalidade de ninfas de *D. opuntiae*, respectivamente. Concluiu-se que a germinação e dispersão dos conídios do isolado LCB63 de *B. bassiana* são influenciadas pelos surfactantes e adequação do índice de HLB das soluções e os fotoprotetores lipossolúveis foram os mais adequados, protegendo os conídios da radiação solar e ultravioleta com potencial para uso em formulação de bioinseticidas.

Palavras-Chave: controle biológico, compatibilidade, cochonilha-do-carmim, fungo entomopatogênico, *Opuntia ficus-indica*

**SURFACTANTS AND PHOTOPROTECTORS SELECTION FOR THE
FORMULATION OF *Beauveria bassiana* AIMING THE CONTROL OF *Dactylopius
opuntiae* IN FORAGE PALM**

SUMMARY– For the last years the attack of *Dactylopius opuntiae* know as Carmine cochineal to forage palm, in northern states of Brazil, have causes great prejudice, mainly in the regions of Paraíba, Pernambuco e Alagoas. One developing alternative for the control of this pest is the selection of pathogenic and virulent fungi to the insect. This study proposed the evaluation of products to be used as compounds in the formulation of bioinsecticides, for the preparation of broths applied in the control of cochineal. The isolate LCB63 of *Beauveria bassiana* previously selected for its pathogenicity and virulence to the insect, was used. The exposition of the isolate in different concentrations (0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 and 1.0%) of surfactants (Unitol L/20, Ultranex NP/100, Ultratan D, Surfon 3403, Surfon 5409, OMO[®] washing powder, Ypê[®] neutral detergent) was evaluated through the colonies growth, germination after temporary exposition to the products and influence of the hydro-lipofilic balance (HLB) in the dispersion and viability of the conidia. Another experiment evaluated the tolerance of the conidia to solar radiation and ultraviolet in laminar flow hood, under the effect of different photoprotector concentrations (Neo Heliopan AV, Neo Heliopan E1000, Oxibenzona, starch and milk) with different exposition timing. Finally, the mortality of *D. opuntiae* in the nymph stage was verified by using the formulations containing the surfactants and the photoprotectors that demonstrated the best results in the previous experiments. Unitol L/20 and Ultranex NP/100 didn't show a deleterious effect in the formation of the colonies, while Surfon 5409, Ypê[®] neutral detergent and OMO[®] washing powder showed great toxicity to the fungus. There was no interference of Unitol L/20, Ultranex NP/100 and Ultratan D in the conidia germination during the first ten minutes of exposition to the surfactants. With the exception of Ultranex NP/100, after 120 minutes of exposition, there was a huge decrease in germination since the concentration of 0.5%. The conidia dispersion was adequate in the solutions with HLB indexes between 6.4 and 13.3, obtaining in both solutions and both

evaluating periods a high germination of the dispersed conidia. For the selection of the photoprotectors, although there was an increase in the concentration of the product, a significant decrease on the fungus germination, when exposed to solar radiation under the starch effect, was observed. The augment of the Oxibenzona concentration increased conidia germination. In the Neo Heliopan E1000 treatment, since 1% concentration, the germination percentage maintained at 50%. In the ultraviolet expositions, the treatments with lyposoluble photoprotectors increased the conidia protection, presenting germinations of 73.71% for Oxibenzona and 51.82% for Neo Heliopan E1000, while starch promoted a low protection, with a germination of 37.4%. The addition of products increased the efficiency of the formulation, distinguishing as the most promising the formulation I and II with, respectively, 49.87% and 72.21% of *D. opuntiae* nymph mortality. The present study permits to conclude that germination and dispersion of the conidia of the isolate LCB63 of *B. bassiana* are influenced by the surfactants and adequacy of the HLB solutions and that the lyposoluble photoprotectors were the most adequate, protecting conidia from solar and ultraviolet radiation, with potential use for bioinsecticidal formulations.

Keywords: biological control, compatibility, Carmine cochineal, entomopathogenic fungus, *Opuntia ficus-indica*

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

No semi-árido nordestino, uma das culturas que apresenta essencial importância para o sistema de produção pecuária é a cultura da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill.). Esta, por sua vez, constitui a principal fonte de alimento para os rebanhos nos períodos prolongados de seca. Estima-se que existem na região 27.044.480 bovinos, 6.516.629 caprinos e 8.001.613 ovinos, representando 15,93%, 89,97% e 57,04% do rebanho brasileiro, respectivamente (ANUALPEC, 2008). Dependem dessa cultura cerca de 250 mil famílias que se encontram envolvidas com o cultivo numa área totalizada em 500 mil hectares, destacando-se a Paraíba, Alagoas e Pernambuco (LOPES et al., 2003; ARAÚJO et al., 2005). A pecuária é a principal atividade agrícola no Semi-Árido nordestino. A estacionalidade da produção de forragens é um fator limitante da produção animal, presente em quase todas as regiões agropastoris do Brasil e mais acentuadas na Região Nordeste, devido à influência da irregularidade de distribuição das chuvas, sendo necessário buscar alternativas para a alimentação do rebanho (LOPES et al., 2003; MENEZES et al., 2005).

A palma forrageira é uma planta de características peculiares bastante significativas como resistência à falta de chuvas, pronunciado potencial nutritivo e capacidade de armazenamento de grande quantidade de água (SANTOS, 2006; CHIACCHIO et al., 2006). Apresenta também uma ótima viabilidade econômica como o baixo custo de cultivo, suprimindo assim as necessidades dos pecuaristas em longos períodos de estiagem, garantindo a alimentação dos rebanhos e favorecendo de maneira indireta, a manutenção da oferta dos produtos primários destes animais, como carne e leite no mercado.

Há cerca de sete anos essa forrageira vem sendo comprometida pela *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) (Hemiptera: Dactylopiidae), mais conhecida como cochonilha-do-carmim, que tem se tornado uma praga importante do ponto de vista econômico em diversos municípios do Nordeste (BRITO et al., 2008). Este inseto vive

na parte inferior das raquetes da palma, formando colônias protegidas por uma cobertura cerosa que irá protegê-los contra os raios solares.

O demasiado uso de inseticidas em diversas culturas, atinge fortemente a preservação dos ecossistemas e, em longo prazo, chegam a extinguir inimigos naturais, podendo causar o surgimento de populações resistentes de pragas, tornando complexo o seu controle. No caso do uso de inseticidas para o controle da cochonilha-do-carmim nas condições do Semi-Árido é limitante, pela ausência de produtos registrados e pelo baixo poder aquisitivo dos produtores. Além disso, o uso intensivo de inseticidas está limitado aos estágios iniciais de crescimento da cultura já que, após o segundo ano, a palma passa a ser oferecida continuamente aos animais nos períodos da seca. Estas circunstâncias criam o risco de intoxicação dos animais e dos produtores, aliado a possibilidade de permanência de resíduos na carne e leite (LOPES et al., 2008). Diante desses problemas, muitos projetos estão sendo desenvolvidos levando em conta a integralização de alternativas de controle da praga, de modo a atender o desenvolvimento sustentável e a viabilidade de custos para a agricultura familiar, sendo o uso de bioinseticidas à base de fungos entomopatógenos uma das alternativas viáveis a ser somada às práticas de controle de *D. opuntiae*.

A utilização de fungos entomopatogênicos no controle de diferentes espécies de cochonilhas tem demonstrado resultados promissores. Segundo ANDALO et al. (2004), isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. apresentaram 62% e 58% de mortalidade quando aplicados em fêmeas adultas de *Dysmicoccus texensis* (Tinsley) (Hemiptera: Pseudococcidae) e, com um pico de mortalidade entre o sétimo e oitavo dia após aplicação. ALVES et al. (2007) verificaram uma mortalidade de 78% de *Planococcus citri* (Risso) (Hemiptera: Pseudococcidae) resultante da aplicação do fungo *M. anisopliae* ESALQ 1037. Os isolados LCB53 de *M. anisopliae* e LCB63 de *B. bassiana* apresentaram controle de adulto e ninfas de *D. opuntiae* maior que 70% e 90% respectivamente, em condições de laboratório, com resultados promissores em campo (BRITO et al., 2008).

A produção de uma cobertura cerosa sobre o corpo de *D. opuntiae* pode tornar-se um mecanismo de proteção contra infecções fúngicas e limita a ação de formulações

aquosas. Contudo, relatos recentes indicam que pode ser ultrapassada pelo patógeno se aplicado em formulação adequada (GARCIA, 2004; GUARIN-MOLINA et al., 2006). O desenvolvimento de formulações de um entomopatógeno ocorre a partir da necessidade de se acrescentar a ele determinados compostos que melhoram o seu desempenho no campo, facilitam o manuseio e a aplicação, e principalmente, permitem o armazenamento sob condições nas quais se minimiza o custo com perda mínima das qualidades do produto.

Para o controle de *D. opuntiae*, a seleção de surfactantes e fotoprotetores é um dos pontos mais importantes para obtenção do formulado, pelo fato dos dois produtos determinarem o comportamento dos propágulos infectivos diante da associação de produtos quanto à dispersão dos conídios em caldas de pulverização e tolerância à radiação solar, respectivamente. A adição de surfactantes à calda promove a suspensão, dispersão, incremento da deposição, molhamento, adesão e retenção dos conídios, aumentando a toxicidade sobre o alvo (COSTA et al., 2003) e a exposição excessiva dos fungos à radiação solar pode impedir sua persistência no ambiente de controle e comprometer o uso destes entomopatógenos. Sendo assim, estratégias de controle biológico em condições adversas requerem o desenvolvimento de formulações capazes de proteger o fungo dos efeitos deletérios provocados pelo ambiente. Em condições de campo, a eficácia de inseticidas biológicos se reduz de modo acentuado já que o processo patogênico depende de uma série de fatores ambientais como temperatura, umidade relativa do ar, exposição à radiação solar direta, principalmente aos raios ultravioletas, saturação de água, fatores fungistáticos e outros (REIS et al., 2005).

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de adjuvantes, como surfactantes e fotoprotetores na sobrevivência de *B. bassiana* para posterior utilização no desenvolvimento de bioinseticidas visando o controle de *D. opuntiae* na região do Semi-Árido nordestino.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. O Semi-árido nordestino

A região Nordeste ocupa cerca de 18% do território brasileiro, com 65% de sua área dentro do Polígono das Secas, o Semi-Árido, onde vivem aproximadamente 30% da população nacional, dos quais 8,4 milhões no meio rural (IBGE, 2006)

As condições edafoclimáticas do Semi-Árido são caracterizadas por solos rasos, pedregosos ou arenosos, com pouca matéria orgânica, porém ricos em minerais solúveis e pH neutro ou próximo de sete. O clima é seco, com precipitações pluviométricas variando de 400 a 800 milímetros, irregularmente distribuídas e concentradas no verão. A temperatura varia entre 23°C e 28°C, com amplitude diária de mais ou menos 10°C e a luminosidade média é de 2.800 horas de luz ao ano (CHIACCHIO et al., 2006). A vegetação típica é a Caatinga que ocupa a maior parte do semi-árido nordestino, caracterizada por plantas efêmeras, suculentas ou carnosas, além de algumas espécies de plantas lenhosas sem formar um dossel contínuo, troncos de árvores e arbustos finos, de aspecto seco, com folhas pequenas e caducas para proteger a planta da desidratação pelo calor e vento em longos períodos de estiagem. Cactos e bromélias terrestres são, também, elementos importantes da sua paisagem. (SILVA et al., 2003; ARAÚJO et al., 2005).

A principal atividade agrícola é a pecuária de leite e corte (caprinos, bovinos e ovinos), cultivos de sequeiro, exceto algumas regiões onde se dispõe de irrigação. A base alimentar desses animais é composta de pastagens nativas ou cultivadas. Devido à influência da irregularidade de distribuição das chuvas, a produção animal e toda cadeia produtiva pode apresentar-se prejudicada, sendo necessário buscar alternativas para a alimentação do rebanho (MENEZES et al., 2005; LOPES et al., 2007).

3.2. A palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill.)

No mundo, já foram descritas cerca de 300 espécies de cactáceas pertencentes ao gênero *Opuntia*, distribuídas desde o Canadá até a Argentina. Entre as espécies selvagens e cultivadas mais utilizadas, 12 espécies pertencem ao gênero *Opuntia* e uma ao gênero *Nopalea*. A palma forrageira *Opuntia ficus-indica*, conhecida como palma gigante, pertence à classe Liliatae, família Cactaceae, subfamília Opuntioideae, gênero *Opuntia*, subgêneros *Opuntia* e *Nopalea* (CHIACCHIO et al., 2006).

No Semi-árido nordestino, com uma área de 980.000 Km², encontram-se implantados 500.000 hectares de palma forrageira, destacando-se os maiores cultivos em Pernambuco, Paraíba e Alagoas (ARAÚJO, 2005). Esta planta é de origem mexicana, e hoje é uma cactácea totalmente incorporada à paisagem do Nordeste brasileiro. Introduzida na região em meados do século XIX, para servir de suporte alimentar da cochonilha produtora de carmim, a palma expandiu-se e ocupou progressivamente o espaço regional, apesar da completa decepção relacionada à produção de corante (SANTOS & GONDIM, 2004).

A palma forrageira tem grande importância na região do nordeste, por apresentar características morfofisiológicas que a tornam apropriada às regiões semi-áridas, pronunciado potencial nutritivo e grande aceitabilidade pelos rebanhos, constituindo-se em uma importante forrageira, participando em até 40% da matéria seca na dieta consumida pelos animais (SANTOS, 2006).

Além de sua importância na cadeia produtiva, a palma oferece ainda alternativas econômicas como, alimentação humana, fonte de energia, na medicina, matéria prima para cosméticos, na proteção e conservação do solo, fabricação de adesivos, colas, fibras para artesanato, papel, corantes, mucilagem e ornamentação (BARBERA, 2001). Em vista disso, a importância da palma forrageira para a agricultura familiar em todo o semi-árido é notável, assumindo um importante papel no cenário sócio-econômico do Nordeste.

3.3. *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) (Hemiptera: Dactilopiidae)

Há cerca de sete anos a palma forrageira vem sendo comprometida pela *Dactylopius opuntia*, conhecida como cochonilha-do-carmim, a partir de um foco no Município de Sertânia em Pernambuco até o município de Monteiro na Paraíba. Estima-se que o inseto já destruiu cerca de 80% dos palmais, em 30 municípios desses dois estados. Nessa região, considera-se uma perda de 100 mil hectares infestados e irrecuperáveis, um prejuízo financeiro imposto aos agricultores em torno de 150 milhões de reais ao ano (LOPES et al., 2009; EMBRAPA SEMI-ÁRIDO, 2008).

A origem da praga tem sido tema de contradição, há relatos que afirmam ter sido introduzida no Nordeste brasileiro para efeito de estudos, escapando ao controle e tornando-se praga. Por outro lado, autores afirmam que a praga é uma cochonilha do gênero *Dactylopius*, nativa da caatinga, que encontrou na palma forrageira um hospedeiro após sua introdução. Esta teoria tem sido comprovada com os estudos de PULZ et al. (2006), que detectaram quatro espécies do gênero atacando a cultura na região do agreste pernambucano e paraibano. De qualquer forma, a cochonilha tem se mostrado uma praga devastadora para a cultura da palma, trazendo sérios prejuízos para a economia pecuarista do Nordeste (LOPES et al., 2003).

No estudo da sua biologia, a duração dos estádios biológicos depende do sexo do inseto, em que, fêmeas adultas e machos apresentam uma longevidade aproximada de 38 e 4 dias, respectivamente. Os primeiros estádios ninfais duram em torno de 18 a 20 dias, totalizando um ciclo biológico de aproximadamente 77 dias para as fêmeas e 43 dias para os machos. Para as fêmeas se estima um período de pré-oviposição de 19 dias, mantendo-se em oviposição durante 21 dias com uma média de 131 insetos produzidos por fêmea (FLORES-HERNÁNDEZ et al., 2006).

Este inseto vive na parte inferior das raquetes da palma, formando colônias protegidas por uma cobertura cerosa que irá protegê-las contra os raios solares. Instalado na planta, o inseto atua como parasita, sugando sua seiva e inoculando toxinas até deixá-la completamente seca, processo que decorre em apenas 15 dias (BAHE, 2005). Dependendo do grau de ataque e da falta de medidas de controle, em

alguns casos, há a diminuição de produtividade e em casos de maior dispersão da praga a total destruição dos palmais. Devido ao seu grande poder de proliferação e disseminação, essa praga pode causar danos severos e irreversíveis, provocando conseqüências sócio-econômicas gravíssimas em comunidades agrícolas onde a atividade leiteira é extremamente dependente do cultivo de palma, como fonte de suplementação alimentar para os rebanhos durante os períodos de estiagem, como é o caso do município de Monteiro (LOPES, 2007).

Para alguns países, a cochonilha-do-carmim é um inseto benéfico, gerando renda e milhares de empregos com a venda e a utilização do ácido carmínico, pigmento conhecido como “vermelho cochonilha” de largo uso na indústria alimentícia. (LOPES et al, 2003). No entanto, o inseto *D. opuntiae* é uma praga potencialmente devastadora da palma forrageira nas condições do Nordeste do Brasil, onde a cactácea é intensivamente cultivada e alimento indispensável aos rebanhos nos períodos de estiagens prolongadas.

3.4. Controle biológico

A necessidade do consumidor em adquirir produto saudável, livre de agrotóxicos ligado diretamente à preocupação com a qualidade de vida é cada vez maior, abrindo espaço ao controle alternativo. Sendo assim, o Manejo Integrado de Pragas (MIP) é a ferramenta utilizada no uso racional de práticas de controle fitossanitário. O MIP define-se como a otimização do controle por meio de medidas múltiplas, que mantém as populações das pragas abaixo do nível de dano econômico, promovendo a proteção das plantas, do homem, dos animais e do ambiente (BATISTA FILHO, 2006).

Dentre as práticas de controle do MIP, está o emprego de agente de biocontrole, conhecidos como inimigos naturais e são formados pelos predadores, parasitóides e patógenos. Os predadores se alimentam de várias espécies de insetos ou ácaros. Os parasitóides são mais específicos e necessitam apenas de um tipo de indivíduo para o seu desenvolvimento, os microrganismos são patógenos causadores de doenças em

insetos e ácaros e pertencem ao grupo dos fungos, vírus, bactérias e protozoários, havendo ainda os nematóides (BATISTA FILHO, 2006).

Em observações no campo foi constatado a presença de inimigos naturais que atuam controlando naturalmente a *D. opuntiae* na região do Semi-Árido nordestino, porém em intensidade muito pequena. Dentre esses inimigos naturais podemos citar larvas de joaninhas *Zagreus bimaculosus* (Mulsant.) (Coleoptera: Coccinellidae), *Cycloneda sanguinea* (Linnaeus) (Coleoptera, Coccinellidae) e *Baccha* sp. (Diptera: Syrphidae) (BRITO et al., 2008).

Na cultura da palma-forrageira no Semi-Árido nordestino, são citados como predadores, os coccinelídeos *Exochomus bimaculosus* (Mulsant.), *Coccidophilus citricola* (Brethes), *Chilocorus nigrita* (Fabricius), *Pentilia* sp., *Zagloba* sp., *Calloeneis* sp. e o sirfídeo *Salpingogaster conopida* (Philippi) (Diptera: Syrphidae) (SANTOS, 2006), sendo importante o estudo do potencial de controle envolvendo esses inimigos naturais nativos no manejo integrado da cochonilha-do-carmim. Estudos envolvendo a biologia da joaninha *E. bimaculosus*, predadora nativa desta cochonilha (GIOLO et al., 2008), já vem sendo desenvolvidos no intuito de utilizá-la em projetos de controle biológico de *D. opuntiae*. A joaninha-predadora *Cryptolaemus montrouzieri* (Mulsant.) (Coleoptera: Coccinellidae), oriunda da Austrália, importada do Chile em 1998 pela Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, também vem sendo estudada quanto à sua capacidade de predação à *D. opuntiae* em condições de laboratório, para posterior aplicação em campo no controle desta praga (SILVA et al., 2008).

No controle microbiano, destaca-se a ação dos fungos entomopatogênicos provocando epizootias naturais em populações de cochonilhas-do-carmim em áreas afetadas na Paraíba e em Pernambuco. Nos primeiros isolamentos em campo foi verificado a ocorrência de *Fusarium* sp. e *Entomophthora lecanii* (Zimm.) (LONGO & RAPISARDA, 2001). Em trabalhos desenvolvidos no laboratório de Controle Biológico da Embrapa Semi-Árido, resultados promissores foram obtidos com o uso dos isolados LCB53 de *M. anisopliae* e LCB63 de *B. bassiana*, credenciando-os para estudos em campo (BRITO et al., 2008).

3.5. Fungos entomopatogênicos

Fungos entomopatogênicos são promissores agentes de biocontrole devido à capacidade de supressão de populações de insetos e ácaros, apresentando um amplo espectro de hospedeiros e possibilidade de cultivo em laboratório e formulação (LEITE et al., 2003). Existem cerca de 90 gêneros e mais de 700 espécies de fungos patogênicos à invertebrados, entretanto a maioria dos trabalhos se referem a apenas duas espécies de hifomicetos, *B. bassiana* e *M. anisopliae*, sendo esses agentes usados na quase totalidade dos bioinseticidas à base de fungo (ALVES, 1998)

Muitos trabalhos já foram desenvolvidos no país com entomopatógenos e, em sua maioria, se destacou a eficiência destes microorganismos em diversas culturas. Como exemplos, podemos citar o controle biológico da cigarrinha da cana-de-açúcar nas décadas de 60 e 70, no estado de Pernambuco, com o fungo *M. anisopliae* aplicado em grandes áreas de canaviais nordestinos (ALVES & FARIA, 2005), a utilização de *B. bassiana*, no combate ao psílídeo que ataca culturas de goiabeiras e também no controle de outras pragas, como moleque-da-bananeira, broca do coqueiro, broca do café, cochonilhas, lagartas e ácaros (AGECOM, 2005), e ainda o uso de isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* indicados como altamente patogênicos e promissores para o controle microbiano de *Tetranychus urticae* (Koch.) (Acari: Tetranychidae) (TAMAI et al., 2002).

Fungos entomopatogênicos são os mais viáveis agentes de controle microbiano contra insetos sugadores por apresentarem um mecanismo próprio de penetração no tegumento dos insetos. As mais de 700 espécies apresentam um complexo de enzimas que lhes permite penetrar o tegumento, colonizar a cavidade corporal utilizando a hemolinfa e os órgãos dos insetos como substrato alimentar e, posteriormente, exteriorizar-se, produzindo novos propágulos no cadáver, liberando-os no ambiente (ALVES, 1998).

O primeiro relato de fungos patogênicos a cochonilhas de carapaça foi feito na França. A partir daí muitos trabalhos já relataram a ocorrência destes entomopatógenos em diferentes partes do mundo, discutindo o seu potencial de controle biológico de

cochonilhas (ARANTES & CORREIA, 1999). No laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos da Esalq foi desenvolvido um trabalho em que selecionou dois isolados de fungos da espécie *Lecanicillium lecani* (Zimm.), identificado como: “Esalq 1300” e “Esalq 972” e formularam bioinseticidas à base destes fungos para pulverizar laranjais no estado de São Paulo infestados pela cochonilha *Orthezia praelonga* (Douglas) (Hemiptera: Sternorrhyncha), mostrando resultados mais efetivos que os métodos convencionais à base de inseticidas (BENEVIDES, 2004).

A cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* (Tinsley) (Hemiptera: Pseudococcidae) conhecida também como cochonilha farinhenta, foi tratada com isolados de *B. Bassiana* e *M. anisopliae* e cerca de 58% dos isolados de *B. bassiana* causaram mortalidade de 50 a 65%, enquanto que a maioria dos isolados de *M. anisopliae* (62,5%) causaram mortalidade entre 30 e 50%, embora neste mesmo trabalho, os nematóides entomopatogênicos tenham apresentado resultados mais significativos (ANDALÓ et al., 2004). ALVES et al. (2007) verificaram uma mortalidade de 78% de *P. citri* resultante da aplicação do isolado ESALQ 1037 de *M. anisopliae*. *Syngliocladium* sp. e *Lecanicillium* sp. causaram grande mortalidade de ninfas e adultos de *O. praelonga* em experimentos de campo (GUARIN-MOLINA et al., 2006).

Existem relatos da ocorrência de epizootias naturais de fungos entomopatogênicos em populações de *D. opuntiae* em áreas afetadas dos municípios de Sertânia e Tuparetama, em Pernambuco. Estas epizootias se concentram no final do período chuvoso e os primeiros isolamentos permitiram identificar a ocorrência de *Fusarium* sp. nestes locais. LONGO & RAPISARDA (2001) fizeram referência ao fungo *Entomophthora lecanii* (Zimm.), que tornaria preta a colônia atacada. No entanto, fatores ambientais como temperatura, baixa umidade relativa, radiação solar e a existência de antagonistas podem levar ao insucesso da aplicação de ingredientes ativos microbianos (HJELJORD et al., 2000).

As condições climáticas existentes no Semi-Árido com umidade relativa (UR) na média de 60 a 75% e as temperaturas de 25 a 40 °C ao longo do dia, além da grande insolação podem prejudicar a eficácia dos entomopatógenos (EMBRAPA SEMI-ÁRIDO, 2009). A tecnologia voltada ao desenvolvimento de formulações se faz necessária no

sentido de auxiliar a proteção do fungo em condições adversas do ambiente para que não haja interferência no mecanismo de ação dos propágulos infectivos, promovendo uma maior eficiência de aplicação e sobrevivência dos entomopatógenos no campo.

3.6. *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin

Beauveria bassiana (Bals.) Vuillemin é uma espécie de ocorrência generalizada em todos os países, sendo a mais freqüente sobre os insetos e em amostras de solo (ALVES, 1998). É um dos principais fungos entomopatogênicos e um dos mais pesquisados por atuar em uma maior gama de hospedeiros e, conseqüentemente, serem menos exigentes nutricionalmente, podendo ser cultivados facilmente em meios de cultura (LEITE et al., 2003). Já foi constatado em mais de 200 espécies de insetos agrupados em nove ordens, principalmente lepidoptera e coleoptera (ALVES, 1998).

A infecção ocorre normalmente via tegumento, onde o fungo germina em 12 a 18 horas, dependendo da presença de nutrientes, representados por quitina, nitrogênio e outros. O sistema de defesa dos insetos é incapaz de detectar os primeiros eventos relacionados à infecção desse patógeno, fato que lhe proporciona baixa especificidade para artrópodes. A capacidade de produção e obtenção de formulados a partir da associação desse fungo a diferentes compostos o tornou um dos mais comercializados no mundo (SILVA et al., 2006; JIN et al., 2008). De acordo com FARIA & WRIGHT (2007), os produtos à base de *B. bassiana* compreendem 33,9% do total de micoinsecticidas desenvolvidos em nível mundial visando o controle de insetos distribuídos entre Lepidoptera, Hemiptera, Coleoptera, Thysanoptera e Isoptera. Outros estudos em laboratório já apresentaram resultados bastante promissores deste fungo no controle de diversas pragas como gafanhotos, cupins, mosca doméstica, mosquitos, carrapatos, formigas e ácaros (JIN et al., 2008).

No Brasil, apresenta grande potencial em culturas hortícolas, com ação sobre as principais pragas dessas culturas como *Bemisia tabaci* (Genn.) (Sternorrhyncha: Aleyroridae), *Frankliniella occidentalis* (Perg.) (Thysanoptera: Thripidae) e *Tetranychus urticae* (Koch) (Acari: Tetranychidae) (TAMAI et al., 2002).

Trabalhos envolvendo isolados de *B. bassiana* constituem mais uma alternativa a ser explorada no manejo da cochonilha-do-carmim no Nordeste, visando à produção de formulados, por ser um produto viável comercialmente e por tratar-se de um patógeno cosmopolita, tornando acessível os produtos oriundos deste entomopatógeno.

3.7. Formulações à base de fungos entomopatogênicos

A adição de produtos a formulações de entomopatógenos favorece a otimização do ingrediente ativo, promovendo a eficiência de aplicação e persistência no campo dos propágulos infectivos, além de melhorar as condições de armazenamento, minimizar os custos e proporcionar maior acessibilidade ao produtor.

A associação de microrganismos a diversos adjuvantes é uma alternativa que auxilia, catalisa e potencializa a ação desses microrganismos no processo infeccioso do entomopatógeno (ALVES, 1998). No entanto, há a necessidade de estudos mais detalhados principalmente no que se refere à avaliação do comportamento, adaptação e tempo de sobrevivência dos entomopatógenos quando associado a esses produtos e o efeito deste formulado sobre a população da praga, que pode ser específico. Todos esses fatores levando em consideração a produtividade, viabilidade de custos e potencialidade do produto quanto ao tempo de armazenamento são determinantes para o controle de diversas pragas à base de bioinseticidas. Segundo ALVES (1998), a influência de alguns produtos utilizados no controle biológico sobre os microrganismos, como no caso dos fungos, pode modificar o crescimento vegetativo, a viabilidade e a esporulação, ou até mesmo a composição genética, alterando a sua virulência.

Há alternativas que têm sido avaliadas para o controle de insetos e que poderão ser utilizadas no controle da cochonilha-do-carmim. Segundo BAHE (2005), em alguns estudos foi comprovado o potencial do tratamento de cochonilhas com uma emulsão de óleo mineral e calda de fumo. Em estudos iniciais desenvolvidos pela Universidade Federal de Pernambuco, o óleo de semente de Nim reduziu em até 20% a presença de cochonilha em palmas manipuladas em laboratório (BAHE, 2005). Os produtos alternativos detergente neutro e sabão em pó, os óleos mineral e vegetal, e os

pesticidas parathiom metílico e dimethoato, combateram eficazmente a cochonilha-do-carmim, com uma eficiência acima de 80% (BRITO et al., 2008).

Tecnologias envolvendo a utilização de formulações com base em óleos vegetais têm sido utilizadas em agentes microbianos de controle de diversos insetos. Formulação em óleo permite uma maior persistência do fungo no ambiente enquanto que formulações baseadas em água podem ter eficácia limitada a ambientes com condições adequadas de umidade (BATEMAN, 1997). A radiação solar também apresenta um forte efeito negativo sobre os propágulos infectivos de fungos entomopatogênicos.

A fotodegradação de compostos ou a inviabilização de conídios pode ser evitada pela adição de fotoprotetores. Um protetor solar ideal é aquele que além de estável e seguro, protege o fungo dos raios UVB, de maior interesse biológico por causar danos severos aos fungos (EDGINGTON et al., 2000). Para isso, é necessário que este filtro absorva as radiações de comprimento de onda entre 290 a cerca de 370-400nm (UVB e UVA). Como é difícil conseguir-se um único componente que promova a proteção em todo o espectro ultravioleta, é imprescindível a utilização de uma associação de filtros solares, químicos ou físicos (GALENA, 2008). Estes fotoprotetores agem refletindo ou defletindo a radiação de ondas curtas ou, ainda, absorvendo e convertendo-a em radiação de ondas longas (SHAATH, 1990). Formulações à base de óleo oferecem boa proteção contra radiação UV. No entanto, a adição de fotoprotetores pode incrementar o grau de proteção. Entre estes, a Oxibenzona e derivados do ácido estilbene dissulfônico como Tinopal UNPA-GX, Tinopal DMS, BRY-10, D2 100 e Leukophor DVB têm sido utilizados para proteção de agentes de controle biológico contra radiação UV (SHAH et al., 1998; REDDY et al., 2008).

4. REFERÊNCIAS

AGECOM. **Biofábrica produz fungo contra praga da goiabeira**. 2005. Disponível em: <http://www.agecom.ba.gov.br/exibe_noticia.asp?cod_noticia=12305>. Acesso em: 30 nov. 2006.

ALVES, R.T.; FARIA, M. R. **Situação atual do uso de fungos entomopatogênicos no Brasil.** 2005. Disponível: <www.clubedofazendeiro.com.br/Cietec/artigos/ArtigosTexto.as...>. Acesso em: 27 nov. 2006.

ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos.** 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163p.

ALVES, S. B., LOPES, R. B., PAULI, G., MASCARIN, G. M. Efeito de diferentes formulações de *Metarhizium anisopliae* na proteção à radiação e eficiência no controle de *Mahanarva fimbriolata*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 10., 2007, Brasília. **Anais...** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos. Brasília, 2007. 1CD-ROM.

ANDALÓ, V.; MOINO JÚNIOR, A.; SANTA-CECILIA, L. V. C.; SOUZA, G. C. Seleção de isolados de fungos e nematóides entomopatogênicos para a cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* (Tinsley). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 2, p.181-187, 2004.

ANUALPEC 2008: anuário da pecuária brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e comércio, 2007.

ARANTES, A. M. V. T.; CORREIA, A. do C. B.; Diversidade de fungos associados a *Parlatoria ziziphus* (Lucas) (Hemiptera: Diaspididae) em Citrus. **Anais da sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 28, n. 3, 1999.

ARAUJO, J. **Praga avança no Cariri e Sertão e expulsa pecuaristas.** 2005. Disponível:<http://www.vitrinedocariri.com/index.php?option=com_content&task=view&id=2520&Itemid=18>. Acesso em 10 abr. 2007.

BAHE, M. **Praga da cochonilha se alastra pelo Nordeste**. 2005. Disponível em: <<http://www.srb.org.br/modules/news/article.php?storyid=1485>>. Acesso em: 31 out. 2006.

BARBERA, G. História e importância econômica e agroecologia. In: BARBERA, G.; INGLESE, P. (Eds.). **Agroecologia, cultivos e usos da palma forrageira**. Paraíba: SEBRAE/PB, 2001. p.1-11.

BATEMAN, R. P. Methods for application of microbial pesticides formulations for the control of locust and grasshoppers. **Memoirs of the Entomological Society of Canada**, Oltawa, v. 17: p. 69- 81, 1997.

BATISTA FILHO, A. Controle biológico de Insetos e Ácaros. **Boletim Técnico do Instituto Biológico**, São Paulo, n. 15, p. 1-86, 2006.

BENEVIDES, A. **Bioinseticida à base de fungos ajuda a combater praga que ataca laranjais**. 2004. Disponível em: <<http://www.usp.br/agen/bols/2004/rede1490.htm>>. Acesso em: 31 out. 2006.

BRITO, C. H.; LOPES, E. B.; ALBUQUERQUE, I. C. de; BATISTA, J. de L.. Avaliação de produtos alternativos e pesticidas no controle da cochonilha-do-carmim na Paraíba. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, João Pessoa, vol. 8, n. 2, p. 1-5, 2008.

BRITO, E. S.; MENEZES, M. E. L. ; ERLO, R.; MOTA, E. F.; GAVA, C. A. T.; SAMUELS, R. I. Avaliação do desempenho de fungos entomopatogênicos sobre fêmeas de *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera: Dactylopiidae) em condições de laboratório. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA - Ciência, tecnologia e inovação, 22., 2008, Uberlândia. **Anais...** Viçosa, MG: UFV, 2008. 1 CD-ROM.

CHIACCHIO, F. P. B.; MESQUITA, A. S.; SANTOS, J. R. dos. Palma forrageira: uma oportunidade econômica ainda desperdiçada para o Semi-árido baiano. **Bahia Agrícola**, Salvador, v.7, n.3, p. 39-49. 2006

COSTA, E. A. D.; ALMEIDA, J. E. M.; LOUREIRO, E. S.; SANO A. H. Compatibilidade de adjuvantes no desenvolvimento *in vitro* dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin e *Beauveria bassiana* (Bals.)Vuillemin. **Revista STAB**, Piracicaba, v. 22, n. 2, p. 38-40, 2003.

EDGINGTON, S.; SEGURA, H.; LA ROSA, W. WILLIAMS, T. Photoprotection of *Beauveria bassiana*: Testing simple formulations for control of the coffee berry borer. **International Journal of Pest Management**, London, v. 46, n. 3, p. 169-176, 2000.

EMBRAPA SEMI-ÁRIDO. **Clima**. 2009. Disponível em: <<http://www.cpatsa.embrapa.br/pesquisa/clima.html>>. Acesso em: 13 abr. 2009.

EMBRAPA SEMI-ÁRIDO. **Pesquisa desenvolve tecnologias para o controle da cochonilha-do-carmim**. 2008. Disponível em: <<http://www.cpatsa.embrapa.br/noticias/noticia147.php>>. Acesso em: 15 mar. 2009.

FARIA, M.R. DE; WRAIGHT, S.P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, Orlando, v. 43, p. 237–256. 2007.

FLORES-HERNÁNDEZ, A.; MURILLO-AMADOR, B.; RUEDA-PUENTE, E. O.; SALAZAR-TORRES, J. C.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, J. L.; TROYO-DIÉGUEZ, E. Reproducción de cochinilla silvestre *Dactylopius opuntiae* (Homoptera: Dactylopiidae). **Revista Mexicana de Biodiversidade**, México, v. 77, p. 97-102, 2006.

GALENA: **Informe científico**. 2007. Disponível em: <<http://www.http://www.galena.com.br/>>. Acesso em: 8 dez. 2008.

GARCIA, M. de O. **Utilização de fungos entomopatogênicos para o controle de *Orthezia praelonga* (Sternorrhyncha: Orteziidae)**. 2004. 57 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

GIOLO, F.; SILVA, L. D. da; PRADO, D.; SÁ, M. S. de; GAVA, C. A. T.; PARANHOS, B. J. Biologia da joaninha *Exochomus bimaculosus* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae), predadora nativa da cochonilha-do-carmim, criada sobre hospedeiro alternativo, *Sitotroga cerealella* (Lepidoptera: Pyralidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA - Ciência, tecnologia e inovação, 22., 2008, Uberlândia. **Anais...** Viçosa, MG: UFV, 2008. 1 CD-ROM.

GUARIN-MOLINA, J. H.; ALVES, S. B.; MASCARIM, G. M.; PAULI, G. Avaliação da prevalência estacional dos fungos *Lecanicillium* spp. e *Syngliocladium* sp. Sobre *Orthezia praelonga*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 21., 2006, Recife. **Resumos**.

HJELJORD, L. G.; STEVENSON, A.; TRONSMO, A. Effects of temperature and nutrients stress on the capacity of commercial products to control *Botrytis cinerea* and *Mucor piriform* in green house strawberries. **Biological Control**, Orlando, v. 19, p. 149 - 160, 2000.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Atlas do Censo Demográfico Brasileiro**. 2006. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/default_censo_2000.shtm>. Acesso em: 10 abr. 2007.

JIN, X.; STREETT, D. A.; DUNLAP, C. A.; LYN, M. E. Application of hydrophilic-lipophilic balance (HLB) number to optimize a compatible non-ionic surfactant for dried aerial conidia of *Beauveria bassiana*. **Biological Control**, Orlando, v. 46, p. 226-233, 2008.

LEITE, L. G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M. DE; ALVES, S. B. **Produção de fungos entomopatogênicos**. Ribeirão Preto: A. S. Pinto, 2003. 92p.

LONGO, S.; RAPISARDA, C. Pragas da palma forrageira. In: **Ecologia, cultivo e usos da palma forrageira**. SEBRAE, João Pessoa, 2001. 211p.

LOPES, E. B.; BRITO, C. H. de; ALBUQUERQUE, I. C. de; BATISTA, J. de L. Desempenho do óleo de laranja no controle da cochonilha-do-carmim em palma gigante. **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v. 6, n. 1, p. 252-258, 2009.

LOPES, E. B.; ALBUQUERQUE, I. C.; BRITO, C. H.; BATISTA, J. L. **Manejo integrado da cochonilha-do-carmim na Paraíba**. Lagoa Seca: EMEPA-PB, 2008. 35p. Relatório anual de pesquisa e experimentação.

LOPES, E. B. **Palma forrageira: cultivo, uso atual e perspectivas de utilização no Semi-Árido nordestino**. João Pessoa: EMEPA/FAEPA, 2007. 130p.

LOPES, E. B. **Situação Atual do Ataque da Cochonilha-do-Carmim (*Dactylopius coccus*, COSTA): Uma Nova Praga da Palma Forrageira no Cariri Paraibano**. Lagoa Seca, EMEPA-PB. 2003. Relatório Técnico-Fitossanitário.

MENEZES, R. C.; SIMÕES, D. A.; SAMPAIO, E. V. S. B. **A palma no Nordeste do Brasil: conhecimento atual e perspectivas de uso**. Recife: Ed. Universitária UFPE, 2005. p. 65-80.

PULZ, C. E.; WOLFF, V. R. DOS S.; SILVA, A. F. C. P.; CARVALHO, G. S. *Dactylopius Costa*, 1829 (Hemiptera, Coccoidea, Dactylopiidae) no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA - Entomologia: da academia à transferência de tecnologia, 21., 2006. **Resumos...** Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2006.

REDDY, N. P.; KHAN, P. A. A.; DEVI, K. U.; VICTOR, J. S.; SHARMA, H. C. Assessment of the suitability of Tinopal as an enhancing adjuvant in formulations of the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. **Pest Management Science**, Chichester, v. 64, n. 9, p. 909–915, 2008.

REIS, R. C. S.; MELO, D. R. de; PERINOTTO, W. M. de S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Patogenicidade *in vitro* de formulações fúngicas sobre ninfas e adultos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. Jaboticabal, v. 14, n. 3, p. 101-105, 2005.

SANTOS, D. C. dos. **Manejo e utilização da palma forrageira (*Opuntia e Nopalea*) em Pernambuco**. Recife: IPA, 2006. 48 p.

SANTOS, D. C.; GONDIM, C. A. P. **Projeto Palma**. Recife: Datamétrica, 2004. 108p. Relatório Técnico.

SHAAT, N. A. The chemistry of sunscreens. In: LOWE, N. J., SHAATH, N. A. **The sunscreens, development, evaluation, and regulatory aspects**. Nova Iorque: Marcel Dekker, 1990. p. 211 – 233.

SHAH, P. A.; DOUROKAPINDOU, O. K.; SEDIBE, A.; DAFFÉ, C. O.; VAN DER PAUWW, H.; LOMMER, C. J. Effects of sunscreen oxybenzone of field efficacy and persistence of *Metarhizium flavoviridae* conidia against *Kraussula amabile* (Orthoptera:

Acrididae): in Mali, west Africa. **Biocontrol Science and Technology**. v. 8, n. 3. p. 357-364, 1998.

SILVA, J. M. C. DA, TABARELLI, M., FONSECA, M. T. DA, LINS, L. V. (Orgs) **Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para conservação**. Embrapa Semi-Árido. Brasília. 2003. 382 p.

SILVA, L. D. da; LIMA, M. S. de; LOPES, F. S. C.; GARZIERA, L.; PARANHOS, B. A. J.; SANCHES, N. F. Período e viabilidade larval-adulto de *Cryptolaemus montrouzieri* (Mulsant) (Coleoptera: Coccinellidae) sobre *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) (Hemiptera: Dactylopiidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA - Ciência, tecnologia e inovação. 22., 2008, Uberlândia.: **Anais...**Viçosa, MG: UFV, 2008. 1 CD-ROM.

SILVA, R. Z. da; NEVES, P. M. O. J.; SANTORO, P. H.; CAVAGUCHI, S. A. Efeito de agroquímicos à base de óleo mineral e vegetal sobre a viabilidade dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin, *Metarhizium anisopliae* (metsch.) Sorokin e *Paecilomyces* sp. Bainier. **BioAssay**, Piracicaba, v. 1, n. 1, p.1-5, 2006.

TAMAI, M. A.; ALVES, S. B.; LOPES, R. B. FAION, M. PADULLA, L. F. L. Toxicidade de produtos fitossanitários para *Beauveira bassiana* (Bals.) Vuill. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 3, p. 89-96, 2002.

CAPÍTULO 2 - SELEÇÃO DE SURFACTANTES E ANÁLISE DA DISPERSÃO DE CONÍDIOS PARA FORMULAÇÃO DE FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO

Resumo – A palma forrageira, importante fonte de subsistência no Nordeste vem sendo severamente atacada pela cochonilha-do-carmim há alguns anos. Estudos de manejo da praga estão sendo desenvolvidos e uma das medidas de controle a ser adotada é o uso de bioinseticidas à base de fungos entomopatogênicos. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi selecionar surfactantes que garantam a máxima dispersão de conídios de *B. bassiana* em calda de pulverização, com manutenção de sua viabilidade para uso no controle da cochonilha-do-carmim no Semi-Árido nordestino. Avaliou-se a exposição do isolado a diferentes concentrações de surfactantes em meio de cultivo através do crescimento de colônias, germinação dos conídios após exposição temporária aos produtos e a influência do balanço hidrofílico-lipofílico (HLB) na dispersão e viabilidade de conídios. Unitol L/20 e Ultralex NP/100 não apresentaram efeito deletério na formação de colônias, e Surfion 5409, detergente neutro Ypê® e sabão OMO®, apresentaram grande toxicidade ao fungo. Não houve interferência de Unitol L/20, Ultralex NP/100 e Ultratan D na germinação dos conídios nos primeiros 10 minutos de exposição. Após 120 minutos, houve grande redução da germinação a partir da concentração 0,5%, com exceção de Ultralex NP/100. A dispersão dos conídios foi adequada nas soluções com índices HLB entre 6,4 e 13,3, obtendo-se alta germinação dos conídios dispersos nestas soluções nos dois períodos avaliados. Concluiu-se que a germinação e dispersão dos conídios do isolado LCB63 de *B. bassiana* são influenciadas pelos surfactantes e adequação do HLB das soluções.

Palavras-chave: Adjuvantes, balanço hidrofílico-lipofílico, *Beauveria bassiana*, controle biológico, *Dactylopius opuntiae*.

CHAPTER 2 - SURFACTANTS SELECTION AND CONIDIA DISPERSION ANALYZE FOR THE FORMULATION OF AN ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS

SUMMARY – The Forage palm, important Northern Brazil subsistence source, has been for many years severely attacked by Carmin Cochineal. Studies of the handling of this pest are being developed and one of the adopted options is the use of bioinsecticides based on entomopathogenic fungus. Therefore, this study aimed to select surfactants that, maintaining its viability in pulverization broth, guaranteed the maximum dispersion of *B. bassiana* conidia spraying suspension, with maintenance of its viability for the its use in the control of the Carmin Cochineal in the Northern Brazil. The exposition of conidia to different surfactants concentrations in growth medium was evaluated by the growth of the colonies, germination after exposition to the products and by the influence of the hydro lipofilic balance in the conidia dispersion and viability. Unitol L/20 and Ultranex NP/100 did not show a deleterious effect in the formation of the colonies, and Surfion 5409, Ypê® neutral detergent and OMO® washing power, showed high toxicity to the fungus. There was no interference of Unitol L/20, Ultranex NP/100 and Ultratan D in the conidia germination during the first 10 minutes of exposition. With the exception of Ultranex NP/100, after 120 minutes of exposition, there was a huge decrease in germination since the concentration of 0.5%. The conidia dispersion was adequate in the solutions with HLB indexes between 6.4 and 13.3, obtaining in both solutions and both evaluating periods a high germination of the dispersed conidia. The present study permits to conclude that germination and dispersion of the conidia of the LCB63 *B. bassiana* isolate are influenced by the surfactants and adequacy of the HLB solutions.

Keywords: Adjuvants, *Beauveria bassiana*, biological control, *Dactylopius opuntiae*, hydrofilic-lipofilic-balance.

1. INTRODUÇÃO

Fungos entomopatogênicos são relativamente comuns e frequentemente induzem epizootias, sendo um importante fator de controle de populações de insetos em condições naturais (BUTT et al., 2001), e uma das alternativas adotadas em programas de manejo integrado de pragas (MIP). *B. bassiana* e *M. anisopliae* são os fungos entomopatogênicos mais conhecidos e comercializados como agentes de controle biológico no mundo (ALVES, 1998; FARIA & WRAIGHT, 2007).

A forma de uso em larga escala consiste na produção massal dos fungos em arroz e aplicação pelo método inundativo dos propágulos infectivos, comumente conídios, nas áreas com incidência de praga. Atualmente, alguns estudos relacionados a tecnologias para a conservação, manuseio e melhoria da eficiência da aplicação de fungos entomopatogênicos têm sido realizados buscando possibilitar o uso generalizado de micoinsetidas. Resultados satisfatórios têm sido obtidos em formulações com o uso de diferentes adjuvantes como espalhantes adesivos, emulsificantes e óleos vegetais ou minerais (ALVES et al., 2002; SILVA et al., 2006).

A adição de surfactantes à calda promove a suspensão, dispersão, incremento da deposição, molhamento, adesão e retenção dos conídios, aumentando a toxicidade sobre o alvo (COSTA et al., 2003). Os surfactantes são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica, capazes de produzir emulsões estáveis de conídios aéreos na sua forma pura, formulados em óleos ou outros adjuvantes hidrofóbicos. Diferenças de polaridade podem afetar o bom desempenho do bioinseticida já na fase de aplicação da calda, exigindo estudos para seleção de produtos. Estes, quando adequadamente utilizados, proporcionam a dispersão homogênea dos conídios sobre o substrato, potencializando a ação dos entomopatógenos (ALVES, 1998).

Alguns dos estudos para seleção de surfactantes consistem no uso do balanço hidrofílico-lipofílico (HLB) para definir produtos que proporcionem a dispersão adequada dos formulados em função de sua hidrofobicidade. O índice HLB de um emulsificante ou detergente é um valor que expressa a relação entre o grupo hidrofílico e lipofílico. Estes

estudos são recentes, mas diversos produtos comercialmente disponíveis podem ser avaliados quanto ao grau de dispersão dos conídios, que pode variar em função das espécies e dos isolados estudados, em busca de propriedades físico-químicas desejáveis da formulação (JIN et al., 2008).

Nos últimos anos *D. opuntiae*, conhecida como cochonilha-do-carmim, tem causado grandes perdas na cultura da palma forrageira no Semi-Árido nordestino, uma das principais alternativas de suprimento do sistema pecuário no período de estiagem, garantindo a manutenção de toda cadeia produtiva durante este período (BRITO et al., 2008). Nas condições climáticas do Agreste e do Sertão, *D. opuntiae* apresenta um grande potencial biótico e explosões populacionais são observadas todos os anos (WARUMBY et al., 2005). Nos estudos desenvolvidos no Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Semi-Árido, o isolado LCB53 de *M. anisopliae* promoveu 70% de mortalidade de adultos e o isolado LCB63 de *B. bassiana* promoveu 90% de mortalidade de ninfas de *D. opuntiae*. Novos estudos precisam ser conduzidos na busca de tecnologias de formulações que permitam aumentar a eficácia dos agentes de controle biológico em campo. No entanto, estes estudos são escassos na literatura. Assim, o objetivo deste trabalho foi selecionar surfactantes que garantam a máxima dispersão de conídios de *B. bassiana* em calda de pulverização, com manutenção de sua viabilidade.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção do inóculo do isolado LCB63 de *Beauveria bassiana*

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Semi-Árido em Petrolina/PE. Foi usado o isolado LCB63 de *B. bassiana* obtido de *Hypothenemus hampei*, cedido pelo Laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico de Campinas-SP. Para utilização nos experimentos o isolado foi inoculado e reisolado da cochonilha-do-carmim.

Para obtenção do inóculo o fungo foi cultivado em meio de Batata Dextrose Ágar (BDA) e incubado em BOD à $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$ no escuro durante 15 dias. Uma suspensão de conídios foi obtida de placas densamente colonizadas, utilizando-se como dispersante uma solução de Triton X-100 a 0,05% que foi adicionada em erlenmeyers contendo 100 mL de arroz parboilizado, autoclavado, contendo 50% de umidade e dispostos em estufa a $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 10 dias para obtenção da matriz. Após a esporulação, 10 g do substrato foi transferida para sacos de plástico, contendo arroz autoclavado, com 50% de umidade e dispostos em câmara asséptica para crescimento e esporulação por 10 dias. Em seguida, o arroz colonizado pelo fungo foi transferido para estufa de desidratação com circulação forçada de ar a 35°C , até atingir teor de umidade em torno de 10%. Após a desidratação os conídios foram separados dos grãos utilizando-se extrator de conídios Mycoharvester M5 (ACIS R&D, Devon, UK).

2.2. Número de colônias do isolado LCB63 de *Beauveria bassiana* submetido a diferentes concentrações de surfactantes

O primeiro experimento foi realizado para avaliar a compatibilidade dos diferentes surfactantes ao isolado LCB63. Consistiu do cultivo de propágulos do isolado em placas de Petri contendo o Meio de MARTIN (1950), ao qual foram adicionados os diferentes surfactantes (Tabela 1) para alcançar as concentrações de 0; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 e 1%. As placas foram semeadas com 100 μL de uma suspensão contendo 5×10^2 conídios mL^{-1} e incubadas em BOD a $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$ no escuro, determinando-se o número de colônias após o 5º dia de incubação. Neste experimento, o delineamento aplicado foi o inteiramente casualizado com três repetições por tratamento.

2.3. Efeito de doses de surfactantes na germinação de conídios do isolado LCB63 de *Beauveria bassiana*

Em outro experimento avaliou-se o efeito dos surfactantes sobre a germinação dos conídios após o preparo de suspensões. Os conídios foram transferidos para soluções com as mesmas concentrações dos surfactantes utilizados no experimento anterior, permanecendo em condição ambiente por 10 e 120 minutos, períodos selecionados tendo por base uma estimativa do tempo decorrido entre o preparo e a

Tabela 1. Surfactantes testados para verificação da compatibilidade com o isolado LCB63 de *Beauveria bassiana*.

Produto	Descrição química	Consistência a 25°C
Surfon 5409	Alquilaril sulfonato de cálcio, alquilfenol poliglicol éter e butildiglicol alcoxlado	Líquido
Surfon 3403	Alquilaril sulfonato de cálcio, alquilfenol poliglicol éter e triglicéride alcoxlado	Líquido
Unitol L/20	Álcool laurílico 2	Líquido
Ultralex NP/100	Nonilfenol 10	Líquido
Ultratan D	Naftalenoformaldeído sulfonato de médio grau de condensação 80% ativo	Pó
Detergente neutro Ypê®	Ácido dodecilbenzeno sulfônico, alquil benzeno sulfonato de trietanolamina, lauril éter sulfato de sódio	Líquido
Sabão OMO®	Alquil benzeno sulfonato de sódio	Granulado

aplicação da calda do micoinseticida. Como controle utilizou-se solução de Triton X-100 a 0,05%. A germinação foi avaliada segundo o método de FRANCISCO et al. (2006), no qual alíquotas de 150 µL das suspensões contendo 10^6 conídios mL⁻¹, obtidas após homogeneização em vortex por 30s, foram semeadas sobre meio BDA distribuído em fina camada sobre lâminas de microscopia autoclavadas. A seguir as lâminas foram mantidas à $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 16 horas e uma solução de ácido láctico e azul de metileno foi utilizada para interromper o processo germinativo. A contagem de conídios germinados e não germinados foi realizada utilizando-se um microscópio ótico (Zeiss, Germany), com aumento de 400 vezes, contando-se no mínimo 450 conídios por lâmina. O

delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com três repetições por tratamento.

2.4. Dispersão de conídios do isolado LCB63 de *Beauveria bassiana* sob efeito de diferentes índices de balanço-hidrofílico-lipofílico (HLB)

Com base nos resultados dos experimentos anteriores foram selecionados os surfactantes Unitol L/20 e Ultranex NP/100, por causarem menor efeito deletério ao fungo, e avaliou-se a influência do HLB na dispersão dos conídios do isolado LCB63 de *B. bassiana*. O experimento foi desenvolvido segundo método adaptado de JIN et al. (2008), utilizando-se uma faixa de HLB de 6,4 a 13,3 (Tabela 2). Os valores intermediários de HLB foram obtidos a partir da mistura de Unitol L/20 com HLB = 6,4 e Ultranex NP/100 com HLB = 13,3 em diferentes proporções. Na determinação destas proporções foi usado o ábaco de HLB fornecido pela OXITENO (2008). O surfactante Triton X-100, cujo índice de HLB é 13,6 foi usado como padrão de comparação.

Tabela 2. Combinações de surfactantes de acordo com o índice de balanço hidrofílico-lipofílico (HLB) determinado pelo ábaco de HLB.

Combinação	Unitol L/20	Ultranex NP/100	HLB
1	100%	-	6.4
2	88%	12%	7.0
3	75%	25%	8.0
4	48%	52%	10.0
5	20%	80%	12.0
6	-	100%	13.3
Triton X-100	-	-	13.6

As soluções com os diferentes índices de HLB foram diluídas em 100 mL de água destilada esterilizada para obter a concentração de 0,1%, e em seguida transferidas para erlenmeyers aos quais foram adicionados 0,01g de conídios (5,2 x

10^8 conídios mL^{-1}) do isolado fúngico. No tratamento controle utilizou-se Triton X-100 a 0,1%, normalmente usado nos experimentos em condições de laboratório. A seguir os erlenmeyers foram dispostos em mesa agitadora orbital a 150 rpm, em temperatura ambiente, e a dispersão foi monitorada em intervalos de 5, 30 e 60 minutos, retirando-se alíquotas de $40\mu\text{L}$ dos diferentes tratamentos para contagem de conídios dispersos em câmara de Neubauer.

Decorridos 10 e 120 minutos após o início da agitação orbital, amostras de 1mL da suspensão de cada tratamento, foram transferidas para microtubos e uma alíquota de $150\mu\text{L}$ desta amostra foi retirada e semeada em meio BDA sobre lâmina de microscopia para teste de germinação, segundo o método de FRANCISCO et al. (2006). O experimento foi conduzido utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado com três repetições por tratamento.

2.5. Análise estatística

Para a análise da variância os dados coletados em porcentagem foram transformados utilizando-se a equação $y_{ij} = \text{arcoseno } \sqrt{x_{ij}/100}$ e os dados de dispersão de conídios em $\log_{10}x_{ij}$. Para estudar o efeito da concentração dos surfactantes sobre a germinação dos conídios, utilizou-se o modelo exponencial decrescente dado pela equação: $y = y_0 + Ae^{-x/t}$. Na comparação entre os índices de HLB utilizou-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela inoculação do isolado LCB63 de *B. bassiana* em meio contendo doses crescentes de surfactantes, verificaram-se respostas variáveis no número de colônias em função dos produtos e das doses utilizadas ($F = 45,49$; $p < 0,0001$) (Figura 1). Os produtos Unitol L/20 e Ultranex NP/100 apresentaram menor efeito sobre o fungo, apesar de promoverem pequena redução da formação de colônias. Ultratan D e Surfion

3403 promoveram significativa redução do número de colônias formadas em todas as concentrações estudadas ($F= 14,88$; $p < 0,0001$ e $F= 21,03$; $p < 0,0001$, respectivamente). Nos meios contendo Surfon 5409, detergente neutro YPÊ® e o sabão OMO®, verificaram-se as maiores reduções do número de colônias, com um número máximo de 30 a 50 colônias formadas até a concentração de 0,05%.

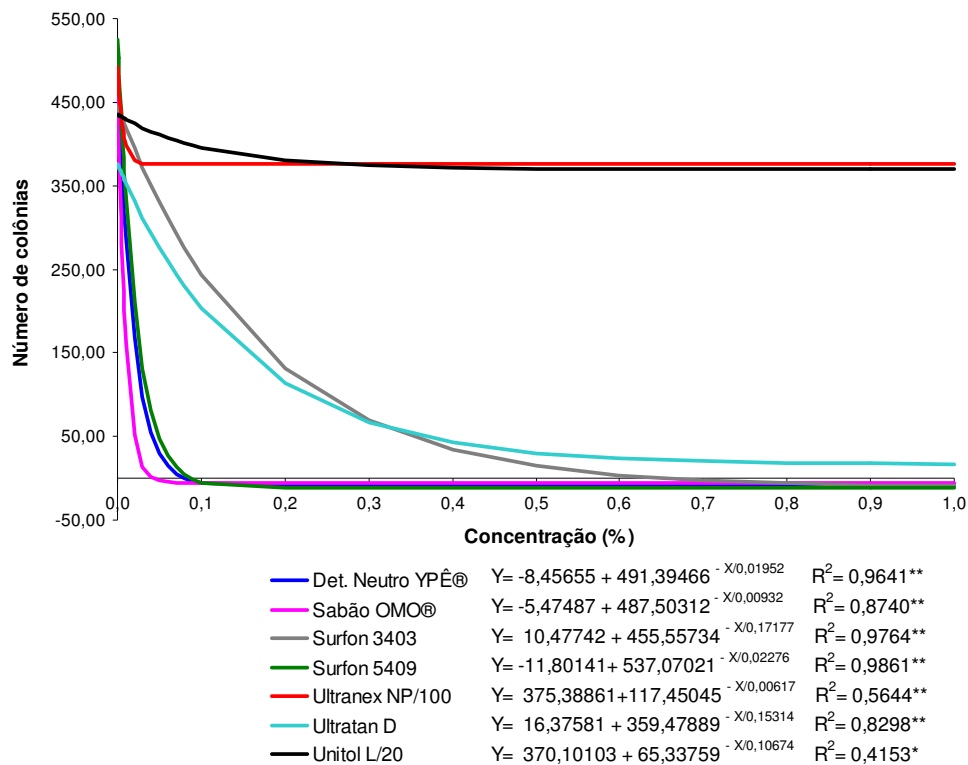


Figura 1. Número de colônias do isolado LCB63 de *Beauveria bassiana* cultivado em meio de MARTIN (1950), contendo diferentes concentrações de surfactantes, e incubado em BOD a $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 5 dias.

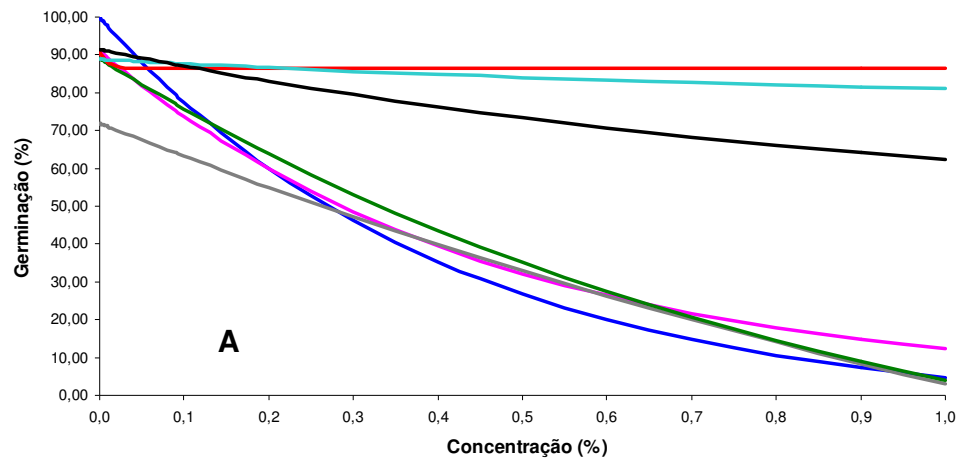
Os diferentes resultados obtidos para a formação de colônias nos meios contendo Surfon 3403 e Surfon 5409, provavelmente, se devem a diferenças nos radicais alquilaryl sulfonato de cálcio e alquilfenol poliglicol éter, alterando o triglicerídeo alcoxilado e butildiglicol alcoxilado, moléculas bases para os dois produtos. Avaliando alguns produtos comerciais TAMAI et al. (2002) verificaram que Bulldock 125 SC e

Turbo CE, produtos que possuem o mesmo princípio ativo, apresentaram compatibilidade e toxidez ao isolado PL63 de *B. bassiana*, respectivamente.

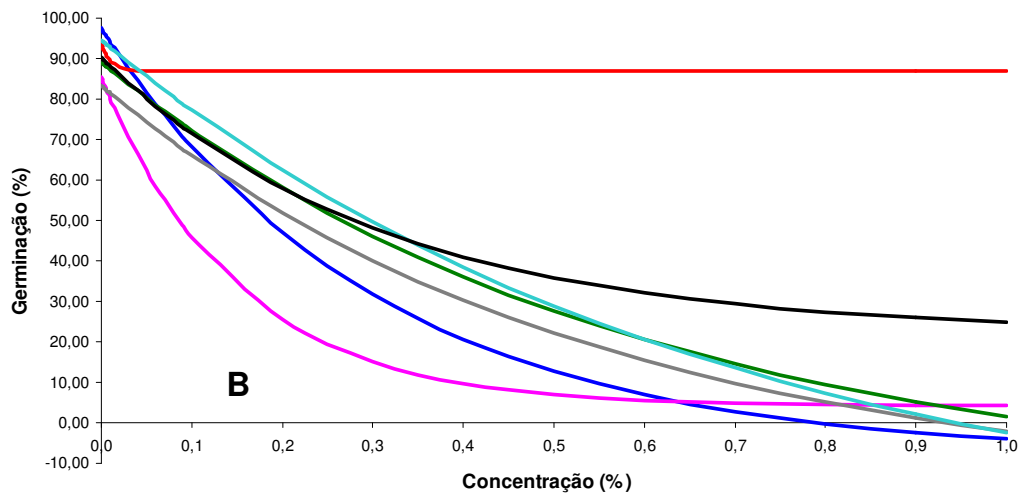
Segundo SILVA & NEVES (2005), a adição de produtos ao meio de cultivo pode provocar um atraso na formação de colônias pela inibição da germinação ou do crescimento vegetativo. Sendo assim, resultados obtidos a partir desta análise embora úteis, não fornecem resultados conclusivos para a avaliação da compatibilidade de fungos a produtos fitossanitários, sendo importante uma avaliação a partir do teste de germinação, quando o fungo passa a ser monitorado a partir das primeiras horas de seu crescimento.

No experimento de germinação observou-se efeito significativo da interação entre as doses utilizadas e os diferentes surfactantes tanto aos 10 minutos ($F = 21,53$; $p < 0,0001$) quanto às duas horas após o preparo da calda ($F = 59,14$; $p < 0,0001$) (Figura 2). Não houve diferença significativa na germinação dos conídios quando expostos por 10 minutos às suspensões contendo as diferentes concentrações de Ultralex NP/100, mesmo na maior concentração (1,0%) ($F = 1,41$; $p = 0,2383$). Ultratan D e Unitol L/20 também proporcionaram germinação alta (91% e 86%, respectivamente) na concentração 0,1%. Para os surfactantes Surfion 3403, Surfion 5409, detergente neutro YPÊ® e sabão OMO® ocorreu uma forte redução da germinação dos conídios na concentração de 0,5%. Após 120 minutos de preparo da calda, todos os produtos promoveram forte redução da germinação dos conídios, com exceção de Ultralex NP/100 onde verificou-se pequena redução da germinação, independentemente da concentração utilizada (Figura 2).

Diversos fatores podem atuar no desenvolvimento dos microrganismos promovendo a inibição da germinação e a formação de colônias dos entomopatógenos, entre eles os componentes e quantidade do produto, e sua capacidade de alterar o pH do meio de cultura quando em fase de experimentação (TAMAI et al., 2002; Silva & Neves, 2005). Neste estudo, a germinação de conídios expostos a soluções contendo Surfion 5409, detergente neutro YPÊ® e sabão OMO® apresentou melhor resultado quando comparado à formação de colônias nos meios contendo estes produtos, o que está de acordo com a afirmação de SILVA & NEVES (2005) de que a adição de produto



— Det. neutro YPÊ®	$Y = -4,81066 + 104,7411^{-x/0,41672}$	$R^2 = 0,9794^{**}$
— Sabão OMO®	$Y = 2,40314 + 88,64465^{-x/0,45926}$	$R^2 = 0,9886^{**}$
— Surfion 3403	$Y = -94,84341 + 166,73284^{-x/1,87869}$	$R^2 = 0,9908^{**}$
— Surfion 5409	$Y = -38,19302 + 127,22793^{-x/0,90694}$	$R^2 = 0,9740^*$
— Ultratex NP/100	$Y = 86,32724 + 4,53328^{-x/0,01}$	$R^2 = 0,8772^{ns}$
— Ultratan D	$Y = 76,56399 + 12,22885^{-x/1}$	$R^2 = 0,2615^{**}$
— Unitol L/20	$Y = 45,50814 + 45,92175^{-x/1}$	$R^2 = 0,8840^{**}$



— Det. neutro YPÊ®	$Y = -8,10136 + 105,52735^{-x/0,30797}$	$R^2 = 0,9746^*$
— Sabão OMO®	$Y = 4,08423 + 81,24001^{-x/0,14984}$	$R^2 = 0,9734^{**}$
— Surfion 3403	$Y = -17,79233 + 101,04683^{-x/0,14984}$	$R^2 = 0,9793^*$
— Surfion 5409	$Y = -17,81209 + 106,86684^{-x/0,58437}$	$R^2 = 0,9920^{**}$
— Ultratex NP/100	$Y = 86,9029 + 6,72352^{-x/0,01069}$	$R^2 = 0,8434^{**}$
— Ultratan D	$Y = -31,35184 + 125,91113^{-x/0,67843}$	$R^2 = 0,9718^{**}$
— Unitol L/20	$Y = 22,23112 + 67,99445^{-x/0,31037}$	$R^2 = 0,9736^{**}$

Figura 2. Germinação de conídios do isolado LCB63 de *Beauveria bassiana* quando submetido ao efeito de doses de diferentes surfactantes aos 10 (A) e 120 minutos (B) de exposição às soluções.

ao meio pode ocasionar um atraso na formação de colônias pela inibição da germinação do conídio ou do crescimento vegetativo.

No experimento de balanço hidrofílico-lipofílico verificou-se que os valores de HLB entre 6,4 e 13,3 apresentaram os resultados mais promissores com maior número de conídios dispersos na solução, podendo-se destacar o índice de HLB 7,0 que proporcionou os maiores valores numéricos de dispersão (Tabela 3).

Tabela 3. Número de conídios dispersos do isolado LCB63 de *Beauveria bassiana* quando submetido à exposição em 0,1% de Unitol L/20 e Ultranex NP/100 com diferentes índices HLB, após agitação a 150rpm em temperatura ambiente.

Tratamento	Tempo de dispersão (minutos)					
	5		30		60	
6,4	0,2983333	abc	0,2630000	ab	0,2976667	ab
7,0	0,4750000	ab	0,5796667	a	0,6373333	a
8,0	0,3166667	abc	0,3143333	ab	0,3230000	ab
10,0	0,2560000	bc	0,3486667	ab	0,3030000	ab
12,0	0,4526667	ab	0,5016667	ab	0,4020000	ab
13,3	0,5343333	a	0,4703333	ab	0,5313333	a
13,6	0,1296667	c	0,1813333	b	0,1426667	b
F	6,96**		4,08*		5,27**	
D.M.S.	0,2602		0,3400		0,3454	
C.V. (%)	26,52		32,10		32,88	

Valores transformados em $\log_{10}x_{ij}$. Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). *significativo a 5%. **significativo a 1% de probabilidade.

O maior valor de HLB (13,6) proveniente apenas de Triton X-100, apresentou menor grau de dispersão e também maior formação de espuma. Este resultado difere do obtido por JIN et al. (2008), que obteve menor dispersão de conídios em menores valores de HLB. Segundo este mesmo autor, formulações espumantes devem ser evitadas porque elas reduzem a uniformidade dos conídios na suspensão. No tratamento com o índice de HLB 6,4 proveniente apenas de Unitol L/20, observou-se grande formação de espuma, o que não recomenda o uso isolado deste surfactante como agente dispersante.

Os conídios expostos a soluções com maior índice de HLB tiveram a germinação aumentada. Os conídios expostos às soluções por 120 minutos apresentaram viabilidade maior que 91% em todos os tratamentos, enquanto que os conídios expostos às soluções por 10 minutos tiveram inicialmente uma viabilidade menor (85%) aumentando de acordo com o índice de HLB (Figura 3).

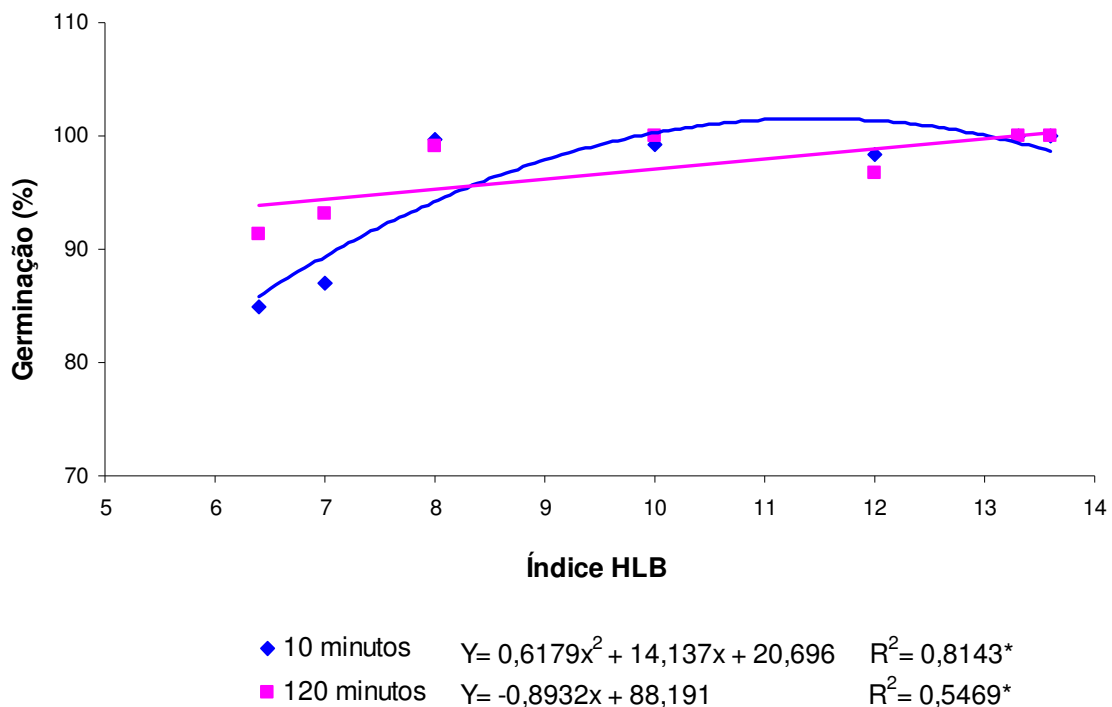


Figura 3. Germinação de conídios do isolado LBC63 de *Beauveria bassiana* quando submetidos à exposição física de soluções a 0,1% de Unitol L/20 e de Ultralex NP/100 com diferentes percentuais de HLB nos intervalos de 10 minutos e 120 minutos.

JIN et al. (2008) obtiveram resultados semelhantes e salientaram que a adequação do índice de HLB dos surfactantes pode melhorar a germinação de conídios hidrofóbicos de *B. bassiana*, promovendo rápido molhamento e absorção de água pelos conídios. O tempo de exposição aos surfactantes também influencia no tempo de germinação. Os resultados desta análise sugerem que a faixa adequada de HLB situa-se entre 8 e 13,3, por promover maior germinação dos conídios em ambos os tempos de exposição. Estudos desenvolvidos com *M. anisopliae* relataram melhoria na germinação

deste fungo após longa exposição em polioxietileno tridecil éter (TDA), surfactante com HLB 10 (JIN et al., 2008).

4. CONCLUSÕES

1. A germinação dos conídios do isolado LCB63 de *B. bassiana* é influenciada pelo tipo e concentração do surfactante.
2. A dispersão dos conídios do fungo é determinada pela adequação do índice do balanço hidrofílico-lipofílico da solução usada no preparo da calda de pulverização.

5. REFERÊNCIAS

ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163p.

ALVES, R. T.; BATEMAN, R. P.; GUNN, J.; PRIOR, C.; LEATHER, S. R. Effects of different formulations on viability and medium-term storage of *Metarhizium anisopliae* conidia. **Neotropical Entomology**, Piracicaba, v. 31, p. 91-99, 2002.

BRITO, C.H. de; LOPES, E. B.; ALBUQUERQUE, I.C. de; BATISTA, J. de L. Avaliação de produtos alternativos e pesticidas no controle da cochonilha-do-carmim na Paraíba. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, João Pessoa, v. 8, p. 1-5, 2008.

BUTT, T. M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. **Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potencial**. New York: CAB, 2001. 390 p.

COSTA, E. A. D.; ALMEIDA, J. E. M.; LOUREIRO, E. S.; SANO A. H. Compatibilidade de adjuvantes no desenvolvimento “in vitro” dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin e *Beauveria bassiana* (Bals.)Vuillemin. **Revista STAB**, Piracicaba, v. 22, p.38-40, 2003.

FARIA, M. R. de; WRAIGHT, S. P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, Orlando, v. 43, p. 237–256, 2007.

FRANCISCO, E. A.; MOCHI, D. A.; CORREIA, A. do C. B.; MONTEIRO, A. C. Influence of culture media in viability test of conidia of entomopathogenic fungi. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, p. 1309-1312, 2006.

JIN, X.; STREETT, D. A.; DUNLAP, C. A.; LYN, M. E. Application of hydrophilic-lipophilic balance (HLB) number to optimize a compatible non-ionic surfactant for dried aerial conidia of *Beauveria bassiana*. **Biological Control**, Orlando, v. 46, p. 226-233, 2008.

MARTIN, J. P. Use of acid, rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. **Soil Science**, Baltimore, v. 69, p.215-232, 1950.

OXITENO: **Descrição técnica de produtos**. 2007. Disponível em: <<http://www.oxiteno.com.br/aplicacoes/produto/marcaelinha.asp?idioma=PO&texto=S&marcaelinha=59>>. Acesso em: 12 dez. 2008.

SILVA, R. Z. da; NEVES, P. M. O. J. Techniques and parameters used in compatibility tests between *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *in vitro* phytosanitary products. **Pest Management Science**, New York, v. 61, p. 667-674, 2005.

SILVA, R. Z. da; NEVES, P. M. O. J.; SANTORO, P. H.; CAVAGUCHI, S. A. Efeito de agroquímicos à base de óleo mineral e vegetal sobre a viabilidade dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Paecilomyces* sp. Bainier. **BioAssay**, Piracicaba, v. 1, p.1-5, 2006.

TAMAI, M.A.; ALVES, S.B.; LOPES, R.B.; FAION, M.; PADULLA, L.F.L. Toxicidade de produtos fitossanitários para *Beauveira bassiana* (Bals.) Vuill. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, p. 89-96, 2002.

WARUNBY, J. F.; ARRUDA FILHO, G.; CAVALCANTI, V. A. L. B.; ARRUDA, G. Pragas da palma. In: MENEZES, R. C. et al. **A palma no Nordeste do Brasil**: conhecimento atual e perspectivas de uso. Recife: Ed. Universitária UFPE, 2005. p.65-80.

CAPÍTULO 3 - SELEÇÃO DE FOTOPROTETORES PARA FORMULAÇÃO DE *BEAUVERIA BASSIANA* A SER APLICADA NO CONTROLE DE *DACTYLOPIUS OPUNTIAE*

Resumo - A exposição excessiva de fungos entomopatogênicos à radiação solar pode impedir sua persistência no ambiente e comprometer o uso destes agentes de biocontrole, principalmente nas condições do Semi-Árido Nordestino. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi selecionar fotoprotetores que promovam a tolerância do isolado LCB63 de *Beauveria bassiana* à radiação solar e ultravioleta em fluxo laminar, visando posterior utilização em formulações para controle de *Dactylopius opuntiae*. Avaliou-se a viabilidade do isolado cultivado em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) associado a concentrações de 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0% de Neo Heliopan AV, Neo Heliopan E1000 e Oxibenzona. Em seguida, foi avaliada a germinação dos conídios sob ação de amido e leite (fotoprotetores hidrossolúveis), e Neo Heliopan AV, Neo Heliopan E1000 e Oxibenzona (fotoprotetores lipossolúveis), na concentração de 1%, expostos à radiação solar por 0, 60, 120 minutos. Posteriormente, avaliou-se a germinação dos conídios após exposição por 120 minutos à radiação solar e 5 minutos à radiação ultravioleta, usando-se as concentrações de 0,1, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0% dos fotoprotetores selecionados no ensaio anterior. Para verificar a mortalidade de ninfas de *D. opuntiae* foi preparado um experimento com os seguintes tratamentos: T1 – solução dos surfactantes (controle); T2 - solução dos surfactantes + óleo (1%); T3 – solução dos surfactantes + óleo (1%) + fotoprotetor (0,1%); T4 - solução dos surfactantes + óleo (1%) + 10^8 conídios mL^{-1} do isolado LCB63; T5 - solução dos surfactantes + óleo (1%) + 10^8 conídios mL^{-1} do isolado LCB63 + fotoprotetor (0,1%) Os três fotoprotetores lipossolúveis não apresentaram efeito deletério na viabilidade dos conídios. Houve acentuada redução da germinação do fungo exposto à radiação solar sob efeito do amido, apesar do aumento da concentração do produto. O aumento da concentração de Oxibenzona incrementou a germinação dos conídios e no tratamento com Neo Heliopan E1000 a porcentagem de germinação manteve-se em 50%, a partir da concentração de

1%. Na exposição a radiação ultravioleta, tratamentos com fotoprotetores lipossolúveis aumentaram a proteção dos conídios, cuja germinação atingiu 73,71% para oxibenzona e 51,82% para Neo Heliopan E1000, enquanto o amido proporcionou baixa proteção, com germinação de 37,4%. A adição dos adjuvantes aumentou a eficiência da formulação, destacando-se como mais promissoras as formulações I e II que promoveram 49,87% e 72,21% de mortalidade de ninfas de *D. opuntiae*, respectivamente. Estes resultados demonstram que os fotoprotetores lipossolúveis foram os mais adequados, protegendo os conídios da radiação solar e ultravioleta.

Palavras-chave: Cochonilha-do-carmin, controle biológico, fungo entomopatogênico, radiação solar, radiação ultravioleta.

CHAPTER 3 - SELECTION OF PHOTOPROTECTORS FOR THE FORMULATION OF *BEAUVERIA BASSIANA* APPLIED IN THE CONTROL OF *DACTYLOPIUS OPUNTIAE*

SUMMARY - The excessive exposition of entomopathogenic fungus to solar radiation may impede its persistence in the environment and compromise these biocontrol agents, mainly in the Northern Brazil conditions. This study had the objective of selecting photoprotectors that promote the tolerance of *Beauveria bassiana* isolate LCB63 to solar radiation and ultraviolet in laminar flow hood, aiming a their future use in formulation for the control of *Dactylopius opuntiae*. The viability of the cultivated isolate was evaluated in medium with the concentrations of 0.1; 0.5; 1.0; 2.0; 3.0; 4.0 and 5.0% of Neo Heliopan AV, Neo Heliopan E1000 and Oxibenzona. Afterwards, the conidia germination was evaluated under action of starch and milk (hydrosoluble photoprotectors) and Neo Heliopan AV, Nea Heliopan E1000 and Oxibenzona (lyposoluble photoprotectors), used in the concentration of 1% and exposed to solar radiation for 0, 60 and 120 minutes. Posteriorly, after 120 minutes of solar radiation and 5 minutes of ultraviolet radiation exposition the conidia germination was evaluated, using concentrations of de 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0% of the previously selected photoprotectors. To verify the mortality of *D. opuntiae* in the stage of nymph, an experiment was carried out with the following treatments: T1 – surfactants solution (control); T2 – surfactants solution + oil (1%); T3 – surfactants solution + oil (1%) + photoprotectors (0.1%); T4 – surfactants solution + oil (1%) + 10^8 conidia mL^{-1} of the isolate LCB63; T5 – surfactants solution + oil (1%) + 10^8 conidia mL^{-1} of the isolate LCB63 + photoprotector (0.1%). None, of the three lyposoluble photoprotectors demonstrate a deleterious effect on the conidia viability. Although there was an increase in the concentration of the product, a significant decrease on the fungus germination, when exposed to solar radiation under the starch effect, was observed. The augment of the Oxibenzona concentration increased conidia germination. In the Neo Heliopan E1000 treatment, since 1% concentration, the germination percentage maintained at 50%. In the ultraviolet

expositions, the treatments with lyposoluble photoprotectors increased the conidia protection, presenting germinations of 73.71% for Oxibenzona and 51.82% for Neo Heliopan E1000, while starch promoted a low protection, with a germination of 37.4%. The addition of products increased the efficiency of the formulation, distinguishing as the most promising the formulation I and II with, respectively, 49.87% and 72.21% of *D. opuntiae* nymph mortality. These results demonstrate that the lyposoluble photoprotectors were the most adequate, protecting conidia from solar and ultraviolet radiation.

Keywords: biological control, carmine cochineal, entomopathogenic fungus, solar radiation, ultraviolet radiation.

1. INTRODUÇÃO

Dactylopius opuntiae, comumente conhecida como cochonilha-do-carmim, vem trazendo anualmente sérios prejuízos para o cultivo da palma forrageira no Semi-Árido nordestino. O ataque da praga chega a 100 mil hectares cultivados com a palma na região da Paraíba (LOPES, et al, 2009) e os prejuízos somam cerca de 150 milhões ao ano para os produtores da região (EMBRAPA SEMI-ÁRIDO, 2008). Explosões populacionais deste inseto são mais freqüentes no período seco, diminuindo drasticamente no período chuvoso, fator limitante para o controle biológico, pois no período seco, tende a diminuir também a ocorrência dos inimigos naturais por conta da baixa umidade e alta temperatura. Dentre as alternativas de controle biológico, o uso de fungos entomopatogênicos como *B. bassiana* e *M. anisopliae* já mostra resultados promissores no controle de *D. opuntiae* em trabalhos desenvolvidos *in vitro* (BRITO et al., 2008). Entretanto, a exposição excessiva dos fungos à radiação solar pode impedir sua persistência no ambiente de controle e comprometer o uso destes entomopatógenos.

Em condições de campo, a eficácia de inseticidas biológicos se reduz de modo acentuado, já que o processo patogênico depende de uma série de fatores ambientais como temperatura, umidade relativa do ar, exposição à radiação solar direta, principalmente aos raios ultravioletas, saturação de água e outros (REIS et al., 2005). Assim sendo, estratégias de controle biológico em condições adversas requerem o desenvolvimento de formulações capazes de proteger o fungo dos efeitos deletérios provocados pelo ambiente.

Segundo EDGINGTON et al. (2000) os raios ultravioleta no comprimento de ondas entre 290 a 320nm (UV-B), representam a radiação UV de maior interesse biológico. A radiação UV causa danos à membranas citoplasmáticas, organelas e ao DNA, causando atraso na germinação, inativação de conídios e, conseqüentemente, redução da atividade inseticida (EDGINGTON et al., 2000; RANGEL et al., 2006; CHELICO & KHACHATOURIANS, 2007).

A tolerância à radiação UV é variável entre as espécies de fungos entomopatogênicos. Uma avaliação realizada por FERNANDES et al. (2007) identificou variabilidade genética quanto à resistência à UV-B entre isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* expostos a uma fonte artificial de radiação. O principal mecanismo de resistência se refere à existência de ferramentas de reparo de DNA que promovem a recuperação dos danos causados pela exposição ao material genético pelo estresse oxidativo promovido pela radiação UV (CHELICO & KHACHATOURIANS, 2007). Aparentemente, a existência e o grau de resistência estão associados à origem geográfica dos isolados, já que isolados oriundos de latitudes mais baixas apresentaram menor suscetibilidade à exposição (BRAGA et al., 2001; LELAND et al., 2005; FERNANDES et al., 2007).

Estudos recentes indicam que existe a possibilidade de se promover uma maior resistência dos conídios a UV-B utilizando-se alguns expedientes durante as fases de crescimento e esporulação. A exposição a estresses ambientais subletais ou a estresse nutricional, aparentemente, pode levar a produção de conídios com maior resistência a UV-B em fenômeno conhecido como proteção cruzada (RANGEL et al., 2008). Os resultados obtidos por RANGEL et al. (2004 e 2005) indicaram que o desenvolvimento em diferentes fontes de nutrientes afeta tanto a resistência à UV-B quanto a velocidade de germinação dos conídios, entre outras variáveis. Conídios produzidos em meios de cultivo não preferidos pelos fungos apresentaram maior resistência à exposição UV-B, quando comparados ao crescimento em meios ricos ou aos conídios obtidos em cadáveres dos insetos (RANGEL et al., 2004, 2008) indicando que o uso destas variáveis durante o processo de produção dos conídios pode afetar sua eficácia no campo.

Por outro lado, resultados positivos têm sido obtidos quanto à associação de fotoprotetores a bioinseticidas, aumentando a tolerância dos conídios à radiação ultravioleta A e B (ALVES et al., 1998; EDGINGTON et al., 2000). ALVES et al. (1998) sugerem que a maioria dos conídios de fungos entomopatogênicos podem ser encapsulados por óleo emulsionável, que lhe confere proteção contra efeitos deletérios da radiação solar. Considera-se um fotoprotetor eficaz aquele que apresenta maior

espectro de proteção à radiação, principalmente de comprimento de onda entre 290 a cerca de 400nm (GALENA, 2008).

Há uma variedade de produtos de baixo custo, que apresentam potencial para o uso em formulações de bioinseticidas como argila, farinha, carvão e materiais fluorescentes, como opções de produtos alternativos (EDGINGTON et al., 2000). Este autor desenvolveu estudos com amido, ácido ascórbico, leite, albumina e outros, obtendo bons resultados na combinação de produtos e associação destes à isolado de *B. bassiana*. Existem no mercado diversos fotoprotetores sintéticos que podem ser usados para o desenvolvimento de formulação, isolados ou associados a outros compostos (GALENA, 2008), entretanto estudos envolvendo a associação destes produtos a entomopatógenos são bastante escassos na literatura.

O objetivo deste trabalho foi selecionar fotoprotetores que sejam compatíveis com o isolado LCB63 de *B. bassiana*, visando à formulação de bioinseticida resistente a radiação ultravioleta para aplicação no controle de *D. opuntiae* nas condições do Semi-Árido nordestino.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Obtenção do inóculo do isolado LCB63 de *Beauveria bassiana*

Os experimentos foram realizados no laboratório de Controle Biológico da Embrapa Semi-Árido em Petrolina/PE e o isolado utilizado foi LCB63 de *B. bassiana*, obtido de *Hypothenemus hampei* e cedido pelo Laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico de Campinas-SP, anteriormente selecionado quanto à patogenicidade e virulência à cochonilha-do-carmim no Semi-Árido nordestino.

Para obtenção do inóculo o fungo foi cultivado em meio de Batata Dextrose Ágar (BDA) e incubado à $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$, no escuro durante 15 dias. Uma suspensão de conídios obtida de placas densamente colonizadas, utilizando-se como dispersante uma solução de Triton X-100 a 0,05%, foi inoculada em erlenmeyers contendo 100 ml de arroz parboilizado, autoclavado, com 50% de umidade e incubado em câmara a $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$

durante 10 dias para obtenção da matriz. Após a esporulação, 10 g do substrato foi transferido para sacos de plástico contendo arroz autoclavado com 50% de umidade e dispostos em câmara asséptica para crescimento e esporulação por mais 10 dias. Em seguida, a mistura de substrato + propágulos foi transferida para estufa de desidratação com circulação forçada de ar a 35°C até atingir teor de umidade em torno de 10%. Após a desidratação os conídios foram separados dos grãos utilizando-se um Mycoharvester M5 (ACIS R&D, Devon, UK).

2.2. Compatibilidade de fotoprotetores ao isolado LCB63 de *Beauveria bassiana*

Neste primeiro experimento, avaliou-se o efeito de fotoprotetores sobre a germinação dos conídios. Padronizou-se uma suspensão de 10^8 conídios mL^{-1} em óleo de milho e, em seguida 100 μL desta suspensão foi transferida para microtubos de 1 mL contendo diferentes concentrações: 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0% de fotoprotetores lipossolúveis (Tabela 1). Os controles utilizados foram óleo de milho e Triton X-100 a 0,05%, contendo a suspensão de fungo padronizada como nos demais tratamentos. A germinação foi avaliada segundo o método adaptado de FRANCISCO et al. (2006) no qual alíquotas de 90 μL das suspensões foram espalhadas com espátula de Drigalsky em meio de cultura BDA distribuído em fina camada sobre lâminas de microscopia autoclavadas. No caso do controle com Triton X-100 a 0,05%, pipetou-se 150 μL da suspensão em cada lâmina. A seguir, estas lâminas foram mantidas à $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 16 horas e uma solução de ácido láctico e azul de metileno foi utilizada para interromper o processo germinativo. A contagem de conídios foi realizada utilizando-se um microscópio ótico (Zeiss, Germany) com aumento de 400 vezes, contando-se no mínimo 450 conídios por lâmina. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com três repetições por tratamento.

2.3. Seleções de fotoprotetores para proteção de conídios do isolado LCB63 de *Beauveria bassiana* expostos à radiação solar

Após o ensaio de compatibilidade do fungo a fotoprotetores, foi avaliada a influência destes produtos sobre a germinação do isolado LCB63 de *B. bassiana* em períodos de 1 e 2 horas de exposição a radiação solar. O experimento foi desenvolvido segundo método adaptado de ALVES (1998), em que uma alíquota de 300 µL de uma suspensão de 10^8 conídios mL⁻¹ em óleo de milho e 500 µL da suspensão de conídios em Triton X-100 a 0,05% contendo fotoprotetores na concentração de 1%, foi adicionada e espalhada com espátula de Drigalsky em placas de Petri vazia esterilizadas. Foram utilizados cinco fotoprotetores (Tabela 1), óleo de milho e, como controle absoluto, uma solução em Triton X-100 a 0,05%, somando um total de sete tratamentos.

Tabela 1. Descrição físico-química de fotoprotetores usados nos testes de compatibilidade com o isolado LCB63 de *Beauveria bassiana*

Produto	Nomenclatura química	Aspecto	Solubilidade
Amido	Amido solúvel P.A.	Pó	Hidrossolúvel
Leite	-	Pó	Hidrossolúvel
Neo Heliopan AV	Metoxicinamato de octila	Líquido oleoso	Lipossolúvel
Neo Heliopan E1000	Metoxicinamato de isoamila	Líquido límpido	Lipossolúvel
Oxibenzona	Benzofenona-3	Pó	Lipossolúvel

A seguir, as placas foram transferidas para bandejas de plástico e expostas ao sol a uma altura de 0,70 m da superfície do solo em uma área com cobertura de grama (*Paspalum notatum*), entre 13:30 - 15:30 horas, em dia sem nebulosidade (Figura 1). Após os dois períodos de exposição, as placas foram recolhidas e os conídios removidos com a mesma alíquota utilizada no preparo da suspensão, de óleo de milho puro para os tratamentos contendo fotoprotetores lipossolúvel e Triton X-100 a 0,05% para os tratamentos contendo fotoprotetores hidrossolúveis através de raspagem com uma espátula de Drigalsky. Em seguida, a suspensão resultante foi colhida com micropipeta e transferida para lâminas de microscopia contendo meio de cultura BDA

para avaliação da germinação, conforme descrito anteriormente. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com três repetições por tratamento.

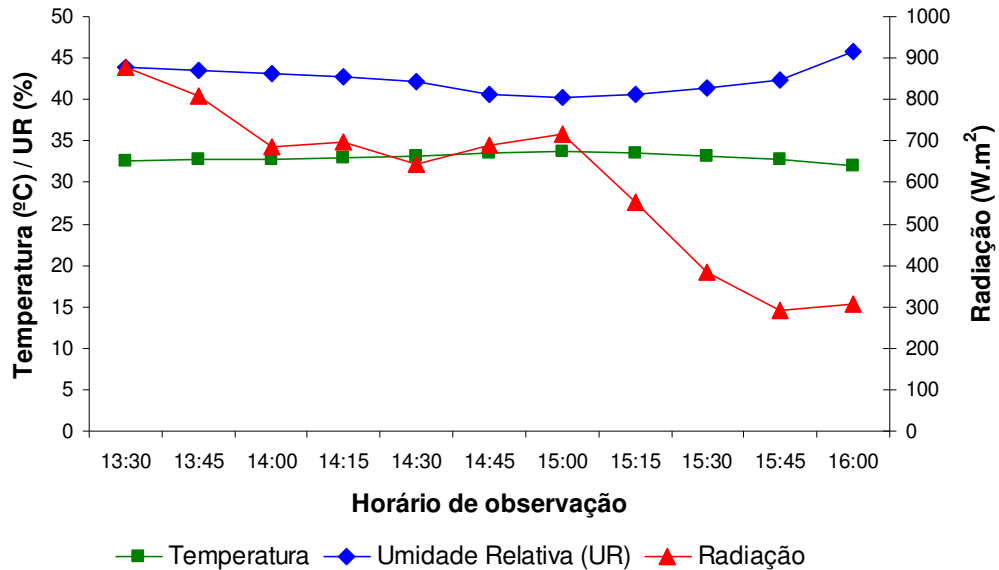


Figura 1. Variação da temperatura, umidade relativa do ar e radiação solar total durante a execução do experimento para seleção de fotoprotetores (EMBRAPA SEMI-ÁRIDO, 2009).

2.4. Efeito de doses de fotoprotetores na germinação de conídios do isolado LCB63 de *Beauveria bassiana* após exposição à radiação solar e UV artificial.

De forma a determinar o efeito de diferentes doses dos fotoprotetores sobre a germinação dos conídios, foi realizado um experimento utilizando-se as concentrações 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0% dos produtos que apresentaram melhores resultados na exposição à radiação solar usando a concentração de 1%: Amido, Neo Heliopan E1000 e Oxibenzona. A condução e avaliação foram realizadas como descrito no experimento anterior.

Simultaneamente, foi realizado outro experimento utilizando radiação UV artificial. Neste, após a dispersão em placas de Petri, as suspensões de conídios foram

expostas à radiação ultravioleta utilizando-se uma lâmpada UV de 15W, com comprimento de onda de 254nm (G15T8 Osram) por um período de 5 minutos.

Os experimentos foram conduzidos utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado com três repetições por tratamento.

2.5. Mortalidades de ninfas de primeiro instar de *Dactylopius opuntiae* após o tratamento com formulação em óleo do isolado LCB63 de *Beauveria bassiana*

Ninfas de primeiro instar de *D. opuntiae* foram submetidas à pulverização com formulação do isolado LCB63 de *B. bassiana* em óleo de milho contendo Oxibenzona a 0,1% e uma solução a 0,1% de surfactantes (20% de Unitol L/20 + 80% de Ultranex NP/100, com índice de HLB = 12) previamente selecionados em trabalho anterior.

O bioensaio foi conduzido em laboratório com cinco tratamentos: T1 – solução dos surfactantes (controle); T2 - solução dos surfactantes + óleo (1%); T3 – solução dos surfactantes + óleo (1%) + fotoprotetor (0,1%); T4 (Formulação I) - solução dos surfactantes + óleo (1%) + 10^8 conídios mL^{-1} do isolado LCB63; T5 (Formulação II) - solução dos surfactantes + óleo (1%) + 10^8 conídios mL^{-1} do isolado LCB63 + fotoprotetor (0,1%).

As ninfas foram transferidas para discos de palma com aproximadamente 5cm de diâmetro, nos quais foram distribuídos 100 indivíduos. A pulverização foi feita utilizando-se uma Torre de Potter (Burkard Scientific, UK). A seguir, os discos foram acondicionados em potes transparentes e transferidos para sala de incubação a $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e 70% de umidade relativa do ar no escuro. A mortalidade foi avaliada a cada 3 dias por 30 dias. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três discos de palma por tratamento e um total de 300 insetos.

2.6. Análise estatística

Os dados obtidos nos diferentes experimentos foram avaliados quanto à normalidade da distribuição aplicando-se o teste de Smirnof-Kolmogorov e quanto a

homogeneidade da variância pelo teste de Levene (HILL & LEWICKI, 2006). Para fins de análise da variância ($p < 0,05$) os dados coletados em porcentagem foram transformados utilizando-se a equação $y_{ij} = \text{arcoseno } \sqrt{x_{ij}/100}$. Para estudar o efeito da concentração dos surfactantes sobre a germinação dos conídios, utilizou-se o modelo da derivação das equações de regressão linear estimadas. O bioensaio foi avaliado em arranjo fatorial quanto a diferenças entre os produtos e o efeito de cada produto que compõe o formulado correspondente a cada tratamento. As médias obtidas foram comparadas entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A viabilidade do isolado LCB63 de *B. bassiana*, não foi afetada pela exposição às diferentes concentrações dos fotoprotetores lipossolúveis (Figura 2). Não foi observada diferença significativa ($F = 0,95$; $p = 0,5150$) na germinação dos conídios quando expostos a Oxibenzona, Neo Heliopan AV e Neo Heliopan E1000, nas diferentes concentrações estudadas.

Este resultado indica a compatibilidade do fungo com tais fotoprotetores, mesmo nas maiores concentrações utilizadas, mostrando que podem ser usados no desenvolvimento de uma formulação com isolado LCB63 de *B. bassiana*. Em estudos envolvendo a associação de *B. bassiana* a Tinopal, REDDY et al. (2008) verificaram que o produto não ocasionou qualquer efeito adverso sobre o crescimento do fungo nas diferentes concentrações analisadas (1, 5 e 10 gL^{-1}). A associação de fotoprotetores com componentes da formulação de um micoinseticida é uma opção desejável por contribuir para a sobrevivência de fungos entomopatogênicos no campo (CHELICO et al, 2007; REDDY et al., 2008), protegendo-os dos efeitos nocivos da radiação solar.

Entretanto, estes produtos devem ser previamente testados quanto à compatibilidade aos microrganismos, pois podem ter efeito imediato sobre os fungos, causando perda de viabilidade e morte, podendo afetar a estabilidade do produto armazenado, causando a inativação do ingrediente ativo (BATISTA FILHO et al., 1998).

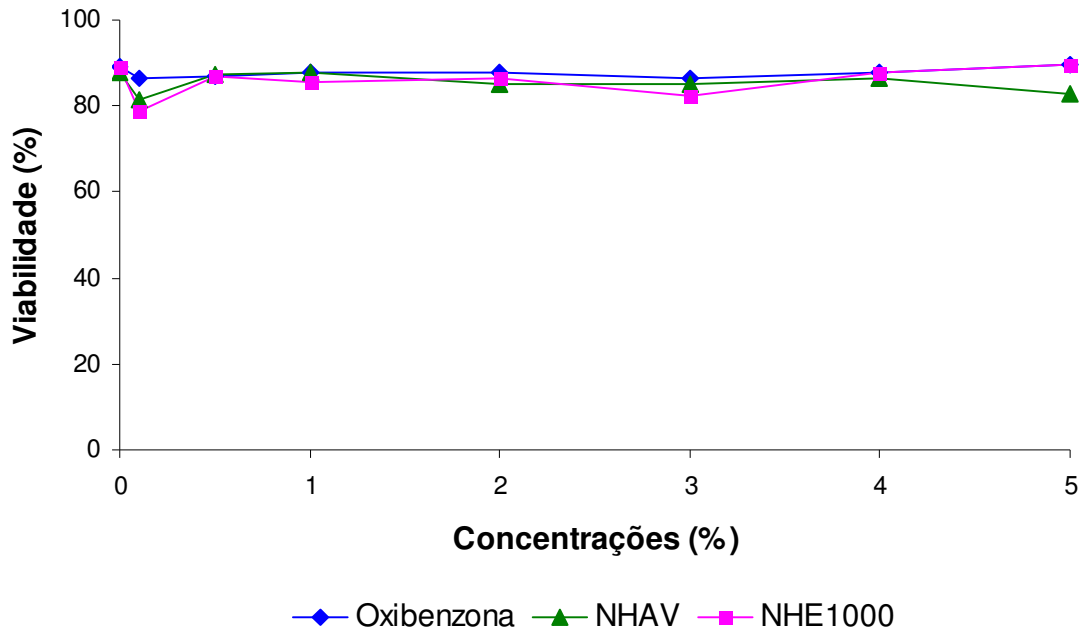


Figura 2. Viabilidade do isolado LCB63 de *Beauveria bassiana* após exposição dos conídios a diferentes concentrações dos fotoprotetores lipossolúveis.

Alguns estudos sugerem que as moléculas de óleo utilizado como veículo da suspensão podem proteger os conídios quando estes são expostos aos fotoprotetores não prejudicando a sua germinação (ALVES et al., 1998). Sendo assim, se faz necessário um estudo prévio da associação de fotoprotetores ao óleo usado como veículo da formulação, no intuito de avaliar a estabilidade do fungo durante o período de armazenamento.

Os valores médios da germinação do isolado LCB63 sob efeito de fotoprotetores hidrossolúveis e lipossolúveis na concentração de 1% estão apresentados na Tabela 2. No tempo zero de exposição não houve efeito negativo sobre a germinação, porém aos 60 e 120 minutos, os produtos já demonstravam efeito de proteção aos conídios conforme o aumento da exposição à radiação solar. Nestes dois tempos de avaliação, verificou-se, claramente, o efeito da radiação solar sobre os conídios e também a manutenção da viabilidade nos tratamentos contendo fotoprotetores, principalmente no tempo de exposição de 60 minutos, com exceção da testemunha, contendo Triton X-

100 que apresentou viabilidade em torno de 49%. Aos 120 minutos houve acentuada redução da viabilidade para todos os tratamentos, sendo que na testemunha contendo

Tabela 2. Influência da radiação solar na germinação do isolado LCB63 de *Beauveria bassiana* sob efeito de fotoprotetores na concentração de 1%.

Fotoprotetores	Tempo de exposição (minutos)		
	0	60	120
Triton X-100 (controle)	81,87 ± 6,39 c	49,40439 ± 6,50 b	0 ± 0 c
Amido	88,30 ± 4,70 abc	78,00003 ± 9,19 a	11,19 ± 7,07 b
Leite	85,27 ± 6,60 bc	77,36264 ± 7,79 a	16,033 ± 5,29 b
Óleo de milho (controle)	83,75 ± 2,33 c	69,18787 ± 23,59 ab	47,26 ± 12,58 a
Neo Heliopan AV	86,48 ± 3,66 bc	71,55433 ± 8,92 ab	41,31 ± 11,61 a
Neo Heliopan E 1000	91,45 ± 1,77 ab	74,22144 ± 8,83 a	41,45 ± 8,14 a
Oxibenzona	93,87 ± 1,24 a	76,26885 ± 4,45 a	34,61 ± 9,28 a
F	6,87**	4,13**	48,63**
D.M.S.	6,3722	13,3212	9,9138
C.V. (%)	5,07	12,76	19,08

Valores em porcentagem, transformados em arco-seno. Médias seguidas do desvio padrão. Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$); **significativo a 1% de probabilidade.

Triton X-100 a viabilidade chegou a 0%, diferindo significativamente da testemunha com óleo e os tratamentos envolvendo fotoprotetores, principalmente os lipossolúveis. No entanto, deve-se destacar o efeito protetor do óleo que foi usado como veículo da suspensão confirmando resultados obtidos por ALVES et al. (1998), quando estudaram o uso de óleo de amendoim Shellsol, acrescido de Ondina, água e Emoleo[®], Codacide[®], Natur'l óleo[®], Ashlade[®] que reforçaram, significativamente, a tolerância de conídios de *M. anisopliae* ao tempo de exposição à radiação ultravioleta.

Neste estudo, os fotoprotetores hidrossolúveis não demonstraram proteger os conídios conforme o aumento da exposição à radiação solar, na concentração estudada. Talvez as próprias condições do ambiente no momento da exposição, como alta temperatura, vento e o aquecimento pela própria radiação solar tenham prejudicado a conformação do leite e do amido que deveriam formar uma película protetora,

atuando como uma barreira sobre a superfície dos conídios após secos, absorvendo a radiação ultravioleta e contribuindo para a proteção (EDGINGTON et al., 2000). Possivelmente, devido à alta temperatura houve rápida secagem da preparação e esses produtos formaram grumos individualizados que não protegeram os conídios deixando-os expostos à radiação. Outra possibilidade é que as concentrações do leite e do amido não tenham sido suficientes para conferir a necessária proteção, sugerindo que maiores concentrações tenham que ser estudadas.

Os fotoprotetores lipossolúveis proporcionaram uma proteção semelhante à testemunha com óleo que, por si só já proporciona uma certa proteção aos conídios. O incremento das doses dos fotoprotetores lipossolúveis pode aumentar a proteção do fungo. Contudo, novos estudos são necessários para verificar se doses maiores dos produtos não são deletérias aos conídios, e se não aumentariam demasiadamente o custo econômico da formulação, comprometendo a sua comercialização. Após 60 minutos de exposição a radiação solar, EDGINGTON et al. (2000), verificaram que a germinação dos esporos sob efeito de diferentes fotoprotetores, foi reduzida em 89,4% em relação a germinação inicial. Entre os produtos avaliados, Oxibenzona apresentou-se como prejudicial à germinação do fungo em todas as concentrações testadas (0,1 a 5%), o amido na concentração de 5-20% não apresentou propriedades fotoprotetoras e o leite na concentração de 20% apresentou o mais alto nível de fotoproteção.

No terceiro experimento de germinação, em que o isolado LCB63 foi exposto a Neo Heliopan E1000, Oxibenzona e amido, arbitrariamente escolhidos, observou-se efeito significativo da interação entre as doses utilizadas e os diferentes fotoprotetores ($F= 7,997$; $p < 0,0001$). No entanto, para o amido não houve diferença significativa na germinação dos conídios em função das doses do fotoprotetor, após exposição à radiação solar por 120 minutos, mesmo na maior concentração (3,0%) ($F= 1,444$; $p > 0,05$), tendo-se observado uma redução para 2% da germinação em relação aos outros tratamentos. Para Neo Heliopan E1000 foi observado um aumento significativo da germinação conforme o aumento da concentração até 1%, mantendo-se estável nas demais doses ($F= 14,021$; $p < 0,0001$), com germinação em torno de 49%. Já pra

Oxibenzona houve um aumento da proteção dos conídios de acordo com o aumento das concentrações ($F= 12,095$; $p< 0,0001$) com germinação em torno de 63% (Figura 3).

Com o aumento da concentração de Oxibenzona até 3% houve um incremento na germinação do fungo indicando um efeito positivo do fotoprotetor como adjuvante a ser implementado em formulação contendo o isolado LCB63 de *B. bassiana*. Segundo SHAH et al. (1998) e MORTUZA & ILAG (1999), formulações à base de óleo oferecem boa proteção contra radiação UV. No entanto, a adição de fotoprotetores pode incrementar o grau de proteção. Entre estes, a Oxibenzona e derivados do ácido estilbene dissulfônico têm sido utilizados para proteção de agentes de controle biológico contra radiação UV.

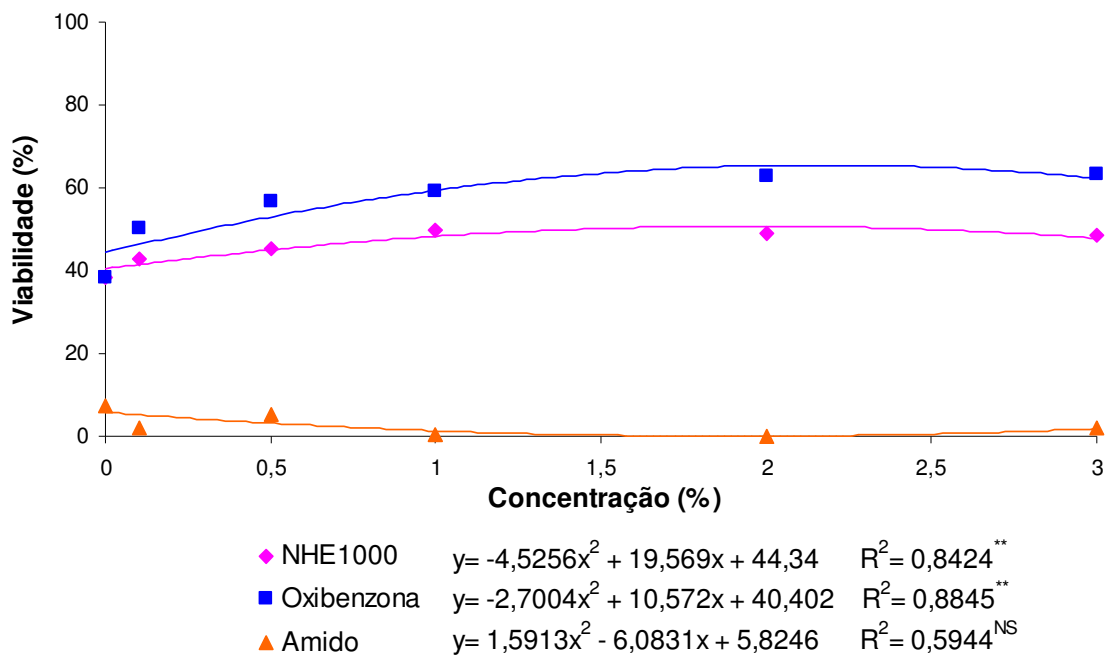


Figura 3. Viabilidade de conídios do isolado LCB63 de *Beauveria bassiana* após exposição à radiação solar, sob ação de diferentes concentrações de fotoprotetores.

O Neo Heliopan E1000 apresentou a mesma proteção aos conídios já definida no primeiro experimento com a dose de 1% mesmo com o aumento das concentrações.

Esse efeito pode estar ligado às propriedades do próprio produto que pode apresentar uma proteção limite, a partir da qual a proteção deixa de existir. Segundo a GALENA (2008) este fotoprotetor pode ser usado até a concentração de 10%. No primeiro experimento, este mesmo fotoprotetor não prejudicou a viabilidade do fungo até a concentração de 5%, mas altas concentrações destes produtos em formulação de bioinseticidas podem inviabilizar sua comercialização por aumentar o custo econômico do produto. Segundo REDDY et al. (2008), Tinopal usado na máxima concentração (10 g L⁻¹) conferiu proteção total dos conídios após exposição à radiação solar até 3 horas, e melhor sobrevivência do que a verificada nos controles até 4 horas.

No experimento em que o isolado foi exposto à radiação ultravioleta em fluxo laminar, foi observado o efeito significativo da interação entre as doses utilizadas e os diferentes fotoprotetores ($F= 7,270$; $p<0,0001$). O tratamento com amido apresentou um aumento da viabilidade dos conídios a partir de 1% ($F= 17,024$; $p<0,0001$) (Figura 4). Tanto para Oxibenzona como para o Neo Heliopan E1000 foi observado um aumento linear da germinação conforme o aumento da concentração ($F= 50,111$; $p< 0,0001$ e $F= 20,887$; $p< 0,0001$, respectivamente).

A viabilidade do fungo nos tratamentos com Oxibenzona e o Neo Heliopan E1000 apresentou resposta semelhante à obtida no experimento com a radiação solar, mas para o amido observou-se um aumento da viabilidade do fungo chegando até 37% de germinação. Em estudos desenvolvidos por REDDY et al. (2008) a radiação ultravioleta, proveniente de lâmpada, promoveu um efeito mais grave sobre a viabilidade conidial do que a radiação natural, com redução da germinação em 90% após 1 hora de exposição. A mesma observação foi relatada por EDGINGTON et al. (2000), onde os conídios perderam a viabilidade no prazo de 20 segundos de exposição à radiação ultravioleta proveniente da lâmpada na presença de todos os produtos testados, com exceção do leite e albumina que demonstraram propriedades potenciais para fotoproteção.

Como o experimento foi desenvolvido no laboratório, a estabilidade das condições ambientais, principalmente da temperatura, pode não ter interferido negativamente na ação protetora do amido, contribuindo para o aumento da viabilidade.

Já a Oxibenzona e o Neo Heliopan E1000 tiveram no óleo um promissor adjuvante, que segundo os resultados observados na literatura, confere uma proteção às condições adversas do ambiente para formulações de bioinseticidas (ALVES et al., 1998; ALVES et al., 2002; SILVA et al., 2006), mantendo a integridade dos fotoprotetores e possivelmente o incremento da germinação dos conídios.

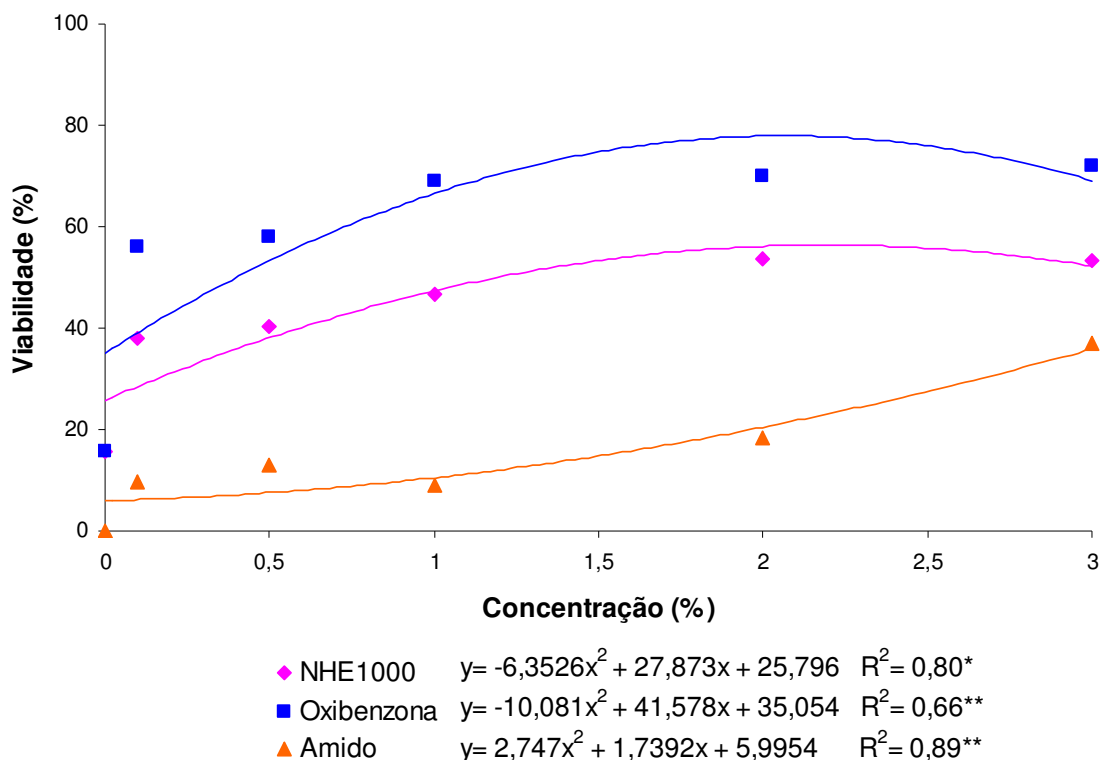


Figura 4. Viabilidade do isolado LCB63 de *Beauveria bassiana* após exposição à radiação ultravioleta sob ação de diferentes concentrações de fotoprotetores.

No bioensaio para verificar a mortalidade de ninfas de *D. opuntiae* quando pulverizadas com diferentes formulações à base de Oxibenzona e do isolado LCB63 de *B. bassiana*, houve diferença significativa ($F = 7,416$; $p = 0,008$) na mortalidade em todos os tratamentos (Figura 5). Nenhum bioensaio preliminar foi realizado para avaliar o efeito da associação de surfactantes sobre ninfas de *D. opuntiae*. A acentuada

mortalidade verificada no controle pode estar relacionada a um possível efeito inseticida dos surfactantes. O tratamento indicado como formulação II, contendo Oxibenzona e o isolado LCB63 de *B. bassiana* resultou em 72,2% de mortalidade e os demais tratamentos como o controle, óleo, Oxibenzona e a formulação I representada por fungo + óleo, apresentaram mortalidade de 42,47%, 27,84%, 41,89% e 49,87%, respectivamente.

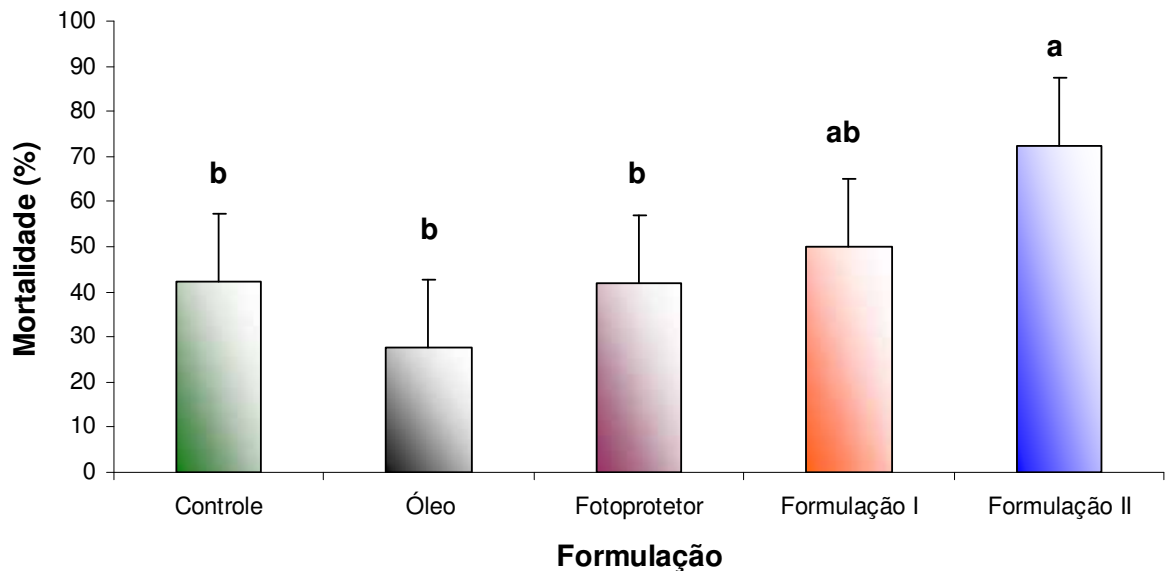


Figura 5. Mortalidade de ninfas de *Dactylopius opuntiae* após pulverização com formulações contendo fotoprotetor Oxibenzona e isolado LCB63 de *Beauveria bassiana*. Controle: solução dos surfactantes; Óleo: solução dos surfactantes + óleo (1%); Fotoprotetor: solução dos surfactantes + óleo (1%) + fotoprotetor (0,1%); Formulação I: solução dos surfactantes + óleo (1%) + 10^8 conídios mL^{-1} do isolado LCB63; Formulação II: solução dos surfactantes + óleo (1%) + 10^8 conídios mL^{-1} do isolado LCB63 + fotoprotetor (0,1%).

Pelos resultados observa-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos onde não havia o fungo. A presença do isolado LCB63, associado aos dois

tratamentos indicados como formulação I e formulação II foi o fator que determinou a eficácia. Isso indica que os produtos utilizados como veículo e adjuvantes do fungo não tiveram impacto negativo sobre os conídios e ainda contribuíram para a mortalidade das ninfas de *D. opuntiae*. Em trabalhos conduzidos por VAIL et al. (1996) e REDDY et al. (2008) resultados similares foram obtidos quanto ao uso de Tinopal associado a baculovírus para controle de *Anagrafa falcifera* (Lepidoptera: Noctuidae) e deste mesmo fotoprotetor associado a *B. bassiana* para o controle de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), quando estes insetos foram alimentados com dieta contendo o fotoprotetor. Estes autores observaram que a possível perda da integridade da membrana do intestino devido a Tinopal provoque distúrbios digestivos nos insetos, tornando-os mais susceptíveis à infecção por baculovírus ou *B. bassiana*.

No presente trabalho, os efeitos provocados pelos surfactantes, óleo e fotoprotetores pode ter contribuído para uma maior uniformidade da dispersão, adesão, proteção dos conídios e, além disso, alguma anomalia aos insetos, favorecendo a infecção pelo fungo, apresentando-se como bons adjuvantes a serem adicionados a formulações de *B. bassiana*.

4. CONCLUSÕES

1. Neo Heliopan E1000, Neo Heliopan AV e Oxibenzona não apresentam efeito deletério sobre a germinação de conídios do isolado LCB63 de *B. bassiana*.
2. Os fotoprotetores lipossolúveis foram os mais promissores na proteção dos conídios do isolado LCB63 de *B. bassiana* à radiação solar e radiação ultravioleta em fluxo laminar.
3. A formulação à base de isolado LCB63 de *B. bassiana*, óleo de milho, Oxibenzona e surfactantes Unitol L/20 e Ultranax NP/100 é eficiente em promover a mortalidade de ninfas de *D. opuntiae*.

5. REFERÊNCIAS

ALVES, R. T.; BATEMAN, R. P.; PRIOR, C.; LEATHER, S. R. Effects of simulated solar radiation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* in different formulations. **Crop Protection**, Kidlington. v. 17, n. 8, p. 675-679, 1998.

ALVES, R. T.; BATEMAN, R. P.; GUNN, J.; PRIOR, C.; LEATHER, S. R. Effects of different formulations on viability and medium-term storage of *Metarhizium anisopliae* conidia. **Neotropical Entomology**, Piracicaba, v. 31, n. 1, p. 91-99, 2002.

BATISTA FILHO, A.; ALVES, S. B.; ALVES, L. S. A.; PEREIRA, R. M.; AUGUSTO, N. T. Formulação de entomopatógenos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 31, p. 917-965.

BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; MILLER, C.D.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 61 °N to 54 °S. **Journal of Invertebrate Pathology**, Orlando, v. 78, p. 98–108, 2001.

BRITO, E. S.; MENEZES, M. E. L. ; ERLO, R.; MOTA, E. F.; GAVA, C. A. T.; SAMUELS, R. I. Avaliação do desempenho de fungos entomopatogênicos sobre fêmeas de *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera: Dactylopiidae) em condições de laboratório. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA - Ciência, tecnologia e inovação. 22., 2008, Uberlândia. **Anais...** Viçosa, MG: UFV, 2008. 1 CD-ROM.

CHELICO, L.; KHACHATOURIANS, G. G. Isolation and characterization of nucleotide excision repair deficient mutants of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Orlando, v. 98, p. 93–100, 2007.

CHELICO, L.; HAUGHIAN, J.L.; KHACHATOURIANS, G.G. Nucleotide excision repair and photoreactivation in the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Beauveria nivea*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces farinosus* and *Verticillium lecanii*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 100, p. 964–972, 2006.

CHELICO, L.; HAUGHIAN, J.L.; WOYTOWICH, A. E.; KHACHATOURIANS, G.G. Quantification of ultraviolet-C irradiation induced cyclobutane pyrimidine dimers and their removal in *Beauveria bassiana* conidiospore DNA. **Mycologia**, New York, v. 97, n. 3, p. 621–627, 2005.

EDGINGTON, S.; SEGURA, H.; LA ROSA, W. WILLIAMS, T. Photoprotection of *Beauveria bassiana*: Testing simple formulations for control of the coffee berry borer. **International Journal of Pest Management**, London, v. 46, n. 3, p. 169-176, 2000.

EMBRAPA SEMI-ÁRIDO. **Pesquisa desenvolve tecnologias para o controle da cochonilha-do-carmim.** 2008. Disponível em: <<http://www.cpatsa.embrapa.br/noticias/noticia147.php>> Acesso em: 15 mar. 2009.

FERNANDES, E. K. K.; RANGEL, D. E. N.; MORAES, A. M. L.; BITTENCOURT, V. R.E.P.; ROBERT, D. W. Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria spp.* Isolates. **Journal of Invertebrate Pathology**, Orlando, v. 96, n. 3, p. 237-243, 2007.

FRANCISCO, E. A.; MOCHI, D. A.; CORREIA, A. do C. B.; MONTEIRO, A. C. Influence of culture media in viability test of conidia of entomopathogenic fungi. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, p.1309-1312, 2006.

GALENA: **Informe científico.** 2007. Disponível em: <<http://www.http://www.galena.com.br/>>. Acesso em: 8 dez. 2008.

HILL, T.; LEWICKI, P. **Statistics**: Methods and applications. Tulsa: StatSoft, 2006. 813p.

LELAND, J. E.; MCGUIRE, M. R.; GRACE, J. A.; JARONSKI, S. T.; ULLOA, M.; PARK, Y.; PLATTNER, R. D. Strain selection of a fungal entomopathogen, *Beauveria bassiana*, for control of plant bugs (*Lygus* spp.) (Heteroptera: Miridae). **Biological Control**, Orlando, v. 35, p. 104–114, 2005.

LOPES, E. B.; BRITO, C. H. de; ALBUQUERQUE, I. C. de; BATISTA, J. de L. Desempenho do óleo de laranja no controle da cochonilha-do-carmim em palma gigante. **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v. 6, n. 1, p. 252-258, 2009.

MORTUZA, M. G.; ILAG, L. L. Potential for biocontrol of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Giff & Maubl. in banana fruits by *Trichoderma* species. **Biological Control**, Orlando, v. 15, p. 235 - 240, 1999.

RANGEL, D. E. N.; BRAGA, G. U. L.; FLINT, S. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on insects and artificial substrates. **Journal of Invertebrate Pathology**, Orlando, v. 87, p. 77–83, 2004.

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

RANGEL, D. E. N.; ANDERSON, ANNE J.; ROBERTS, D. W. Evaluating physical and nutritional stress during mycelial growth as inducers of tolerance to heat and UV-B radiation in *Metarhizium anisopliae* conidia. **Mycological Research**, Cambridge, v. 112, n. 11, p. 1362-1372, 2008.

RANGEL, D.E.N.; BRAGA, G. U.L.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Influence of growth environment on tolerance to UV-B radiation, germination speed, and morphology of *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* conidia. **Journal of Invertebrate Pathology**, Orlando, v. 90, n. 1, p. 55-58, 2005.

REDDY, N. P.; KHAN, P. A. A.; DEVI, K. U.; VICTOR, J. S.; SHARMA, H. C. Assessment of the suitability of Tinopal as an enhancing adjuvant in formulations of the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. **Pest Management Science**, New York, v. 64, p. 909–915, 2008.

REIS, R. C. S.; MELO, D. R. de; PERINOTTO, W. M. de S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Patogenicidade *in vitro* de formulações fúngicas sobre ninfas e adultos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 14, n. 3, p. 101-105, 2005.

SILVA, R. Z. da; NEVES, P. M. O. J.; SANTORO, P. H.; CAVAGUCHI, S. A. Efeito de agroquímicos à base de óleo mineral e vegetal sobre a viabilidade dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Paecilomyces* sp. Bainier. **BioAssay**, Piracicaba, v. 1, n. 1, p. 1-5, 2006.

SHAH, P. A.; DOUROKAPINDOU, O. K.; SEDIBE, A.; DAFFÉ, C. O.; VAN DER PAUWW, H.; LOMMER, C. J. Effects of sunscreen oxybenzone of field efficacy and persistence of *Metarhizium flavoviridae* conidia against *Kraussula amabile* (Orthoptera: Acrididae): in Mali, west Africa. **Biocontrol Science and Technology**. v. 8, n. 3. p. 357-364, 1998.

VAIL, P. V.; HOFFMANN, D. F.; TEBBETS, J. S. Effects of a fluorescent brightener on the activity of *Anagrapha falcifera* (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus to four noctuid pests. **Biological Control**, Orlando, v. 7, p. 121–125, 1996.