

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO MASSAL E FORMULAÇÃO
DE *Bipolaris euphorbiae* VISANDO A OBTENÇÃO DE UM
BIOHERBICIDA**

Ana Carolina Ribeiro Machado
Bióloga

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO MASSAL E FORMULAÇÃO
DE *Bipolaris euphorbiae* VISANDO A OBTENÇÃO DE UM
BIOHERBICIDA

Ana Carolina Ribeiro Machado

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Monteiro

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

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

2013

M149o Machado, Ana Carolina Ribeiro
Otimização da produção massal e formulação de *Bipolaris euphorbiae* visando a obtenção de um bioherbicida / Ana Carolina Ribeiro Machado. — — Jaboticabal, 2013
ix, 70 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
Orientador: Antonio Carlos Monteiro
Banca examinadora: Kátia de Lima Nechet, Kátia Cristina Kupper, Rita de Cássia Panizzi, Sandra Regina Ceccato Antonini
Bibliografia

1. Produção massal. 2. Compatibilidade. 3. Armazenamento. 4. Infectividade. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.937

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO MASSAL E FORMULAÇÃO DE *Bipolaris euphorbiae* VISANDO A OBTENÇÃO DE UM BIOHERBICIDA

AUTORA: ANA CAROLINA RIBEIRO MACHADO

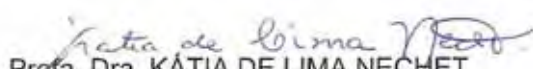
ORIENTADOR: Prof. Dr. ANTONIO CARLOS MONTEIRO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:



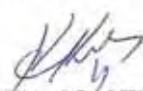
Prof. Dr. ANTONIO CARLOS MONTEIRO

Departamento de Produção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



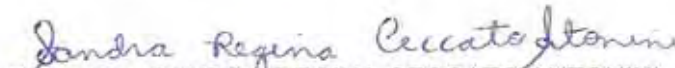
Profa. Dra. KÁTIA DE LIMA NECHET

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / Jaguariuna/SP



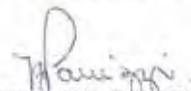
Profa. Dra. KATIA CRISTINA KUPPER

Instituto Agrônomo de Campinas / Cordeiropolis/SP



Profa. Dra. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI

Universidade Federal de São Carlos / Araras/SP



Profa. Dra. RITA DE CASSIA PANIZZI

Departamento de Fitossanidade / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 24 de janeiro de 2013.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

ANA CAROLINA RIBEIRO MACHADO - Nasceu em 21 de abril de 1981, na cidade de Goiânia, Goiás e formou-se em Biologia (licenciatura plena) pela Universidade Estadual de Goiás (UEG) em 2004. Em 2006 concluiu o Curso de Especialização (*lato sensu*) em Microbiologia pelo Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás. No mesmo ano ingressou no Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) / Unesp - Jaboticabal, recebendo o título de mestre em 2008. Ingressou no Curso de Doutorado do mesmo programa, em 2008. Publicou e apresentou 25 trabalhos em anais de congressos e simpósios científicos e 04 artigos completos em periódicos especializados. Ministrou aulas das disciplinas de Microbiologia Geral e Microbiologia Ambiental do curso de graduação em Ciências Biológicas da FCAV/Unesp e da disciplina Biologia, Produção e Utilização de Microrganismos Patógenos de Insetos do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária, como professora convidada.

Não sei se a vida é curta ou longa para nós, mas sei que nada do que vivemos tem sentido, se não tocarmos o coração das pessoas.

Muitas vezes basta ser: colo que acolhe, braço que envolve, palavra que conforta, silêncio que respeita, alegria que contagia, olhar que acaricia, amor que promove.

E isso é o que dá sentido à vida, é o que faz com que ela não seja nem curta, nem longa demais, mas que seja intensa, verdadeira, pura enquanto durar.

Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.

Cora Coralina

Ao meu orientador, **Prof. Monteiro**, que encerra um ciclo de dedicação à pesquisa e formação de novos profissionais

AGRADEÇO EM ESPECIAL

À minha base... meus pais **José de Roma e Fátima**

Ao meu marido, amigo e companheiro **Edson Júnior**

OFEREÇO

Ao pequeno **Samuel**, meu maior e mais bonito projeto de vida, que me faz desde já a pessoa mais feliz e realizada desse mundo

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me proporcionado encontros tão especiais e pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional ;

Ao meu mentor e amigos espirituais pelo amparo, suporte e vibrações positivas;

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Monteiro pela confiança, paciência, amizade, por ser um exemplo a ser seguido de profissional íntegro e dedicado;

À Prof^a Dr^a Sandra Regina Ceccato Antonini e Dr^a Kátia de Lima Nechet pela atenção e carinho que tiveram com o trabalho e considerações valiosas;

À Prof^a Dr^a Rita de Cassia Panizzi e Dr^a Kátia Cristina Kupper por mais uma vez colaborarem com suas sugestões para a melhoria do trabalho;

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Programa de pós-graduação em Microbiologia Agropecuária, pelo apoio e concessão da bolsa de doutorado;

Ao Dr. Claudinei Cruz e a toda equipe do NEPEAM pela valiosa colaboração na fase final do trabalho;

Às amigas especiais e que ao longo desses 4 anos tomaram rumos incríveis: Luciana Yoshida, Dinalva Alves Mochi e Claudia de Sousa Demétrio;

À querida Edna D'Áquila, sempre tão amável e disposta a ajudar;

Aos meus pais incríveis pelo amor incondicional, por terem me guiado e orientado sempre pelo caminho do bem... enfim, por tudo o que sou hoje;

Ao meu grande amor, maior e melhor amigo, Edson Júnior, pelo incentivo, apoio... por simplesmente fazer parte da minha vida e ter sido a razão de toda essa história ter começado;

À família maravilhosa que me recebeu de braços abertos e que hoje faço parte com tanto orgulho: Cris, Ed, Paula, Fernanda, Ricardo, Melissa e Joaquim;

À minha família de “sangue” (irmão, tios (as), primas) pelo amor, torcida e por dividirem comigo mais essa conquista;

À amiga-irmã Jô Guedes pelo carinho e dedicação a mim e aos meus pais;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, seja cientificamente ou não... MUITÍSSIMO OBRIGADA!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURA E TABELAS	iii
RESUMO	vi
ABSTRACT.....	viii
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
3. REFERÊNCIAS.....	8
CAPÍTULO 2 - PADRONIZAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE PRÉ-ETAPAS PARA FORMULAÇÃO DE BIOHERBICIDA À BASE DE <i>Bipolaris euphorbiae</i>.....	15
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. MATERIAL E MÉTODOS	19
2.1. Fungo.....	19
2.2. Influência do período de incubação na produção de <i>Bipolaris euphorbiae</i>	19
2.2.1. Cultivo em meio sólido.....	19
2.2.2. Cultivo em sistema bifásico.....	20
2.2.3. Avaliação.....	20
2.3. Influência do volume de suspensão de <i>Bipolaris euphorbiae</i> para produção em sistema bifásico.....	21
2.4. Secagem de conídios de <i>Bipolaris euphorbiae</i>	21
2.5. Obtenção de conídios de <i>Bipolaris euphorbiae</i>	23
2.6. Análise estatística.....	23
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
3.1. Influência do período de incubação na produção de <i>Bipolaris euphorbiae</i>	24
3.2. Influência do volume de suspensão de <i>Bipolaris euphorbiae</i> usada na fase sólida do sistema bifásico.....	26

3.3. Secagem de conídios de <i>Bipolaris euphorbiae</i>	27
3.4. Obtenção de conídios de <i>Bipolaris euphorbiae</i>	30
4. CONCLUSÕES.....	31
5. REFERÊNCIAS.....	31
CAPÍTULO 3 - PERFIL DE TOXICIDADE DE ADJUVANTES AO FUNGO <i>Bipolaris euphorbiae</i> E AVALIAÇÃO DE SUA VIABILIDADE E INFECTIVIDADE APÓS FORMULADO	35
RESUMO	35
ABSTRACT	37
1. INTRODUÇÃO	39
2. MATERIAL E MÉTODOS	40
2.1. Toxicidade dos adjuvantes ao <i>Bipolaris euphorbiae</i>	40
2.2. Composição da formulação à base de <i>Bipolaris euphorbiae</i>	44
2.3. Avaliação da viabilidade de <i>Bipolaris euphorbiae</i> durante o armazenamento da formulação.....	44
2.4. Avaliação da infectividade <i>Bipolaris euphorbiae</i> em <i>Euphorbia heterophylla</i> após formulação.....	45
2.5. Análise estatística.....	46
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
3.1. Toxicidade dos fotoprotetores ao <i>Bipolaris euphorbiae</i>	46
3.2. Toxicidade dos surfactantes ao <i>Bipolaris euphorbiae</i>	50
3.3. Toxicidade dos antiumectantes ao <i>Bipolaris euphorbiae</i>	53
3.4. Toxicidade dos espalhantes adesivos ao <i>Bipolaris euphorbiae</i>	56
3.5. Avaliação da viabilidade de <i>Bipolaris euphorbiae</i> durante o armazenamento da formulação.....	59
3.6. Avaliação da infectividade de <i>Bipolaris euphorbiae</i> em <i>Euphorbia heterophylla</i> após formulação.....	61
4. CONCLUSÕES.....	63
5. REFERÊNCIAS.....	64
CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	70

LISTA DE FIGURA E TABELAS

	Página
 CAPÍTULO 2	
Figura 1. Equipamento de fluxo contínuo de ar usado para secagem do material contendo o fungo.....	22
Tabela 1. Esporulação e viabilidade de conídios de <i>Bipolaris euphorbiae</i> produzidos pelo método convencional de cultivo em meio sólido e submetido a diferentes períodos de incubação.....	24
Tabela 2. Esporulação e viabilidade de conídios de <i>Bipolaris euphorbiae</i> produzidos no meio líquido e no meio sólido do sistema bifásico, em diferentes períodos de incubação.....	26
Tabela 3. Esporulação e viabilidade de conídios de <i>Bipolaris euphorbiae</i> no meio sólido do sistema bifásico, inoculado com diferentes volumes de suspensão fúngica obtida a partir do cultivo em meio líquido, após 7 dias de incubação.....	27
Tabela 4. Desdobramento da interação métodos de secagem <i>versus</i> situações de avaliação, significativa para a viabilidade de conídios de <i>Bipolaris euphorbiae</i>	28
Tabela 5. Umidade perdida pelo material resultante do cultivo do fungo em meio sólido, após o emprego de diferentes métodos de secagem.....	29
Tabela 6. Desdobramento da interação métodos de obtenção <i>versus</i> situações de avaliação, significativa para a viabilidade de conídios de <i>Bipolaris euphorbiae</i>	30
 CAPÍTULO 3	
Tabela 1. Adjuvantes químicos avaliados quanto à compatibilidade com <i>Bipolaris euphorbiae</i> , para compor uma formulação à base do fungo.....	43

Tabela 2.	Toxicidade dos fotoprotetores NeoHeliopan Hydro [®] , NeoHeliopan AV [®] e NeoHeliopan E1000 [®] para <i>Bipolaris euphorbiae</i> cultivado em meio de cultura contendo diversas concentrações dos produtos.....	47
Tabela 3.	Toxicidade dos fotoprotetores Tinosorb M [®] , Complexo de filtros UVA/UVB e Eusolex 232 [®] e Eusolex 6007 [®] para <i>Bipolaris euphorbiae</i> cultivado em meio de cultura contendo diversas concentrações dos produtos.....	48
Tabela 4.	Toxicidade dos surfactantes Unitol L 20 [®] , Ultranex NP 95 [®] e Tween 80 [®] para <i>Bipolaris euphorbiae</i> cultivado em meio de cultura contendo diversas concentrações dos produtos.....	51
Tabela 5.	Toxicidade dos surfactantes Triton X-100 [®] e Ultrol IT 80 [®] para <i>Bipolaris euphorbiae</i> cultivado em meio de cultura contendo diversas concentrações dos produtos.....	52
Tabela 6.	Toxicidade dos antiumectantes carbonato de cálcio, talco e carbonato de sódio anidro para <i>Bipolaris euphorbiae</i> cultivado em meio de cultura contendo diversas concentrações dos produtos.....	54
Tabela 7.	Toxicidade dos antiumectantes óxido de magnésio, celulose microcristalina e dióxido de silício para <i>Bipolaris euphorbiae</i> cultivado em meio de cultura contendo diversas concentrações dos produtos.....	55
Tabela 8.	Toxicidade dos espalhantes adesivos DuFol [®] , Agral [®] e Energic [®] para <i>Bipolaris euphorbiae</i> cultivado em meio de cultura contendo diversas concentrações dos produtos.....	57
Tabela 9.	Toxicidade do espalhante adesivo Haiten [®] e do agente adesivo PVP K-30 [®] para <i>Bipolaris euphorbiae</i> cultivado em meio de cultura contendo diversas concentrações dos produtos.....	58
Tabela 10.	Desdobramento da interação condições de armazenamento versus período de avaliação, significativa para a viabilidade de conídios de <i>Bipolaris euphorbiae</i>	59

Tabela 11. Sintomas de infecção de *Euphorbia heterophylla* causados pela pulverização com a formulação de *Bipolaris euphorbiae*...

62

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO MASSAL E FORMULAÇÃO DE *Bipolaris euphorbiae* VISANDO A OBTENÇÃO DE UM BIOHERBICIDA

RESUMO - O uso de bioprodutos como estratégia de controle de plantas daninhas, pode apresentar várias limitações, principalmente quanto à produção massal e formas de conservação do produto, sendo fundamental o desenvolvimento de formulações adequadas e eficientes contra a planta alvo. O fungo *Bipolaris euphorbiae* é considerado um potencial bioagente para o controle de *Euphorbia heterophylla*, uma das plantas daninhas mais importantes da soja. O presente trabalho teve por objetivos: 1) otimizar a produção do fungo, em meio sólido e em cultivo bifásico, determinando o período adequado de incubação; 2) determinar a toxicidade de adjuvantes ao fungo e selecionar produtos para compor a formulação; 3) avaliar a viabilidade da formulação armazenada, ao longo do tempo, sob temperatura ambiente e refrigeração e 4) avaliar a infectividade do fungo em *E. heterophylla*, após formulado. Para otimizar a produção do fungo, investigou-se a influência do período de incubação e a quantidade de inóculo no cultivo bifásico. A secagem dos conídios foi realizada em estufa sob várias temperaturas, fluxo laminar, fluxo contínuo de ar e câmara asséptica em temperatura ambiente. Conídios secos foram obtidos por peneiramento e utilizando moinho de bola, de martelo e moedor de grãos. Em todos os ensaios avaliou-se a viabilidade dos conídios e também a esporulação no meio sólido e sistema bifásico. Em seguida, analisou-se a compatibilidade do fungo com 7 fotoprotetores, 5 surfactantes, 6 antiumectantes e 5 espalhantes adesivos, usados nas concentrações de 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 e 1%. Os parâmetros avaliados foram: germinação, crescimento vegetativo e esporulação, e com base neles foi feita a classificação toxicológica dos produtos. O cultivo do fungo em meio sólido, pelo período de 10 dias, proporcionou a melhor relação “esporulação com alta viabilidade *versus* tempo”, produzindo $8,3 \times 10^7$ conídios g^{-1} substrato. No cultivo bifásico, a incubação por 7 dias proporcionou os maiores valores numéricos para esporulação em ambas as fases (meio líquido e meio sólido), totalizando 14 dias para produção, com rendimento final de $3,7 \times 10^7$ con. g^{-1} substrato. A quantidade de inóculo líquido não foi um fator determinante para

aumentar a esporulação do fungo no meio sólido deste método de cultivo. A secagem do material (substrato + fungo) em estufa a 55 e 60°C proporcionou significativa redução na germinação dos conídios, enquanto que o fluxo contínuo de ar, em temperatura ambiente, manteve a integridade das partículas e permitiu maior perda de água do material. A obtenção seca dos conídios por meio de moagens causou severos danos à integridade dos conídios, especialmente o moinho de bola. O peneiramento foi o método mais apropriado, permitindo extrair conídios com alta viabilidade. Dentre os adjuvantes testados para compor a formulação foram selecionados o fotoprotetor Tinosorb M[®] a 1%, o surfactante Tween 80[®] a 0,1%, o antiumectante dióxido de silício a 1%, o espalhante adesivo Haiten[®] a 0,01% e o polímero adesivo PVP K-30[®] a 0,1%. Para compor a formulação, o antiumectante foi adicionado ao pó de conídios, sendo que esta mistura foi armazenada e permaneceu viável (94,9% de germinação) após 245 dias sob refrigeração. Em temperatura ambiente houve uma redução de 64% na viabilidade dos conídios armazenados, entre a primeira e última avaliação. Sintomas típicos de infecção causados pelo fungo, como clorose, necrose foliar e murchamento e redução de 18% na altura do caule, comprando-se com o tratamento controle, foram observados. A formulação foi capaz de manter a infectividade do fungo para *E. heterophylla* e pode representar um passo importante visando obter um bioproduto à base de *B. euphorbiae*.

Palavras-chave: Produção massal, secagem, extração, compatibilidade, armazenamento, infectividade.

OPTIMIZATION OF MASS PRODUCTION AND FORMULATION OF *Bipolaris euphorbiae* AIMING TO OBTAIN A BIOHERBICIDE

ABSTRACT - The use of bioproducts as a tactic to weed control has several limitations especially with regard to mass production and product forms of conservation, being fundamental to develop suitable and effective formulations against the target plant. The fungus *Bipolaris euphorbiae* is considered a potential bioagent to control *Euphorbia heterophylla*, one of the most important weeds in soybeans. The present study aimed to 1) optimize the production of the fungus, in solid and biphasic cultivation, determining the appropriate period of incubation, 2) verify the fungus toxicity of adjuvants and select products to compound the formulation, 3) evaluate the viability of the formulation stored, over time, at room temperature and under refrigeration and 4) evaluate the infectivity of the fungus in *E. heterophylla* after formulated. To optimize the production of the fungus, it was investigated the influence of incubation period and the amount of inoculum in the biphasic system. The drying of conidia was performed in a oven under varying temperatures, laminar flow, continuous flow of air and aseptic chamber at room temperature. Conidia drying were performed in oven under varying temperatures, flow laminar, continuous air flow and aseptic chamber in room temperature. Dried conidia were obtained through sieving and using ball mill, hammer mill and grain. It was evaluated the conidia viability and the sporulation on solid medium and biphasic system. Next, it was analyzed the compatibility of the fungus with sunscreens (7), surfactants (5), anti-humectants (6) and spreaders-stickers (5), used at 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 and 1%. The evaluated parameters were germination, vegetative growth and sporulation and toxicological classification was determined. The best relation "sporulation versus cultivation" in the solid medium was obtained after 10 days of incubation, earning 8.3×10^7 conidia g^{-1} substrate. In biphasic system, the incubation for 7 days provided the highest numerical values for sporulation in both phases (liquid and solid medium), totaling 14 days for production, with yield of 3.7×10^7 con. g^{-1} substrate. The amount of liquid inoculum used in this system was not important for increasing the production. The drying of material in a oven at 55 and 60°C provided a

significant reduction in conidial germination, while the continuous flow of air, at room temperature, maintained the conidia viability allowing more loss of humidity. Obtaining conidia by grinding caused damage to the integrity of conidia, especially the ball mill. The sieving provided to obtain pure conidia with high viability. Among the adjuvants tested it was selected the sunscreen Tinosorb M[®] (1%), the surfactant Tween 80[®] (0,1%), the anti-humectant silicon dioxide (1%), the spreader-sticker Haiten[®] (0,01%) and the polymer adhesive PVP K-30[®] (0,1%). To compose the formulation, anti-humectant agent was added to the powder of conidia, and this mixture was stored and remained viable (94.9% germination) after 245 days under 4°C. At room temperature, there was a 64% reduction in the viability of conidia stored between the first and last evaluation. Typical symptoms of infection occasioned by the fungus were observed, as chlorosis, leaf necrosis and wilting and 18% reduction in stem height, comparing with the control treatment. The formulation was able to maintain the fungus infectivity for *E. heterophylla* and may represent an important step to obtain a bioproduct based on *B. euphorbiae*.

Keywords: Mass production, drying, extraction, compatibility, storage, infectivity

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

As plantas daninhas são responsáveis por inúmeros impactos negativos em ecossistemas terrestres e aquáticos e constituem um fator limitante cada vez mais significativo para a produção agrícola (BARRETO, 2009). Interferências diretas e indiretas nas atividades agropecuárias podem ser atribuídas à presença de tais plantas, entre as quais se destacam a competição por recursos como água, luz, nutrientes minerais e espaço que afetam o crescimento, o desenvolvimento e a produtividade da cultura, a depreciação da qualidade do produto colhido, a intoxicação de animais domésticos, além de atuarem como hospedeiras alternativas de pragas e nematóides. (PITELLI, 1987; AMARAL, 2006).

Em razão das interferências mencionadas, o controle de plantas daninhas assume importante papel no manejo de inúmeras culturas. As estratégias de controle, por meios preventivos, mecânicos, químicos ou biológicos, devem estar inseridas em um sistema de manejo integrado, de modo a interferir negativamente no estabelecimento e competição destas plantas (BRACCINI, 2011). O uso de herbicidas químicos representa a principal ferramenta de controle em função da grande oferta de produtos, economia de mão-de-obra e rapidez da operação (BURNSIDE, 1992; INOUE e OLIVEIRA Jr, 2011).

No entanto, o uso constante de determinado herbicida ou de produtos com o mesmo mecanismo de ação exerce alta pressão seletiva, que aumenta o número de indivíduos tolerantes e a manifestação de biótipos resistentes dificultando assim o controle (PONCHIO, 1997; INOUE e OLIVEIRA Jr, 2011). Além disso, há problemas de ordem ambiental associados à intensa utilização de herbicidas químicos.

A resistência de plantas daninhas a tais produtos pode ser considerada um aspecto que vem incentivando pesquisas, durante a última década, para o desenvolvimento de bioherbicidas como método alternativo de controle.

A utilização de bioherbicidas teve um início promissor no Brasil, com a implementação, na década de 80, de um programa pioneiro de controle biológico utilizando-se o fungo *Bipolaris euphorbiae* Muchovej e Carvalho 1989 para o controle

de *Euphorbia heterophylla* L., uma importante planta daninha que afeta negativamente a soja e outras culturas (BARRETO e EVANS, 1998; NECHET; BARRETO; MIZUBUTI, 2006; BARRETO, 2009). Por se tratar de um patógeno específico, de grande agressividade, fácil multiplicação e boa esporulação, *B. euphorbiae* é considerado um potencial candidato para o controle biológico desta planta daninha que vem apresentando populações resistentes a herbicidas inibidores de enzima acetolactato sintase (ALS).

No entanto, para viabilizar o uso de *B. euphorbiae* em programas de manejo integrado de *E. heterophylla* é necessário desenvolver métodos de produção do fungo em grande quantidade e uma formulação que permita obter um bioproduto.

O desenvolvimento de uma nova e eficaz formulação microbiana não significa uma simples mistura de inertes a determinado ingrediente ativo. Aspectos como o tipo e características do ingrediente ativo, características do sistema produtivo (condições de cultivo, sistema de secagem e obtenção do ingrediente ativo), a compatibilidade dos componentes da formulação com o patógeno e a estabilidade deste durante o armazenamento, são imprescindíveis para viabilizar o uso de bioprodutos em campo (MORANDI e BETTIOL, 2009). A produção massal do bioagente de controle e principalmente a obtenção de formulações adequadas, são os maiores desafios no desenvolvimento de bioprodutos (CONSOLO; SALERNO; BERON, 2003; ALMEIDA; ROCHA; BATISTA FILHO, 2007; ELZEIN; KROSCHER; CADISCH, 2008).

O presente trabalho teve por objetivos otimizar a produção de *B. euphorbiae* pelos métodos bifásico e convencional em meio sólido, determinar as pré-etapas de formulação do fungo por meio da avaliação de métodos de secagem e obtenção de conídios, estabelecer o perfil de toxicidade de diversos adjuvantes ao fungo e avaliar a manutenção da estabilidade do fungo associado aos componentes da formulação durante o armazenamento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Euphorbia heterophylla L. (Euphorbiaceae), popularmente conhecida como amendoim-bravo ou leiteiro, dentre outras denominações, é frequentemente

encontrada como invasora de culturas economicamente importantes como milho, cana-de-açúcar, feijão e soja e ocupa a quarta posição de frequência e ocorrência em todas as culturas brasileiras (VICENTINI; PENHA; FONSECA, 2010).

É uma das espécies mais preocupantes devido aos impactos econômicos na agricultura, especialmente na cultura da soja em que, atualmente, o Brasil é o 2º maior produtor mundial. O complexo agroindustrial da soja no país é de grande importância já que tem aproximadamente 7% de participação no produto interno bruto (PIB) e cerca de 30% de participação no PIB agrícola (CONAB, 2011).

O amendoim-bravo possui um crescimento muito rápido e pode formar uma densa cobertura sobre as plantas cultivadas, estabelecendo assim uma competição por luz e nutrientes do solo, sobretudo no estágio de florescimento em que a soja tem maior requisito nutricional (WILSON, 1981; NECHET; BARRETO; MIZUBUTI, 2006; BIANCO; PITELLI; CARVALHO, 2007). As sementes germinam durante quase todo o ano, havendo períodos de maior intensidade no verão (BRINGHENTI e OLIVEIRA, 2011; VOLL et al., 2005). Pode ainda interferir na eficiência da colheita e na qualidade da soja colhida, causando a fixação de impurezas, devido ao látex produzido e aumento no teor de umidade do grão, bem como a quantidade de contaminantes (WILLARD e GRIFFIN, 1993). Além disso, *E. heterophylla* é um ótimo alimento para o percevejo-marrom-da-soja *Euschistus heros*, uma das pragas mais agressivas desta cultura, alimentando-se das duas espécies vegetais quando ocorrem simultaneamente (PINTO e PANIZZI, 1994), além de poder atuar como reservatório do fungo *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* causador do cancro da haste da soja (GARRIDO e DHINGRA, 1997).

A dificuldade de controle de *E. heterophylla* é um dos aspectos que preocupam os sojicultores, além do fato de que herbicidas eficazes têm alto custo e necessitando de mais de uma aplicação durante a safra (BARBOSA et al., 2002). Os herbicidas químicos inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS) são um dos mais importantes grupos atualmente comercializados (OLIVEIRA Jr, 2011) e constituem a principal ferramenta para controle de *E. heterophylla* (VIDAL e MEROTTO Jr, 2001). As imidazolinonas, sulfoniluréias, sulfonanilidas e triazolopirimidinas são os principais grupos químicos que inibem a ALS, enzima responsável pela catalase de uma das reações iniciais da via metabólica de

produção dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina (GAZZIERO et al., 1998; VIDAL e MEROTTO Jr, 1999; CHRISTOFFOLETI; KEHDI; CORTEZ, 2001; OLIVEIRA Jr, 2011).

Dentre a vasta gama de herbicidas disponíveis no mercado, o grupo B (inibidores da ALS) é o que apresenta o maior numero de casos de resistência documentados (TRANEL e WRIGHT, 2002). Segundo esses autores, alguns aspectos levaram a essa situação, tais como a) o uso repetitivo na agricultura, em função do amplo espectro de recomendações às mais diversas culturas; b) a alta eficiência de controle, acarretando na produção de sementes apenas dos biótipos resistentes; c) o prolongado efeito residual no solo, aumentando a pressão seletiva para biótipos resistentes e d) a alta frequência inicial de biótipos resistentes em função de características genéticas. Em relação a este último aspecto, Vargas, Borén e Silva (2001) determinaram que, em *E. heterophylla*, a resistência a herbicidas do grupo B é codificada por um gene dominante nuclear com dominância completa. Quando a resistência depende de um único gene (monogênica) a possibilidade de desenvolvimento de biótipos resistentes é maior e mais rápida que a dependente de mais de um gene (poligênica). Além disso, para a planta daninha em questão, foram identificados biótipos com resistência múltipla a inibidores da ALS e da PROTOX (TREZZI et al., 2005) e ao glifosato (VIDAL et al., 2007).

Este contexto representa, portanto, uma oportunidade para a busca de estratégias alternativas de controle desta planta daninha, sendo o controle biológico um dos mais discutidos e com potencial de utilização. O objetivo desta estratégia não é a erradicação de populações de espécies invasoras que ocorrem em determinadas áreas, mas sim a redução de sua densidade populacional a níveis aceitáveis ou subeconômicos (BARRETO, 2009). O termo bioherbicida se refere ao uso de patógenos como agentes de controle de plantas daninhas, geralmente aplicados por meio da estratégia inundativa, cujo objetivo é criar uma rápida epidemia da doença e levar as plantas à morte, pela aplicação de massivas doses de inóculo do patógeno (BOYETCHKO et al., 2002; CRUMP; ASH; FAGANO., 1999). A aplicação de herbicidas biológicos é similar aos herbicidas químicos, o que os tornam uma opção bastante atrativa ao desenvolvimento industrial (BARRETO, 2009; TESSMANN, 2011). Além deste aspecto técnico, a exigência cada vez maior

por produtos que ofereçam menores riscos à saúde e ao meio ambiente, também pode ser considerada atrativa do ponto de vista industrial.

Dentre os patógenos passíveis de utilização, o fungo *Bipolaris euphorbiae* Muchovej e Carvalho 1989, inicialmente identificado como *Helminthosporium euphorbiae*, é considerado um candidato ideal para o controle biológico de *E. heterophylla*, por se tratar de um patógeno específico, de fácil multiplicação em laboratório e apresentar grande capacidade de esporulação. Em condições ideais é capaz de provocar manchas necróticas no caule e nas folhas, clorose, anormalidade no crescimento, necrose e murchamento, podendo evoluir para o total desfolhamento e morte da planta (ZILLINSKY, 1984; HARBORNE, 1993).

Os sintomas apresentados são ocasionados pela ação de uma fitotoxina, ainda não identificada, produzida pelo fungo durante o processo de infecção. O exato mecanismo pelo qual a infecção se estabelece não foi totalmente compreendido, mas investiga-se a possibilidade de envolver complexas mudanças bioquímicas no interior da planta hospedeira (HARBORNE, 1993).

Vários são os trabalhos que investigaram o potencial do fungo como agente de biocontrole desta importante planta daninha, obtendo-se resultados promissores quanto à redução do desenvolvimento da planta e em alguns casos, alcançando elevados índices de mortalidade (YORINORI, 1985; GAZZIERO et al., 1989; MARCHIORI et al., 2001). A associação do fungo com herbicidas químicos comumente utilizados na cultura da soja também vêm sendo investigada, em estudos de compatibilidade, visando incrementar o controle de *E. heterophylla* (GAZZIERO e YORINORI, 1988; NEMOTO et al., 2002; NECHET; BARRETO; MIZUBUTI, 2006).

O programa pioneiro de controle biológico de plantas daninhas no Brasil foi realizado na Embrapa Soja - CNPSo, nos anos de 1980-1981, e visava o desenvolvimento de um micoherbicida à base de *B. euphorbiae* para o controle de *E. heterophylla*. Apesar do início promissor, os trabalhos foram interrompidos por limitações verificadas para os isolados disponíveis do fungo, pelo fechamento temporário do mercado em razão do lançamento de herbicidas químicos com boa ação contra a planta e por fim, por mudanças de prioridades de pesquisa na instituição (NECHET; BARRETO; MIZUBUTI, 2006; BARRETO, 2009). Entretanto,

em razão de questões já comentadas, como a ocorrência de populações resistentes e preocupações de ordem ambiental, a planta ganhou novamente importância.

A utilização de produtos biológicos em programas de manejo agrícola ainda enfrenta algumas limitações no que diz respeito à produção massal e formas de conservação do produto, sendo fundamental o desenvolvimento de formulações (ALMEIDA; ROCHA; BATISTA FILHO, 2007). O desafio nesse sentido é a obtenção de produtos estáveis durante o armazenamento. A estabilidade por 12-18 meses em temperatura ambiente é um requisito mínimo para aumentar a competitividade no mercado (RAMEGOWDA, 2005).

Com relação à produção massal de *B. euphorbiae*, trabalhos foram desenvolvidos visando determinar as condições físicas e exigências nutricionais ideais, além de métodos e meios de cultivo adequados, de baixo custo e fácil obtenção (PENARIOL et al., 2008; MORAES, 2009).

A formulação é a maneira de apresentar o ingrediente ativo em uma forma física mais efetiva, que se inicia com a produção do patógeno e segue com a adição de produtos (adjuvantes) que visam: a) estabilizar o agente biológico durante o armazenamento; b) facilitar o manuseio e aplicação do produto; c) proteger o bioagente contra fatores ambientais adversos, aumentando sua persistência no ambiente; d) aumentar a atividade do patógeno, incrementando sua reprodução, contato e interação com a praga-alvo (JONES e BURGESS, 1998; MORENTINI e MELO, 2007; ALMEIDA et al., 2008). Sob esse aspecto, considera-se importante encontrar adjuvantes compatíveis ao patógeno e que promovam melhorias em uma ou mais características essenciais para o estabelecimento da interação antagonista (FRAVEL; CONNICK; LEWIS, 1998).

Dentre os adjuvantes que vêm sendo pesquisados para formulações de micohebicidas, destacam-se os surfactantes, que adicionados à calda promovem a suspensão, dispersão, incremento da deposição, molhamento, adesão e retenção dos conídios, aumentando a toxicidade sobre o alvo (COSTA et al., 2003) e os fotoprotetores que conferem proteção contra a radiação UV, especialmente a UVB de maior interesse biológico por causar danos severos aos fungos (EDGINGTON et al., 2000).

Apesar do potencial e êxito inicial de vários bioherbicidas formulados, as expectativas pouco realistas de mortalidade das plantas daninhas, além da questão da vida útil do produto e a competitividade por preço, comparado aos herbicidas químicos, têm levado, em parte, a queda do desenvolvimento e eventual abandono de alguns potenciais candidatos a bioherbicidas (WATSON et al., 2000).

O primeiro bioproduto registrado nos Estados Unidos foi o Devine[®], uma formulação líquida composta por clamidósporos do fungo *Phytophthora palmivora* para controle de *Morrenia odorata* em citrus, produzindo nível de controle de 90 a 100% com apenas uma aplicação (CHARUDATTAN, 1991; TESSMANN, 2011). Apesar da eficiência, o produto não apresenta grande estabilidade e sob refrigeração possui uma vida útil de apenas 6 semanas e por essa razão é produzido somente mediante pedidos antecipados (TeBEEST e TEMPLETON, 1985). Outro exemplo é o Collego[®], bioherbicida usado para o controle de *Aeschynomene virginica* (angiquinho) em cultura de arroz e soja. O produto consiste em uma formulação seca composta por esporos do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*, (TeBEEST e TEMPLETON, 1985) e vem apresentando níveis de controle acima de 90% (TESSMANN, 2011). É comercializado como um pó molhável e para uso deve ser reidratado gradualmente e misturado a uma quantidade pré-embalada de açúcar que atua como fonte de nutrientes (ROSSKOPF; CHARUDATTAN; KADIR, 1999).

Casst[®] e Biomal[®] são outros dois bioherbicidas, um à base de *Alternaria cassia*, visando o controle de *Cassia obtusiflora*, planta daninha da soja e do algodão nos EUA e o outro à base de *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae*, para controle de *Malva pusilla* em várias culturas, respectivamente. Embora tenham apresentado resultados eficientes para o controle das respectivas plantas, os produtos não estão mais disponíveis comercialmente (TESSMANN, 2011).

A qualidade dos bioprodutos disponíveis nem sempre é adequada, dificultando a implantação em programas de controle em maior escala. No Brasil, de modo geral, a produção em larga escala dos agentes biológicos é realizada com baixo nível tecnológico devido à deficitária infra-estrutura disponível e pelo fato da maioria dos produtos não ser submetida a estudos de pré-formulação, formulação e

controle de qualidade, o que compromete sua eficiência e amplia as possibilidades de estudos nesta área. (MORANDI e BETTIOL, 2009)

3. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J.E.M.; BATISTA FILHO, A.; ALVES, S.B.; LEITE, G.L.; NEVES, P.M.J.O. Formulação de entomopatógenos na América Latina. In: ALVES, S.B.; LOPES, R. B. (Eds.). **Controle Microbiano de Pragas na América Latina**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p.257-277.

ALMEIDA, J.E.M.; ROCHA, T.C.; BATISTA FILHO, A. Desenvolvimento de método para extração física de conídios de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* para formulação pó seco e molhável de bioinseticida. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.74, n.4, p.369-371, 2007.

AMARAL, A.L. **Estudos genéticos e Morfológicos de Biótipos Resistentes e susceptíveis de *Euphorbia heterophylla* L. (amendoim-bravo)**. 2006. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal, 2006.

BARBOSA, A.M.; SOUZA, C.G.M.; DEKKER, R.F.H.; FONSECA, R.C.; FERREIRA, D.T. Phytotoxin produced by *Bipolaris euphorbiae* in-vitro is effective against the weed *Euphorbia heterophylla*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.45, n.2, p.233-240, 2002.

BARRETO, R.W. Controle Biológico de Plantas Daninhas com Fitopatógenos. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Eds). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. 1st ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente; 2009. p.101-128.

BARRETO, R.W.; EVANS, H.C. Fungal pathogens of *Euphorbia heterophylla* and *E. hirta* in Brazil and their potential as weed biocontrol agents. **Mycopathologia**, Den Haag, v.141, n.1, p.21-36, 1998.

BIANCO, S.; PITELLI, R. A.; CARVALHO, L. B. Estudo comparativo do acúmulo de massa seca e macronutrientes por plantas de *Glycine max* (L.) Merr. e *Euphorbia heterophylla* L. **Ensaios e Ciência**, Campo Grande, v.11, n.2, p.61-72, 2007.

BOYETCHKO, S.M.; ROSSKOPF, E.N.; CEASAR, A.J.; CHARUDATTAN, R. Biological Weed Control with Pathogens: Search for Candidates to Applications. **Applied Mycology and Biotechnology**, Amsterdam, v.2, p.239-274, 2002.

BRACCINI, A.de L. Banco de sementes e mecanismos de dormência em sementes de plantas daninhas. In: OLIVEIRA Jr., R.S. CONSTANTIN, J.; INOUE, M.H. (Eds). **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Omnipax, Curitiba, 2011, p.37-66.

BRIGHENTI, A.M.; OLIVEIRA, M.F. Biologia de Plantas Daninhas. In: OLIVEIRA Jr, R.S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M.H. **Biologia e Manejo de Plantas Daninhas**. Curitiba: Omnipax; 2011. p.1-36.

BURNSIDE, O.C. Rationale for developing herbicide-resistant crops. **Weed Technology**, Champaign, v.6, n.3, p.621-625, 1992.

CHARUDATTAN, R. The mycoherbicide approach with plant pathogen. In: TeBEEST, D.O. (ed). **Microbial control of weeds**. New York: Chapman and Hall, 1991. 283 p.

CHRISTOFFOLETI, P. J.; KEHDI, C. A.; CORTEZ, M. G. Manejo da planta daninha *Brachiaria plantaginea* aos herbicidas inibidores da ACCase. **Planta Daninha**, Campinas, v. 19, n. 1, p. 61-66, 2001.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). **Levantamentos de safra: 11º levantamento de grãos – agosto/2011**. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_08_09_11_44_03_boletim_agosto-2011.pdf . Acesso em 08 de agosto de 2011.

CONSOLO, V.F.; SALERNO, G.L.; BERON, C.M. Pathogenicity, formulation and storage of insect pathogenic hyphomycetous fungi tested against *Diabrotica speciosa*. **Biocontrol**, Dordrecht, v.48, n.6, p.705-712, 2003.

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.

CRUMP, N.S.; ASH, G.J.; FAGAN, R.J. The development of an Australian bioherbicida. In: BISHOP, A.C.; BOERSMA, M.; BARNES, C.D. (eds.) 12th Australian Weeds Conference, 1999, Hobart. **Proceedings...** p.235-237.

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.

ELZEIN, A.; KROSCHER, J.; CADISCH, G. Efficacy of Pesta granular formulation of *Striga*-mycoherbicide *Fusarium oxysporum* f. sp. *strigae* Foxy 2 after 5-year of storage. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Stuttgart, v.115, n.6, p.259-262, 2008.

FRAVEL, D.R.; CONNICK, W.J.; LEWIS, J.A. Formulation of microorganism to control plant diseases. In: BURGESS, H.D. (Ed.). **Formulation of microbial biopesticides: beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. p.187-202.

GARRIDO, L.R.; DHINGRA, O.D. Weed species as potential reservoir hosts of *Diaporthe phaseolorum* f.sp. *meridionalis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, n.1, p.108-110, 1997.

GAZZIERO, D.L.P.; BRIGHENTI, A.M.; MACIEL, C.D.G.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; ADEGAS, F.S.; VOLL, E. Resistência de amendoim-bravo aos herbicidas inibidores da enzima ALS. **Planta Daninha**, Campinas, v. 16, n.2, p.117-125, 1998.

GAZZIERO, D.L.P.; CALÇAVARA, P.R.; YORINORI, J.T.; ARRABAL, C.A. Adequação da dose do fungo *Helminthosporium* sp. no controle biológico de amendoim-bravo (*Euphorbiae heterophylla*). In: EMBRAPA. **Resultados de pesquisa de soja. Relatório Anual**. Londrina, 1989, p.275-278.

GAZZIERO, D.L.P.; YORINORI, J.T. Avaliação da compatibilidade da mistura de *Helminthosporium* sp com herbicidas pós-emergentes no controle de amendoim-bravo (*Euphorbiae heterophylla*). In: EMBRAPA. **Resultados de pesquisa de soja 1986/1987**. Londrina, 1988. p.336-338.

HARBORNE, J.B. Higher plant - Lower plant interactions: Phytoalexins and Phytotoxins. In: HARBORNE, J.B. **Introduction to ecological biochemistry**. New York: Academic Press, 1993. p.264-294.

INOUE, M.H.; OLIVEIRA Jr., R.S. Resistência de plantas daninhas a herbicidas. In: OLIVEIRA Jr, R.S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M.H. (Eds). **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Omnipax, Curitiba, 2011, p.193-214.

JONES, K.A.; BURGESS, H.D. Technology of formulation and application. In: BURGESS, H.D. (Ed.). **Formulation of Microbial Pesticides - Beneficial Microorganisms, Nematodes and Seed Treatments**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1998. p.7-30.

MARCHIORI, R.; NACHTIGAL, G.F.; COELHO, L.; YORIONORI, J.T.; PITELLI, R.A. Comparison of culture media for the mass production of *Bipolaris euphorbiae* and its impact on *Euphorbia heterophylla* dry matter accumulation. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.27, n.4, p.428-432, 2001.

MORAES, C. **Produção massal e influência de fatores físicos no cultivo e viabilidade de *Bipolaris euphorbiae***. 2009. 75f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal, 2009.

MORANDI, M.A.B.; BETTIOL, W. Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Eds). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. 1st ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente; 2009. p.1-14.

MORENTINI, A.; MELO, I.S. Formulação do fungo *Coniothyrium minitans* para controle do mofo-branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.2, p.155-161, 2007.

NECHET, K. de L.; BARRETO, R.W.; MIZUBUTI, E.S.G. *Bipolaris euphorbiae* as a biological control agente for wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla*): host-specificity and variability in pathogen and host populations. **BioControl**, Dordrecht, v.51, v.2, p.259-275, 2006.

NEMOTO, M.C.M.; NAHAS, E.; PITELLI, R.A.; COELHO, L. Germination and mycelial growth of *Bipolaris euphorbiae* Muchovej e Carvalho as influenced by herbicides and surfactants. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo, v.33, n.4, p.352-357, 2002.

OLIVEIRA Jr, R.S. Mecanismos de ação de herbicidas. In: OLIVEIRA Jr, R.S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M.H. (Eds). **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Omnipax, Curitiba, 2011, p.141-192.

PENARIOL, M.C., MONTEIRO, A.C., PITELLI, R.A., PEREIRA, G.T. Produção de *Bipolaris euphorbiae* em meios de cultura sólidos e líquidos obtidos de grãos e resíduos agroindustriais. **Bragantia**, Campinas, v.67, n.4, p.805-814, 2008.

PINTO, S.B.; PANIZZI, A.R. Performance of nymphal and adult *Euschistus hero* (F.) on milkweed and on soybean and effect of food switch on adult survivorship, reproduction and weight gain. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.23, p.549-555, 1994.

PITELLI, R.A. Competição e controle das plantas daninhas em áreas agrícolas. **Série Técnica IPEF**, Piracicaba, v.4, n.12, p.1 -24, 1987.

PONCHIO, J.A.R. **Resistência de biótipos de *Bidens pilosa* L. a herbicidas inibidores da enzima ALS/AHAS**. 1997. 120f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, Piracicaba, 1997.

RAMEGOWDA, G.K. **Aerobiology, epizootiology and utilization of *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson**. 2005. 116f. Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola) - University of Agricultural Sciences, Dharwad, 2005.

ROSSKOPF, E.N.; CHARUDATTAN, R.; KADIR, J.B. Use of plant pathogens in weed control. In: BELLOWS, T.S.; FISHER, T.W. (Eds.). **Handbook of Biological Control**. Academic Press, New York, 1999, p.891-918.

TeBEEST, D.O.; TEMPLETON, G.E. Mycoherbicide: progress in the biological control of weeds. **Plant Disease**, St. Paul, v.69, n.1, p.6-10, 1985.

TESSMANN, D.J. Controle biológico: aplicações na área de Ciência das Plantas Daninhas. In: OLIVEIRA Jr, R.S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M.H. (Eds). **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Omnipax, Curitiba, 2011, p.79-94.

TRANEL, P.J.; WRIGHT, T.R. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? **Weed Science**, Champaign v.50, n.6, p.700-712, 2002.

TREZZI, M.M.; FELIPPI, C.L.; MATTEI, H.L.; SILVA, A.L.; DEBASTIANI, C.; VIDAL, R.A.; MARQUES, A. Multiple resistance of acetolactase synthase and protoporphyrinogen oxidase inhibitors in *Euphorbia heterophylla* biotypes. **Journal of Environmental Science and Health - Part B - Pesticides, food contaminants and agricultural wastes**, New York, v.40, n.1, p.101-109, 2005

VARGAS, L.; BORÉN, A.; SILVA, A.A. Herança da resistência aos herbicidas inibidores da ALS em biótipos da planta daninha *Euphorbia heterophylla*. **Planta Daninha**, Viçosa, v.19, n.3, p.331-336, 2001.

VICENTINI, M.E.; PENHA, L.A.O.; FONSECA, I.C.B. Germinação de *Euphorbia heterophylla* L. ao longo do tempo em diferentes profundidades. In XXVII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas: **Anais...** Ribeirão Preto - SP, 2010.

VIDAL, R.A.; MEROTTO Jr, A. **Herbicidologia**. Porto Alegre: Evangraf, 2001. 152 p.
VIDAL, R.A.; MEROTTO Jr, A. Resistência de amendoim-bravo aos herbicidas inibidores da ALS. **Planta daninha**, Campinas, v.17, n.3, p.367-373, 1999.

VIDAL, R.A.; TRENZZI, M.M.; de PRADO, R.; RUIZ-SANTAELLA, J.P.; VILA-AIUB, M. Glyphosate resistant biotypes of wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla* L.) and its risk analysis on glyphosate-tolerant soybeans. **Journal of Food Agriculture and Environment**, Helsinki, v.5, n.2, p.265-269, 2007.

VOLL, E.; GAZZIERO, D.L.P.; BRIGHENTI, A.M.; ADEGAS, F.S.; GAUDÊNCIO, C.A.; VOLL, C.E. A dinâmica das plantas daninhas e práticas de manejo. **Documentos/Embrapa Soja**, Londrina, 85p, 2005.

WATSON, A.K.; GRESSEL, J.; SHARON, A.; DINOOR, A. *Colletotrichum* strains for weed control. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. (Eds.). **Colletotrichum host specificity, pathology, and host-pathogen interaction**. APS Press: St. Paul, 2000. p.245-265.

WILLARD, T.S.; GRIFFIN, J.L. Soybean (*Glycine max*) yield and quality responses associated with wild poiseinttia (*Euphorbia heterophylla*) control programs. **Weed Technology**, Champaign, v.7, p.118-122, 1993.

WILSON, A.K. *Euphorbia heterophylla*: a review of distribution, importance and control. **Tropical Pest Management**, London, v.27, p.32-38, 1981.

YORINORI, J.T. Biological control of wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla*) with pathogenic fungi. In: DELFOSSE, E.S. (Ed.). SYMPOSIUM ON BIOLOGICAL CONTROL OF WEEDS. 1985. **Proceedings...** Vancouver: Vancouver Agriculture Canada, 1985. p.677-681.

ZILLINSKY, FJ. **Guía para la identificación de enfermedades en cereales de grano pequeño.** Mexico,: CIMMYT, 1984. 141 p.

CAPÍTULO 2 - PADRONIZAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE PRÉ-ETAPAS PARA FORMULAÇÃO DE BIOHERBICIDA À BASE DE *Bipolaris euphorbiae*

RESUMO - Viabilizar o uso de bioprodutos implica buscar processos adequados para produção massal e formulação de agentes biológicos. Neste trabalho, objetivou-se otimizar a produção de *Bipolaris euphorbiae* em meio sólido e em sistema bifásico, e determinar os processos de secagem e obtenção de conídios. Investigou-se a influência do período de incubação e do volume da suspensão fúngica. A secagem dos conídios foi realizada em estufa sob várias temperaturas, fluxo laminar, fluxo contínuo de ar e câmara asséptica em temperatura ambiente. Conídios secos foram obtidos por peneiramento e moagem em diferentes tipos de moinhos. Avaliou-se a viabilidade dos conídios e a esporulação em meio sólido e sistema bifásico. A melhor relação “esporulação versus período de cultivo” no meio sólido foi obtida após 10 dias de incubação, rendendo $8,3 \times 10^7$ conídios g^{-1} substrato. O sistema bifásico não incrementou a esporulação do fungo ($4,5 \times 10^7$ conídios g^{-1} substrato) cultivado por 14 dias e o volume de suspensão fúngica usado neste sistema não foi determinante para incrementar a produção. O fluxo contínuo de ar foi considerado o mais satisfatório do ponto de vista do controle biológico, pois permitiu maior perda de umidade (62,6%) com alta viabilidade (94,6%). A moagem reduziu a germinação dos conídios, enquanto o peneiramento proporcionou a obtenção de conídios em pó com alta viabilidade (94,8%).

Palavras-chave: produção massal, secagem, obtenção de conídios

CHAPTER 2 - STANDARDIZATION AND OPTIMIZATION OF STEPS TO FORMULATE A BIOHERBICIDE BASED ON *Bipolaris euphorbiae*

ABSTRACT - To make possible the use of bioproducts implies in the search for appropriate procedures to ensure mass production and formulation. This study aimed to optimize the production of *Bipolaris euphorbiae* in solid and biphasic system, to determine the drying processes, as well as obtaining of conidia. It was investigated the influence of incubation period and the amount of inoculum. The drying of conidia was performed in a oven under varying temperatures, laminar flow, continuous flow of air and aseptic chamber at room temperature. Dried conidia were obtained through screening and using different grind types. It was evaluated the conidia viability and the sporulation on solid medium and biphasic system. The best relation “sporulation versus cultivation” in the solid medium was obtained after 10 days of incubation, earning 8.3×10^7 conidia g^{-1} substrate. The biphasic system did not increase the fungus sporulation (4.5×10^7 conidia g^{-1} substrate) cultivated during 14 days and the amount of liquid inoculum used in this system was not determinant for increasing the production. The continuous air flow was considered the most satisfactory from the standpoint of biological control because it allowed more moisture loss (62.6%) with high viability (94.6%). Grinding reduced the germination of conidia, whereas the screening provided to obtain pure conidia with high viability (94.8%).

Keywords: Mass production, drying, obtaining of conidia

1. INTRODUÇÃO

Em ambientes agrícolas, plantas daninhas competem direta e indiretamente com as culturas economicamente importantes, reduzindo a sua produtividade, interferindo nas operações de colheita e atuando como hospedeiras alternativas para insetos-pragas e patógenos, além de afetar a qualidade do produto colhido (BARRETO, 2009). A interferência destas plantas é responsável por reduzir em 30 a 40% a produção agrícola nos trópicos (LORENZI, 2000) e constitui a maior barreira à produção de alimentos em muitas regiões do mundo

Euphorbia heterophylla L. (Euphorbiaceae), popularmente conhecida como leiteiro ou amendoim-bravo, é uma das plantas daninhas mais temidas pelos produtores de soja, em função dos danos ocasionados e da dificuldade de controle, que é realizado, principalmente por herbicidas inibidores das enzimas acetolactato sintase (ALS) e protoporfirinogênio oxidase (PROTOX) (VIDAL e MEROTTO Jr, 2001).

O uso recorrente de determinados herbicidas ou mecanismos de ação numa mesma área tem levado à seleção de populações resistentes a certos grupos químicos e consequentes falhas no controle. Para a planta daninha em questão, foram identificados biótipos resistentes aos inibidores de ALS, e com resistência múltipla a inibidores da ALS e da PROTOX (TREZZI et al., 2005) e ao glifosato (VIDAL et al., 2007). Além disso, problemas de ordem ambiental como a contaminação de alimentos, solo, água, desequilíbrios biológicos, intoxicação de agricultores, entre outros, também são consequências do uso intensivo e indiscriminado de pesticidas químicos.

Situações dessa natureza ampliam as perspectivas do uso de agentes biológicos para o controle de plantas daninhas dentro de uma tendência mundial pela busca de sistemas alternativos de controle, que sejam, ao mesmo tempo, eficazes, econômicos e menos agressivos ao meio ambiente. O emprego de bioherbicidas representa um componente estratégico dos programas de manejo integrado de plantas daninhas, sendo o fungo *Bipolaris euphorbiae* Muschov. e Carvalho, um agente potencial para o controle biológico de *E. heterophylla*. Esse

fungo pode causar, em condições ideais, epifitotia, severa desfolhação, danos ao caule e morte do hospedeiro (BARRETO e EVANS, 1998).

Entretanto, ainda existem limitações que inviabilizam o uso de bioprodutos em campo, especialmente no que diz respeito à produção em larga escala e formas de conservação do produto, sendo fundamental o desenvolvimento de formulações.

A produção massal, a baixo custo e sob condições controladas, representa uma fase importante, visando garantir a obtenção de grandes quantidades do patógeno (LIMA; SOARES; BARRETO, 2010). Segundo PENARIOL et al. (2008), a introdução de *B. euphorbiae* em programas de manejo integrado de *E. heterophylla* é dependente da produção de conídios em larga escala; para viabilizar esta produção os autores investigaram meios líquidos e sólidos, obtidos de grãos e derivados e resíduos agroindustriais. Combinações destes substratos também foram avaliadas, visando incrementar a produção do fungo em meio sólido e em sistema bifásico de cultivo (MORAES, 2009). Contudo, o cultivo do fungo por este sistema não incrementou a produção, sugerindo o autor que tal resultado pode ser consequência do período de incubação ou quantidade de inóculo líquido usado para semear o meio sólido. No entanto, tais aspectos precisam ser investigados.

No processo de produção de um bioproduto, a secagem e obtenção das unidades infectivas constituem importantes pré-etapas para a formulação. Manter o patógeno em uma fase infecciosa, porém fisiologicamente dormente, segura e de fácil aplicação é fundamental. A chave para prolongar a sua sobrevivência é parar a germinação e reduzir ao máximo possível o metabolismo (HORACZEK e VIERNSTEIN, 2004). Para isso, há a necessidade de extrair a água, de modo que os conídios permaneçam com um teor de umidade de 5 a 10%, e posteriormente seja realizada a extração dos conídios do substrato (SILVA e MELLO, 2007).

Considerando a importância de desenvolver estudos visando a obtenção de bioherbicidas, o presente trabalho teve por objetivos otimizar as condições para a produção massal de *B. euphorbiae* em cultivo convencional em meio sólido e em cultivo bifásico, e determinar os processos adequados de secagem e obtenção de conídios, priorizando a manutenção da viabilidade destes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Fungo

Foi utilizado o isolado FCAV # 569 de *B. euphorbiae*, obtido por pesquisadores do Centro Nacional de Pesquisa em Soja da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA/CNSo) e mantido estocado em tubos de ensaio contendo o meio de batata-dextrose-ágar (BDA), sob refrigeração, no laboratório de Microbiologia do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Unesp.

Para utilização nos ensaios, o fungo foi cultivado em placas de Petri contendo o meio mínimo de PONTECORVO et al. (1953), modificado por PENARIOL et al. (2008), com a adição de peptona e substituição de glicose por amido, e mantido a $25 \pm 0,5$ °C por 10 dias e fotoperíodo de 12 horas.

2.2. Influência do período de incubação na produção de *Bipolaris euphorbiae*

Foram conduzidos ensaios para investigar a influência do período de incubação do fungo em meio sólido e no meio líquido do cultivo bifásico, visando obter, em menor tempo, maior esporulação com alta viabilidade.

2.2.1. Cultivo em meio sólido

O meio utilizado para produção do fungo foi composto pela mistura dos substratos casca de soja e sorgo em grão (60:40) na quantidade de 50 g (peso seco) (MORAES, 2009). Para o preparo dos substratos, a casca de soja foi embebida em água destilada, na proporção 1:3 (p v⁻¹), durante 15 minutos e posteriormente coada para remoção do excesso de água. O sorgo foi cozido em água destilada fervente, na mesma proporção acima, por cinco minutos em fogo brando e posteriormente coado. A mistura entre os substratos foi feita em peso úmido (g g⁻¹), na proporção indicada e colocada em frascos erlenmeyers e autoclavados a 121 °C e 1 Kgf cm⁻² por 40 minutos.

A inoculação do fungo foi feita pela transferência, com auxílio de agulha de níquel-cromo, de 3 discos de 8 mm de diâmetro retirados de colônias crescidas em meio mínimo durante 10 dias. Os frascos foram mantidos a $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, por período de 5 a 14 dias.

2.2.2. Cultivo em sistema bifásico

Para este ensaio o meio líquido utilizado foi composto por melaço de cana-de-açúcar na concentração de 8% (v v^{-1}), obtido por diluição em água destilada e o meio sólido, pela mistura de casca de soja e sorgo em grão (60:40) (MORAES, 2009) que foram preparados conforme descrito no item 2.2.1.

O meio líquido, na quantidade de 100 mL, foi disposto em erlenmeyers e autoclavado a 121°C e 1 Kg cm^{-2} por 20 minutos. A inoculação do fungo se deu conforme descrito no item anterior, e a incubação foi realizada por 3 a 10 dias, sob as condições de temperatura e fotoperíodo já mencionados anteriormente. Após o período determinado, a massa micelial formada foi triturada em *mixer* vertical SB 40 Black e Decker® por 3 segundos e em seguida coada em peneira com malha de 1 mm obtendo-se uma suspensão de conídios e fragmentos de micélio (MACHADO et al., 2010). Esta suspensão foi usada para semear o meio sólido na quantidade de 3 mL por frasco (MACHADO et al., 2010). Em seguida, as culturas foram mantidas a $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, por período de 5 a 10 dias.

2.2.3. Avaliação

No final de ambos os ensaios foram avaliadas a produção e viabilidade dos conídios. Para tanto, foram retiradas amostras contendo 1 g de substrato + fungo sendo este material transferido para tubos de ensaio contendo 9 mL de uma solução de Tween 80® ($0,1\% \text{ v v}^{-1}$). Os tubos foram vigorosamente agitados e as suspensões obtidas, utilizadas para determinar o número de conídios produzidos, com auxílio da câmara de Neubauer. A viabilidade dos conídios foi avaliada em microcultivo e exame direto em lâmina ao microscópio, de acordo com metodologia descrita por FRANCISCO et al. (2006). Em lâminas de microscopia esterilizadas foram

previamente marcados três campos e a superfície recoberta com 4 mL de meio mínimo. Na região do meio de cultura correspondente a cada campo foi inoculado 0,1 mL da suspensão fúngica, obtida conforme descrito acima, e as culturas incubadas a $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 7 horas. Após esse período, o processo de germinação foi interrompido, pingando-se uma gota de corante [1 mL de solução estoque (1 g de azul de metileno em 20 mL de ácido láctico) adicionada em 29 mL de ácido láctico] em cada campo. Foram observados 150 conídios por campo, entre germinados e não germinados, estabelecendo-se uma relação, em porcentagem, de conídios viáveis.

Determinou-se também a produção e viabilidade dos conídios formados em meio líquido, coletando-se 1 mL da suspensão usada para semear o meio sólido no sistema bifásico de produção.

2.3. Influência do volume de suspensão de *Bipolaris euphorbiae* para produção em sistema bifásico

Visando incrementar o rendimento deste método de produção, a suspensão fúngica proveniente do cultivo em meio líquido e preparada conforme já descrito, foi inoculada no meio sólido nas quantidades de 1; 3; 5; 7 e 9 mL. Os frascos foram mantidos a $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Após incubação, pelos tempos definidos no ensaio de cultivo em sistema bifásico, foram avaliadas a produção e viabilidade dos conídios, conforme já descrito.

2.4. Secagem de conídios de *Bipolaris euphorbiae*

O meio sólido contendo o fungo crescido foi submetido a diferentes condições de secagem, até massa constante, visando manter a integridade dos conídios. As condições avaliadas foram: a) estufa nas temperaturas de 30; 35; 40; 45; 50; 55 e 60°C ; b) fluxo laminar em temperatura ambiente; c) temperatura ambiente em câmara asséptica; d) temperatura ambiente sob fluxo contínuo de ar (pressão de $3,5 \pm 0,3 \text{ Kg f cm}^{-2}$ e vazão de 15 L min^{-1}) em equipamento construído para tal finalidade (Figura 1), totalizando 10 tratamentos.

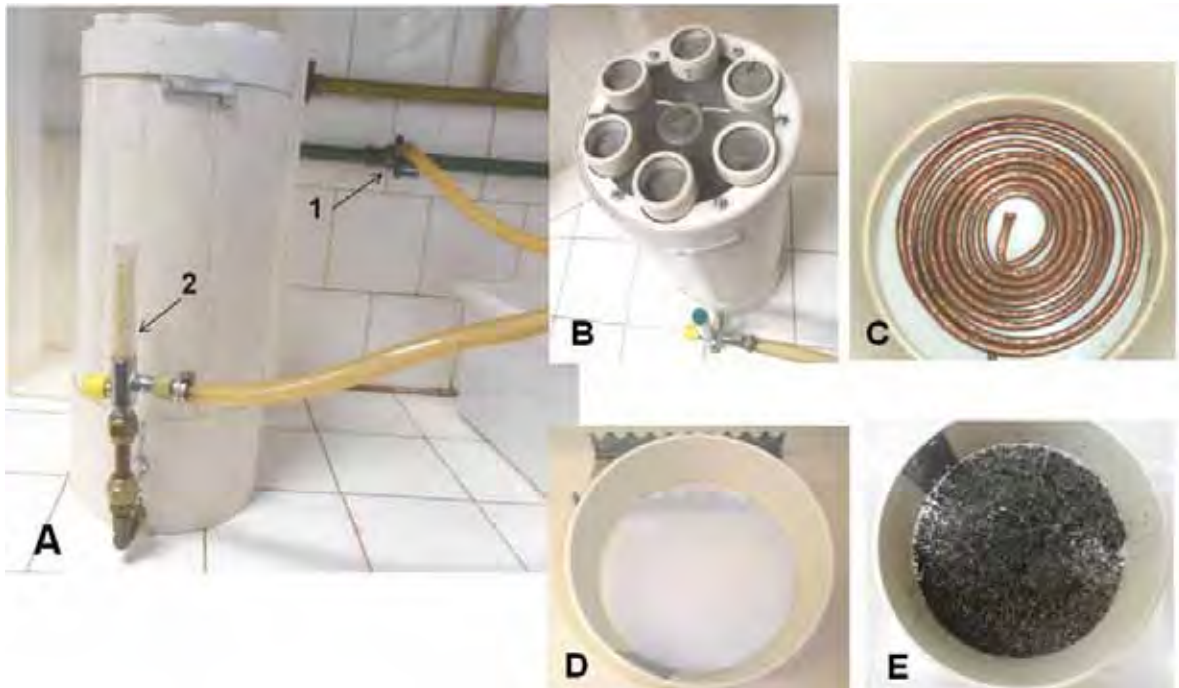


Figura 1- Equipamento de fluxo contínuo de ar usado para secagem do material contendo o fungo. (A) Equipamento mostrando: 1- fonte de ar comprimido (compressor) e 2- fluxômetro; (B) Detalhe da parte superior do equipamento, mostrando saídas de ar com filtro; (C) Detalhe da parte interna do equipamento, mostrando a serpentina perfurada; (D) Peneira, que é colocada sobre a serpentina e (E) Peneira com material seco (fungo + meio sólido) retirado do equipamento.

Exceto para o fluxo contínuo de ar, em que foi usado um recipiente integrado ao equipamento de secagem (peneira), o material foi disposto em bandejas de plástico previamente desinfetadas com álcool 96 °GL. A temperatura ambiente foi monitorada e variou de 24 a 27°C durante os ensaios.

Foi avaliada a viabilidade dos conídios antes e após os processos de secagem, e a perda de água. Para este último parâmetro foi estabelecida uma relação, em porcentagem, entre o peso inicial e final do material avaliado. Para a avaliação da viabilidade, em ambas as situações, foram preparadas suspensões contendo 1 g de material (meio sólido + fungo) e 9 mL de solução de Tween 80® (0,1% v.v⁻¹) e o teste executado conforme metodologia descrita por FRANCISCO et al. (2006).

2.5. Obtenção de conídios de *Bipolaris euphorbiae*

O meio contendo o fungo crescido e seco, de acordo com metodologia determinada no item anterior, foi submetido a três processos de moagem e ao simples peneiramento, para obtenção de conídios. Considerando a natureza dos substratos sólidos utilizados para a produção do fungo, a obtenção se caracterizou pela redução destes a um pó fino, exceto no peneiramento cujo objetivo foi extrair os conídios dos substratos.

Para obtenção de um pó fino, foram utilizados: a) moinho de bola Marconi, modelo MA-350, com câmara fechada; b) moinho de martelo MR (Metalúrgica Roma), modelo MR-320, contendo 4 martelos e 1 peneira de 1 mm e c) moedor de grãos Arbel, modelo MCF-55. Para extrair os conídios foi utilizada uma peneira com malha de 1 mm, fechada e agitada manualmente por 10 minutos. Em seguida, a massa obtida foi submetida a peneira com malha de 0,25 mm para remoção de impurezas. No método de obtenção de conídios por meio do moinho de bola, o material foi colocado em uma cuba de moagem e mantido sob batidas intermitentes por 1 minuto. No moedor de grãos, o mancal de regulagem foi ajustado de modo que as moendas proporcionassem a redução do material a um pó fino. Para isso, a moagem foi realizada duas vezes consecutivas.

Foi avaliada a viabilidade dos conídios antes e após cada um dos métodos de obtenção testados. As suspensões obtidas em ambas as situações foram compostas por uma amostra de 1 g de material seco antes da moagem e 1 g de pó obtido após os respectivos processos de moagem, sendo em seguida transferidas para tubos de ensaio contendo 9 mL de solução de Tween 80[®] (0,1% v v⁻¹). Para os conídios extraídos por peneiramento usou-se 0,1 g diluído em 9,9 mL de solução de Tween 80[®] (0,1% v v⁻¹). O teste foi executado conforme metodologia descrita por FRANCISCO et al. (2006).

2.6. Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados no delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 4 repetições por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de

variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Os ensaios de secagem e obtenção de conídios foram analisados utilizando-se um esquema fatorial com dois fatores: métodos de secagem *versus* situação de avaliação (antes e após a secagem), e métodos de obtenção *versus* situação de avaliação (antes e após a obtenção). Para execução das análises estatísticas foi utilizado o programa ESTAT (1997), versão 2.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Influência do período de incubação na produção de *Bipolaris euphorbiae*

Tanto na produção convencional em meio sólido, como nas fases líquida e sólida do sistema bifásico, não houve influência do período de incubação na viabilidade dos conídios produzidos ($p \geq 0,05$), cuja germinação manteve-se maior que 97% em todos os tratamentos (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 - Esporulação e viabilidade de conídios de *Bipolaris euphorbiae* produzidos pelo método convencional de cultivo em meio sólido e submetido a diferentes períodos de incubação

Período de incubação (dias)	Esporulação ($\times 10^7$ con. g^{-1} substrato)	Viabilidade (%)
5	1,7 B	97,5 A
6	2,4 AB	98,3 A
7	4,7 AB	97,9 A
8	5,4 AB	99,4 A
9	6,7 AB	99,1 A
10	8,3 AB	98,8 A
11	7,3 AB	99,5 A
12	7,0 AB	99,5 A
13	8,0 AB	99,4 A
14	8,9 A	99,4 A
Teste F	2,52*	2,91*
CV (%)	31,09	0,89

Médias originais, porém análise de variância realizada com dados transformados em $\log(x+1)$ e $\arcsin \sqrt{x/100}$, para esporulação e viabilidade, respectivamente. Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). NS não significativo, * significativo a 5% de probabilidade, CV coeficiente de variação.

Sob cultivo convencional, a esporulação do fungo após 14 dias de cultivo diferiu significativamente apenas da obtida com 5 dias de incubação, apresentando o maior valor para este parâmetro ($8,9 \times 10^7$ conídios g^{-1} de substrato) (Tabela 1).

Tendo em vista a produção massal do fungo e obtenção de grande quantidade de conídios, pode-se considerar que a incubação por 10 dias apresenta a relação “esporulação com alta viabilidade *versus* período de incubação” mais aplicável. Isso porque, considerando os dados obtidos (Tabela 1), teoricamente num período de 30 dias, mantendo a incubação do fungo por 10 dias, seriam realizados 3 ciclos de produção, rendendo ao final $24,9 \times 10^7$ con. g^{-1} de substrato. Utilizando o período de incubação de 14 dias, que proporcionou maior valor numérico para esporulação neste ensaio, em 30 dias seriam gerados 2 ciclos com rendimento final de $17,8 \times 10^7$ con. g^{-1} de substrato. A média diária de esporulação obtida na primeira situação hipotética seria 32% maior, justificando ser este o período indicado para produção do fungo.

A esporulação obtida sob tal condição ($8,3 \times 10^7$ con. g^{-1} de substrato) foi maior do que a observada por MORAES (2009) que nas mesmas condições obteve $2,3 \times 10^7$ con. g^{-1} de substrato.

Sistemas de produção em cultura líquida submersa são amplamente utilizados para produção massal de bioherbicidas (CHURCHILL, 1982; STOWELL, 1991) e para *B. euphorbiae* a esporulação no meio líquido, sem agitação e por diferentes períodos de incubação, foi da ordem de 10^5 conídios mL^{-1} (Tabela 2). Baseado na análise dos dados e considerando que o fungo produzido nesta fase foi usado como inóculo para a segunda etapa do cultivo bifásico, optou-se em selecionar o período de incubação de 7 dias, no qual observou-se o maior valor numérico ($6,1 \times 10^5$ con. mL^{-1}) de esporulação do fungo.

No cultivo em meio sólido, a incubação por 7 dias proporcionou o maior valor numérico de esporulação, embora sem diferir dos demais tratamentos ($p \geq 0,05$), exceto 5 dias de incubação (Tabela 2). Os dados obtidos sugerem que a produção de *B. euphorbiae* pelo sistema bifásico de cultivo demandaria o total de 14 dias, enquanto que MORAES (2009) utilizou 17 dias

Tabela 2 - Esporulação e viabilidade de conídios de *Bipolaris euphorbiae* produzidos no meio líquido e no meio sólido do sistema bifásico, em diferentes períodos de incubação.

Período de incubação (dias)	Meio líquido		Meio sólido ¹	
	Esporulação (x 10 ⁵ con. mL ⁻¹)	Viabilidade (%)	Esporulação (x 10 ⁷ con. g ⁻¹)	Viabilidade (%)
3	1,9 B	99,5 A	-	-
4	4,0 AB	99,7 A	-	-
5	3,8 AB	99,8 A	1,0 B	98,9 A
6	5,1 AB	99,8 A	2,2 AB	99,2 A
7	6,1 A	99,9 A	4,5 A	98,7 A
8	4,8 AB	99,7 A	4,0 A	98,7 A
9	5,1 AB	99,4 A	3,2 A	98,9 A
10	5,0 AB	99,3 A	3,7 A	98,8 A
Teste F	2,44*	3,1*	5,86**	2,63 ^{NS}
CV (%)	30,23	0,24	24,3	0,24

¹ Inóculo obtido após 7 dias de incubação em meio líquido. Médias originais, porém análise de variância realizada com dados transformados em log (x+1) e arc sen $\sqrt{x/100}$, para esporulação e viabilidade, respectivamente. Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). NS não significativo, ** * significativo a 1% e a 5% de probabilidade, respectivamente. CV coeficiente de variação.

3.2. Influência do volume de suspensão de *Bipolaris euphorbiae* usada na fase sólida do sistema bifásico

A esporulação foi significativamente maior quando os volumes de 5, 7 e 9 mL de suspensão fúngica foram usadas para semear o meio sólido (Tabela 3). Entretanto, o volume de suspensão não pode ser considerado um fator responsável pelo incremento da esporulação do fungo pelo sistema bifásico, visto que, mesmo usando o maior volume (9 mL), a produção de conídios foi 28,9% menor do que a obtida em meio sólido pelo sistema convencional, em 10 dias (Tabela 1). Além disso, semeando-se o substrato contido em 3 frascos com 3 mL de inóculo em cada um, teoricamente seria possível obter a produção total de $8,7 \times 10^7$ con. g substrato⁻¹, maior do que a obtida ($5,9 \times 10^7$ con. g substrato⁻¹) semeando o substrato de apenas 1 frasco com 9 mL (Tabela 3). Do ponto de vista industrial este é um importante aspecto a ser considerado.

Comparando-se o método convencional de produção do fungo no meio sólido e a produção pelo sistema bifásico (Tabelas 1 e 2), a melhor relação esporulação *versus* período de incubação foi obtida no método convencional, que além de reduzir o

tempo de incubação, proporcionou maior esporulação do fungo. Possivelmente, o processo de retirada dos discos de 8 mm das placas contendo o fungo seja menos agressivo do que a trituração da massa micelial no meio líquido, permitindo mais rápida e eficiente colonização do meio sólido. Cabe ressaltar que o processo de produção em meio sólido empregado atualmente no país é simples e pouco automatizado, porém eficiente e de custo compatível com a estrutura produtiva nacional (MORANDI e BETTIOL, 2009).

Tabela 3 - Esporulação e viabilidade de conídios de *Bipolaris euphorbiae* no meio sólido do sistema bifásico, inoculado com diferentes volumes de suspensão fúngica obtida a partir do cultivo em meio líquido, após 7 dias de incubação.

Volume de suspensão (mL)	Esporulação (x 10 ⁷ con. g ⁻¹)	Viabilidade (%)
1	1,5 C	98,7 A
3	2,9 B	99,0 A
5	3,6 AB	98,9 A
7	4,1 AB	98,8 A
9	5,9 A	98,8 A
Teste F	13,17**	0,73 ^{NS}
CV (%)	13,7	0,91

Médias originais, porém análise de variância realizada com dados transformados em $\log(x+1)$ e $\arcsin\sqrt{x/100}$. Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). NS não significativo, ** significativo a 1% de probabilidade, CV coeficiente de variação

3.3. Secagem de conídios de *Bipolaris euphorbiae*

A análise de variância evidenciou que a interação dos fatores métodos de secagem *versus* situação de avaliação foi significativa ($F= 48,80^{**}$) e o desdobramento desta interação (Tabela 4) permitiu avaliar o efeito sobre os conídios do fungo. A taxa de germinação manteve-se acima de 98% em todos os tratamentos antes da submissão aos métodos de secagem, garantindo homogeneidade das amostras.

Os efeitos mais expressivos da influência do método de secagem sobre os conídios do fungo foram obtidos em estufa a 55 e 60°C, havendo uma redução de 26 e 73% na germinação, respectivamente. Para os demais métodos, em geral, a integridade dos conídios foi preservada após a secagem, mantendo a viabilidade

maior que 94% (Tabela 4), valor considerado satisfatório do ponto de vista do controle de qualidade.

Tabela 4 - Desdobramento da interação métodos de secagem *versus* situações de avaliação, significativa para a viabilidade de conídios de *Bipolaris euphorbiae*

Métodos de secagem	Viabilidade dos conídios (%)		Teste F
	Situação de avaliação		
	Antes da secagem	Após a secagem	
Fluxo laminar ¹	99,6 Aa	99,1 ABa	0,72 ^{NS}
Fluxo contínuo de ar ¹	98,9 Aa	94,6 Bb	9,13 ^{**}
Câmara asséptica ¹	98,9 Aa	98,7 ABa	0,08 ^{NS}
Estufa a 30 °C	98,9 Aa	99,4 Aa	0,01 ^{NS}
Estufa a 35 °C	98,4 Aa	97,3 ABa	0,74 ^{NS}
Estufa a 40 °C	99,2 Aa	99,4 Aa	0,04 ^{NS}
Estufa a 45 °C	98,6 Aa	99,2 Aa	0,02 ^{NS}
Estufa a 50 °C	99,3 Aa	96,9 ABb	5,52 [*]
Estufa a 55 °C	98,9 Aa	72,9 Cb	97,82 ^{**}
Estufa a 60 °C	99,2 Aa	26,2 Db	473,65 ^{**}
Teste F	0,39 ^{NS}	98,56 ^{**}	-

¹Sob temperatura ambiente. Médias com valores originais, mas análise realizada com dados transformados em $\arcsin \sqrt{x/100}$. Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna ou minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$) NS não significativo; ** * significativo a 1% e a 5% de probabilidade, respectivamente.

O objetivo da secagem do material é reduzir o conteúdo de água disponível, mantendo-a num teor que permita conservar a viabilidade dos conídios durante o maior período possível de armazenamento. O método de secagem que proporcionou a maior perda do teor de umidade foi o fluxo contínuo de ar, não diferindo estatisticamente dos métodos fluxo laminar e estufa a 50 e 60°C (Tabela 5).

O fluxo contínuo de ar é um método viável e reproduzível em escala industrial, sendo apropriado para a secagem dos conídios de *B. euphorbiae*, uma vez que proporcionou a maior perda de umidade, embora com redução de 4,3% na germinação. As temperaturas de 55 e 60°C também proporcionaram acentuada perda de umidade mas ocasionaram grande redução da viabilidade dos conídios (Tabela 4 e 5). Possivelmente, estas temperaturas alteraram componentes bioquímicos da maquinaria metabólica do conídio interferindo negativamente na sua germinação.

Tabela 5 - Umidade perdida pelo material resultante do cultivo do fungo em meio sólido, após o emprego de diferentes métodos de secagem.

Método de secagem	Teor de umidade perdido (%)
Fluxo laminar ¹	54,00 AB
Fluxo contínuo de ar ¹	62,65 A
Câmara asséptica ¹	34,55 C
Estufa a 30°C	21,70 D
Estufa a 35°C	22,90 D
Estufa a 40°C	24,38 D
Estufa a 45°C	45,37 BC
Estufa a 50°C	50,66 AB
Estufa a 55°C	48,99 B
Estufa a 60°C	54,62 AB
Teste F	38,12**
CV (%)	5,62

¹Sob temperatura ambiente. Médias originais, porém análise realizada com dados transformados em log x. Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

**significativo a 1% de probabilidade, CV coeficiente de variação.

A tolerância à secagem é um fator que pode limitar o sucesso e a comercialização de bioherbicidas (MONTAZERI e GREAVES, 2002). A redução da atividade metabólica dos conídios reduz a perda de reservas de armazenamento e minimiza a produção de metabólitos tóxicos (GUIJARRO et al., 2006). Relatos encontrados na literatura sugerem que o teor de umidade ideal do substrato contendo os conídios varia de 10 a 30% (SILVA e MELLO, 2007; LOMER e LOMER, s.d.).

Os métodos de secagem comumente utilizados por indústrias no processamento de produtos à base de microrganismos são a liofilização, atomização e leito fluidizado (JIN e CUSTIS, 2011). Apesar da diferença de tecnologias e equipamentos utilizados entre esses métodos e os do presente trabalho, o que dificulta sobremaneira a comparação de resultados, a redução da viabilidade dos conídios de *B. euphorbiae* obtida após a secagem nas temperaturas mais altas, também foi observada quando outros patógenos foram secos pelos citados métodos (LARENA; MELGAREJO; de CAL, 2003; HORACZEK e VIERNSTEIN, 2004), com consequentes danos irreversíveis aos materiais biológicos devido ao calor excessivo e retirada de água (DAEMEN e VAN DER STEGE, 1982). Apesar de não terem proporcionado teores ideais de umidade, devido sua simplicidade, os métodos

empregados no presente trabalho podem contribuir para reduzir o custo de produção de um bioherbicida à base de *B. euphorbiae*.

3.4. Obtenção de conídios de *Bipolaris euphorbiae*

A análise fatorial dos dados mostrou que a interação métodos de obtenção *versus* situação de avaliação foi significativa ($F= 69,03^{**}$) e a partir do desdobramento desta interação foi possível observar os efeitos sobre a viabilidade dos conídios.

Não houve diferença significativa quanto à germinação dos conídios previamente secos antes de serem submetidos aos métodos de obtenção, demonstrando que todos os tratamentos continham inicialmente partículas viáveis (Tabela 6).

Tabela 6 - Desdobramento da interação métodos de obtenção *versus* situações de avaliação, significativa para a viabilidade de conídios de *Bipolaris euphorbiae*

Métodos de obtenção	Viabilidade dos conídios (%)		Teste F
	Situação de avaliação		
	Antes da obtenção ¹	Após obtenção	
Moinho de grãos	88,92 Aa	78,33 Bb	8,20**
Moinho de martelo	93,85 Aa	83,95 Bb	10,46**
Moinho de bola	91,20 Aa	12,60 Cb	340,16**
Peneiramento	94,87 Aa	94,82 Aa	0,01 ^{NS}
Teste F	2,00 ^{NS}	151,36**	

¹Secagem do meio sólido contendo o fungo em fluxo contínuo de ar sob temperatura ambiente. Médias com valores originais, mas análise realizada com dados transformados em $\arcsin \sqrt{x/100}$. Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna ou minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). NS não significativo; ** significativo a 1% de probabilidade.

Os métodos de obtenção de conídios por meio de moagem do material possivelmente provocaram danos na estrutura física e integridade dos conídios, reduzindo significativamente a germinação destes, especialmente no moinho de bola, cuja redução foi de 86%. A agressividade apresentada por este método se deve ao impacto intermitente de uma esfera de inox contra a parede da câmara de moagem e que provoca a redução das amostras a um pó fino. A obtenção por meio de peneiramento, embora de simples execução, foi a mais apropriada, permitindo extrair conídios com alta viabilidade (Tabela 6).

Não foram encontrados na literatura trabalhos realizados com o intuito de avaliar métodos de extração de conídios, o que justifica a necessidade de investigar essa pré-etapa do processo de formulação de bioprodutos. É importante considerar que o método de obtenção de conídios deverá ser compatível com o tipo de formulação pretendida. Seja ela qual for, o produto deve ser primeiramente submetido à secagem, a fim de assegurar que os conídios se manterão viáveis durante o armazenamento (LOMER e LOMER, s.d.).

4. CONCLUSÕES

- O período de incubação influencia a produção de *B. euphorbiae* tanto no meio sólido como no sistema bifásico.
- O volume de inóculo líquido usado para semear o meio sólido, não incrementa a produção do fungo pelo sistema bifásico, comparado ao sistema convencional de cultivo.
- Os métodos de secagem e obtenção de conídios afetam a viabilidade de *B. euphorbiae*.

5. REFERÊNCIAS

BARRETO, R.W. Controle Biológico de Plantas Daninhas com Fitopatógenos. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Eds). Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. 1st ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente; 2009. p.101-128.

BARRETO, R.W.; EVANS, H.C. Fungal pathogens of *Euphorbia heterophylla* and *E. hirta* in Brazil and their potential as weed biocontrol agents. **Mycopathologia**, The Hague, v.141, n.1, p.21-36, 1998.

CHURCHILL, B.W. Mass production of microorganisms for biological control of weeds with plant pathogens. In: CHARUDATTAN, R.; WALKER, H.L. (Eds.). **Biological control of weeds with plant pathogens**. New York: John Willy e Sons; 1982. p.139-156.

DAEMEN, A.L.H.; VAN DER STEGE, H.J. The destruction of enzymes and bacteria during the spray drying of milk and whey. 2. The effect of the drying conditions. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, Wageningen, v.36, n.3, p.211-229, 1982.

ESTAT: sistema para análise estatística. Versão 2.0. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 1997. Disponível em <http://www.fcav.unesp.br/download2/software/estat/>./> Acesso em: 10 abr. 2012.

FRANCISCO, E.A.; MOCHI, D.A.; CORREIA, A.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.

GUIJARRO, B.; LARENA, I.; MELGAREJO, P.; de CAL, A. Effect of drying on conidial viability of *Penicillium frequentans*, a biological control agent against peach brown rot disease caused by *Monilinia* spp. **Biocontrol Science and Technology**, Abingdon, v.16, n.3, p.257-269, 2006.

HORACZEK, A.; VIERNSTEIN, H. Comparison of three commonly used drying technologies with respect to activity and longevity of areal conidia of *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. **Biological Control**, San Diego, v.31, n.1, p.65-71, 2004.

JIN, X.; CUSTIS, D. Microencapsulating aerial conidia of *Trichoderma harzianum* through spray drying at elevated temperatures. **Biological Control**, San Diego, v.56, n.2, p.202-208, 2011.

LARENA, I.; MELGAREJO, P.; de CAL, A. Drying of conidia of *Penicillium oxalicum*, a biological control agent against *Fusarium* wilt of tomato. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.151, p.600-606, 2003.

LIMA, B.V.; SOARES, D.J.; BARRETO, R.W. Inoculum density of *Plectosporium alismatis*, a potential mycoherbicide, in relation to control of the aquatic weed *Sagittaria montevidensis*. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v.35, n.4, p.239-240, 2010.

LOMER, C.H.; LOMER, C.J. (Eds.) (s.d.) **Insect Pathology Manual**. Section VII – Field Experimental Lubilosa Project, International Institute of Tropical Agriculture. Disponível em <http://www.lubilosa.org/Engl07a.PDF>. Acesso em 20 de abr de 2010.

LORENZI, H. **Plantas Daninhas no Brasil**. Nova Odessa: Editora Plantarum; 2000. 608p.

MACHADO, A.C.R.; MONTEIRO, A.C.; ALMEIDA, A.M.B.; MARTINS, M.I.E.G. Production technology for entomopathogenic fungus using a biphasic culture system. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.45, n.10, p.1157-1163, 2010.

MONTAZERI, M.; GREAVES, M.P. Effects of nutrition on desiccation tolerance and virulence of *Colletotrichum truncatum* and *Alternaria alternata* conidia. **Biocontrol Science and Technology**, Abingdon, v.12, n.2, p.173-181, 2002.

MORAES, C. **Produção massal e influência de fatores físicos no cultivo e viabilidade de *Bipolaris euphorbiae***. 2009. 75f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal, 2009.

MORANDI, M.A.B.; BETTIOL, W. Controle Biológico de Doenças de Plantas Daninhas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Eds). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. 1st ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente; 2009. p.7-14.

PENARIOL, M.C.; MONTEIRO, A.C.; PITELLI, R.A.; PEREIRA, G.T. Produção de *Bipolaris euphorbiae* em meios de cultura sólidos e líquidos obtidos de grãos e resíduos agroindustriais. **Bragantia**, Campinas, v.67, n.4, p.805-814, 2008.

PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; MACDONALD, K.D.; BUFTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, New York, v.5, p.141-238, 1953.

SILVA, J.B.T.; MELLO, S.C.M. **Utilização de *Trichoderma* no controle de fungos fitopatogênicos**. 1st ed. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; 2007.

STOWELL, L.J. Submerged fermentation of biological herbicides. In: TeBeest DO (ed). **Microbial Control of Weeds**. New York: Chapman and Hall; 1991. p. 225-261.

TREZZI, M.M.; FELIPPI, C.L.; MATTEI, H.L.; SILVA, A.L.; DEBASTIANI, C.; VIDAL, R.A.; MARQUES, A. Multiple resistance of acetolactase synthase and protoporphyrinogen oxidase inhibitors in *Euphorbia heterophylla* biotypes. **Journal of**

Environmental Science and Health - Part B - Pesticides, food contaminants and agricultural wastes, New York, v.40, n.1, p.101-109, 2005.

VIDAL, R.A.; MEROTTO Jr, A. Resistência de amendoim-bravo aos herbicidas. In: VIDAL, R.A.; MEROTTO Jr, A. (Eds). **Herbicidologia**. Porto Alegre: Evangraf; 2001. p.138-148.

VIDAL, R.A.; TRENZZI, M.M.; de PRADO, R.; RUIZ-SANTAELLA, J.P.; VILA-AIUB, M. Glyphosate resistant biotypes of wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla* L.) and its risk analysis on glyphosate-tolerant soybeans. **Journal of Food Agriculture and Environment**, Helsinki, v.5, n.2, p.265-269, 2007.

CAPÍTULO 3 - PERFIL DE TOXICIDADE DE ADJUVANTES AO FUNGO *Bipolaris euphorbiae* E AVALIAÇÃO DE SUA VIABILIDADE E INFECTIVIDADE APÓS FORMULADO

RESUMO - A incorporação de adjuvantes às formulações pode influenciar positivamente no desempenho do bioagente de controle, contribuindo para a preservação do inóculo até a fase de uso. Os adjuvantes devem ser atóxicos ao patógeno e testes que avaliam a sensibilidade do agente biológico aos produtos são imprescindíveis. O armazenamento por longo período, mantendo a viabilidade e infectividade do patógeno, representa um dos maiores desafios para viabilizar comercialmente o uso de bioprodutos. O presente trabalho teve por objetivos determinar a toxicidade de adjuvantes ao fungo *Bipolaris euphorbiae* a fim de selecionar produtos para compor uma formulação, avaliar a viabilidade do fungo formulado e armazenado sob diferentes condições e testar a infectividade da formulação em *Euphorbia heterophylla* (amendoim-bravo). Foram testados os fotoprotetores NeoHeliopan AV[®], NeoHeliopan Hydro[®], NeoHeliopan E1000[®], Eusolex 232[®], Tinosorb M[®], Eusolex 6007[®] e o complexo de filtros UVA/UVB; os surfactantes Triton X-100[®], Ultrol IT 80[®], Ultranex NP 95[®], Unitol L 20[®] e Tween 80[®]; os antiumectantes celulose microcristalina, carbonato de sódio anidro, óxido de magnésio, talco, carbonato de cálcio e dióxido de silício; e os espalhantes adesivos DuFol[®], Haiten[®], Agral[®], Energic[®] e PVP K-30[®], nas concentrações de 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 e 1%. Os parâmetros avaliados foram germinação, crescimento vegetativo e esporulação e a classificação toxicológica foi determinada com base no cálculo do índice biológico. Apenas o fotoprotetor NeoHeliopan AV[®] nas concentrações de 0,5 e 1%, foi considerado tóxico ao fungo, inibindo completamente o seu desenvolvimento. Em contrapartida todas as concentrações de Tinosorb M[®] se mostraram compatíveis com o fungo. A germinação dos conídios foi o parâmetro que sofreu menor influência da presença dos surfactantes em meio de cultura, com exceção do Triton X-100[®]. Todos os produtos, exceto Unitol L20[®] a 0,01% e Tween 80[®] nas concentrações de 0,01 a 0,5%, foram considerados tóxicos ou moderadamente tóxicos ao fungo. Os antiumectantes carbonato de cálcio, talco, celulose microcristalina e dióxido de silício

não interferiram no desenvolvimento do fungo, especialmente quanto a germinação e crescimento, sendo considerados compatíveis. Os espalhantes adesivos testados influenciaram em um ou mais parâmetros avaliados, sendo a maioria, considerados tóxicos ou moderadamente tóxicos. O produto Haiten[®] (0,01%) mostrou-se compatível ao fungo, apresentando uma margem de segurança para seu uso, uma vez que foi considerado atóxico, mesmo utilizado em concentração cinco vezes maior (0,05%) do que a recomendada. Para compor a formulação, os conídios do fungo foram misturados ao dióxido de silício (1%) e armazenados sob refrigeração (4°C) e em temperatura ambiente, durante 245 dias. A viabilidade foi avaliada mensalmente. Após este período, não houve diferença significativa na capacidade de germinação dos conídios armazenados sob refrigeração, que foi mantida maior que 89%. No armazenamento em temperatura ambiente observou-se uma redução considerável na viabilidade entre a primeira (97,7%) e a última avaliação (35,2%). Para avaliar a infectividade, a calda de pulverização foi composta pela mistura, em água, dos adjuvantes Tinosorb M[®] (1%), Haiten (0,01%), Tween 80[®] (0,1%) e PVP K-30[®] (0,1%) e os conídios em pó + dióxido de silício. Os tratamentos controle foram compostos por água destilada, e por calda contendo a mistura dos adjuvantes, exceto o antiumectante. A formulação não provocou a morte das plantas, porém sintomas típicos de infecção causados pelo fungo foram observados.

Palavras-chave: formulação, fotoprotetores, surfactantes, antiumectantes, agentes adesivos, armazenamento.

CHAPTER 3 - TOXICITY PROFILE OF ADJUVANTS TO *Bipolaris euphorbiae* AND EVALUATION OF VIABILITY AND INFECTIVITY AFTER FORMULATION

ABSTRACT - Adjuvants incorporation at formulations can positively influence the performance of bioagent control, contributing to preservation of the inoculum until being used. Adjuvants should not be toxic to pathogen and tests that evaluate the sensitivity of biologic products are essential. The storing for long periods of time should maintain the viability and infectivity of the pathogen, and represents a major challenge to make them commercially viable. The present study aimed to determine the toxicity of adjuvants to the fungus *Bipolaris euphorbiae* to select products to compose a formulation, evaluate the viability of the fungus formulated and stored under different conditions and test the infectivity of the formulation in *Euphorbia heterophylla* (wild poinsettia). Was tested the sunscreens NeoHeliopan AV[®], NeoHeliopan Hydro[®], NeoHeliopan E1000[®], Eusolex 232[®], Tinosorb M[®], Eusolex 6007[®] and complex filters UVA / UVB; the surfactants Triton X-100[®], Ultrol IT 80[®], Ultranex NP 95[®], Unitol L 20[®] and Tween 80[®], the anti-humectants microcrystalline cellulose, anhydrous sodium carbonate, magnesium oxide, talc, calcium carbonate and silicon dioxide; the spreaders-stickers DuFol[®], Haiten[®], Agral[®], Energic[®] and PVP K-30[®], at concentrations of 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 and 1%. The evaluated parameters were germination, vegetative growth and sporulation and toxicological classification was determined based on the biological index calculation. Only the sunscreen NeoHeliopan AV[®] at 0.5 and 1% concentration was considered toxic to fungus by inhibiting completely its development. In contrast, all concentrations of Tinosorb M[®] were compatible with the fungus. Conidial germination was the parameter that suffered less influence of the presence of surfactants in the culture medium, except for Triton X-100. All products, except Unitol at 0.01% and Tween at 0.01 and 0.05%, were considered toxic or moderately toxic to the fungus. The anti-humectants calcium carbonate, talc, microcrystalline cellulose and silicon dioxide did not affect the development of the fungus, especially for germination and growth and were considered compatible. The spreaders-stickers tested influence on one or more parameters, mostly considered toxic or moderately toxic. Haiten[®] (0.01%) was

compatible to the fungus, providing a safety margin to its use, since it was considered non-toxic, even used at a concentration five times greater (0.05%) than the recommended dose. To compose the formulation, fungal conidia were mixed with silicon dioxide and stored under refrigeration and at room temperature for 245 days. The viability was monthly evaluated. After this period, there was no significant difference in germination capacity of conidia stored under refrigeration, which remained greater than 89%. Storing at room temperature revealed a considerable reduction in viability between the first (97.7%) and the final evaluation (35.2%). To evaluate the infectivity, the spray solution was made by mixing, in water, the adjuvants Tinosorb M[®] (1%), Haiten[®] (0.01%), Tween 80[®] (0.1%) and PVP K-30[®] (0,1%) with conidia powder + silicon dioxide. The control treatments were composed of distilled water, and spray solution containing the mixture of the adjuvants, except anti-humectant agent. Although formulation did not cause plant death, typical symptoms of infection caused by the fungus were observed.

Keywords: formulation, sunscreens, surfactants, anti-humectants, adhesives agents, storage

1. INTRODUÇÃO

O controle de plantas daninhas vem assumindo um papel de destaque no manejo de culturas economicamente importantes. A seleção de biótipos resistentes a herbicidas, preocupações com questões ambientais e a necessidade de redução dos custos de produção, são aspectos que impulsionam a busca de novas estratégias para o controle de plantas daninhas (CALDWELL et al., 2012). O uso de patógenos específicos, pelo emprego de bioherbicidas, é uma estratégia com potencial de uso, considerada prática, segura e ambientalmente benéfica.

O desenvolvimento de bioherbicidas implica na necessidade de encontrar tecnologias apropriadas para produção massal, formulação e preservação do inóculo até a fase de uso (TESSMANN, 2011). Um dos aspectos que limitam os avanços desta prática de controle é a obtenção de formulações adequadas. Tal fato ocorre a partir da necessidade de se acrescentar ao agente de controle compostos que aumentem sua eficiência e estabilidade, permitindo a manutenção do patógeno no ambiente e aumentando a possibilidade de atingir e agredir a planta-alvo (LOUREIRO et al., 2003; CALDWELL et al., 2012), dentre outros aspectos. Para que sejam comercialmente competitivos, é fundamental prolongar a vida útil (vida de prateleira) dos bioprodutos, ou seja, o período cujos propágulos do patógeno permanecem viáveis e infectivos (ELZEIN; KROSCHER; CADISCH, 2008).

A incorporação de adjuvantes às formulações pode influenciar positivamente no desempenho dos conídios (WRAIGHT; JACKSON; DE KOCK, 2001), mantendo baixo o teor de água disponível o que evita sua germinação, promovendo a adesão, espalhamento uniforme dos conídios, proteção contra a radiação UV e também a retenção das gotas pulverizadas sobre a superfície foliar, dentre outros aspectos (GREAVES e MACQUEEN, 1990; WOMACK e BURGE, 1993; PRASAD, 1994). Além disso, podem induzir fitotoxicidade sobre a planta-alvo por meio de alteração na morfologia da cera epicuticular ou causar lesões ao tecido da folha, permitindo que o microrganismo atue com maior eficiência (FALK; GUGGENHEIM; SCHULKE, 1994). No entanto, os adjuvantes podem ser tóxicos ao bioagente de controle, sendo imprescindível que haja testes que avaliem a toxicidade para o microrganismo específico (WYSS et al., 2004).

A temperatura na qual uma formulação biológica é mantida durante armazenagem é um fator abiótico que pode influenciar a vida útil do bioproduto (ELZEIN; KROSCHER; MÜLLER-STÖVER, 2004). Segundo estes autores, o armazenamento sob baixas temperaturas permite manter o patógeno em um estado fisiologicamente dormente. Ainda, a sobrevivência do patógeno pode ser incrementada pelo uso de embalagens adequadas (TESHLER et al., 2007).

Bipolaris euphorbiae é um patógeno específico de *Euphorbia heterophylla* L. (leiteiro), uma das mais importantes plantas daninhas da soja. Para que possa ser usado como bioagente de controle é necessário desenvolver uma formulação do fungo.

Dentre os adjuvantes passíveis de utilização em uma formulação, apenas foram encontrados na literatura trabalhos abordando a influência de surfactantes (tensoativos) e espalhantes adesivos sobre *B. euphorbiae*, uma vez que são produtos comumente associados à aplicação de herbicidas químicos para o controle de plantas daninhas (GAZZIERO e YORINORI, 1993; TOFFANELLI, 1997; NEMOTO et al., 2002). Não foram encontrados estudos sobre formulação à base do fitopatógeno e sua vida de prateleira, uma vez que tais investigações não são divulgadas pelas empresas, o que dificulta os avanços da ciência nessas áreas (GLARE et al., 2012). Portanto, há necessidade de conduzir estudos que analisem a compatibilidade de diversas classes de adjuvantes com *B. euphorbiae*, para obter uma formulação que viabilize sua inclusão como bioagente de controle de *E. heterophylla* em programas de manejo integrado.

O presente trabalho teve por objetivos determinar a toxicidade de adjuvantes ao fungo *Bipolaris euphorbiae*, selecionar produtos para compor uma formulação à base do fungo, avaliar a estabilidade desta formulação armazenada em temperatura ambiente e sob refrigeração e verificar a infectividade em *Euphorbia heterophylla*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Toxicidade dos adjuvantes ao *Bipolaris euphorbiae*

Foi utilizado o isolado FCAV # 569 de *B. euphorbiae*, obtido por pesquisadores do Centro Nacional de Pesquisa em Soja da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA/CNSo) e mantido estocado, sob refrigeração, em tubos de ensaio contendo o meio de batata-dextrose-ágar (BDA). Para utilização nos ensaios o fungo foi cultivado em placas de Petri contendo o meio mínimo de PONTECORVO et al. (1953), modificado por PENARIOL et al. (2008), com a adição de peptona (2 g L^{-1}) e substituição de glicose por amido, mantidos a $25 \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 dias e fotoperíodo de 12 horas.

Os adjuvantes avaliados e suas respectivas funções estão apresentados na Tabela 1. Todos os produtos foram testados nas concentrações de 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 e 1%, arbitrariamente definidas.

Frascos contendo o meio mínimo de Pontecorvo liquefeito, mantido em temperatura próxima a 45°C , para evitar alterações das propriedades dos produtos, receberam quantidades pré-determinadas dos adjuvantes para obter as concentrações desejadas. Posteriormente os meios foram vertidos em placas de Petri de 100 mm e o tratamento controle composto apenas pelo meio mínimo, isento de qualquer produto.

Após a solidificação do meio de cultura, o fungo foi inoculado por meio da transferência de um disco de 5 mm de diâmetro, obtido de colônias com 10 dias de incubação, para o centro da placa de Petri, sendo posteriormente mantido sob as mesmas condições de temperatura, período de incubação e fotoperíodo mencionados.

Os parâmetros de avaliação do desempenho do fungo foram: germinação dos conídios, crescimento vegetativo e esporulação.

A germinação foi avaliada por microcultivo em lâminas e exame direto ao microscópio, segundo metodologia descrita por FRANCISCO et al. (2006). Em lâminas de microscopia esterilizadas foram previamente marcados três campos e a superfície recoberta com 4 mL de meio mínimo contendo os produtos nas respectivas concentrações. Na região do meio de cultura correspondente a cada campo foi inoculado 0,1 mL de uma suspensão fúngica com concentração de 1×10^6 con. mL^{-1} , e as culturas incubadas a $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 7 horas. Após esse período, o processo de germinação foi interrompido, pingando-se uma gota de corante [1 mL

de solução estoque (1 g de azul de metileno em 20 mL de ácido láctico) adicionada em 29 mL de ácido láctico] em cada campo. Foram observados 150 conídios por campo, entre germinados e não germinados, estabelecendo-se uma relação, em porcentagem, de conídios viáveis. O crescimento da colônia foi aferido por meio da medição, em milímetros, de dois diâmetros perpendiculares previamente marcados na parte externa do fundo das placas de Petri. As medidas foram realizadas a cada dois dias até o 10º dia de incubação. Após esse período, o conteúdo da colônia foi removido por meio de raspagem e transferido para tubos de ensaio contendo 9 mL de solução de Tween 80® (0,1% v v⁻¹). A partir da suspensão obtida foi determinado o número de conídios produzidos por meio de contagem em câmara de Neubauer.

Os ensaios foram conduzidos no delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), composto por 4 repetições para a avaliação da viabilidade dos conídios e 6 para o crescimento vegetativo. Das placas usadas para medir o crescimento, 4 foram arbitrariamente escolhidas para compor as repetições do ensaio em que se avaliou a esporulação do fungo.

Para determinar a toxicidade dos adjuvantes ao fungo, foi utilizado o modelo IB (índice biológico) descrito por ROSSI-ZALAF et al. (2008), calculado pela fórmula:

$$IB = \frac{47[CV] + 43[ESP] + 10[GER]}{100}$$

Em que:

IB= índice biológico

CV= porcentagem de crescimento vegetativo da colônia após 10 dias de incubação, em relação à testemunha

ESP= porcentagem de esporulação após 10 dias de incubação, em relação à testemunha

GERM= porcentagem de germinação dos conídios após 7 horas de incubação.

Usando os valores do IB fez-se a classificação toxicológica das adjuvantes pela escala descrita por ROSSI-ZALAF et al. (2008) e que considera como tóxico (IB entre 0 e 41), moderadamente tóxico (IB entre 42 e 66) e compatível (IB acima de 66).

Tabela 1 - Adjuvantes químicos avaliados quanto à compatibilidade com *Bipolaris euphorbiae*, para compor uma formulação à base do fungo.

Produto (nome comercial)	Nome químico ou composição	Função
NeoHeliopan AV [®]	Metoxinamato de octila	Fotoprotetor
NeoHeliopan Hydro [®]	Benzofenona 4	Fotoprotetor
NeoHeliopan E1000 [®]	Isoamilmetoxinamato	Fotoprotetor
Eusolex 232 [®]	Ácido fenil-benzimidazol sulfônico	Fotoprotetor
Tinosorb M [®]	Metil – bis - benzotriazolil tetram etilbutilfenol	Fotoprotetor
Eusolex 6007 [®]	Octil dimetil PABA	Fotoprotetor
Complexo de filtros UVA/UVB	Benzofenona 4 + ácido fenil- benzimidazol sulfônico	Fotoprotetor
Triton X-100 [®]	Octilfenolpoli (etilenoglicoleter)	Tensoativo
Ultral IT 80 [®]	Álcool isotridecílico etoxilado	Tensoativo
Ultrane NP 95 [®]	Nonilfenol etoxilado	Tensoativo
Unitol L-20 [®]	Álcool laurico etoxilado	Tensoativo
Tween 80 [®]	Monooleato de sorbitan etoxilado	Tensoativo
Celulose microcristalina	-	Antiumectante
-	Carbonato de sódio anidro	Antiumectante
-	Óxido de magnésio	Antiumectante
Talco	-	Antiumectante
-	Carbonato de cálcio	Antiumectante
-	Dióxido de silício	Antiumectante
DuFol [®]	Éter poliglicólico de nonifenol	Espalhante adesivo
Haiten [®]	Polioxietileno alquil fenol éter	Espalhante adesivo
Agral	Nonil fenoxi poli (etilenoxi) etanol	Espalhante adesivo
Energic [®]	Nonil fenoxi poli (etilenoxi) etanol + sal sódico ácido dodecilbenzeno sulfônico	Espalhante adesivo
PVP K-30 [®]	Polivinilpirrolidona	Adesivo (Fixador)

2.2. Composição da formulação à base de *Bipolaris euphorbiae*

Para compor a formulação desenvolvida no presente estudo, o fungo foi produzido em meio sólido composto pela mistura de casca de soja e sorgo em grão (60:40), conforme descrito (item 2.2.1) e resultado obtido (item 3.1) no capítulo 2. Posteriormente o material (fungo + substrato) foi submetido à secagem em temperatura ambiente sob fluxo contínuo de ar (pressão de $3,5 \pm 0,3 \text{ Kgf cm}^{-2}$ e vazão de 15 L min^{-1}), até peso constante, conforme descrito e resultados obtidos nos itens 2.7 e 3.3 do capítulo 2, respectivamente. Após esta pré-etape foi feita a extração seca de conídios por meio de simples peneiramento, utilizando-se inicialmente uma peneira com malha de 1mm, agitada manualmente por 10 minutos, seguida de outra com malha de 0,25mm para remoção de impurezas (itens 2.8 e 3.4 do capítulo 2).

A escolha dos adjuvantes a serem adicionados à formulação foi determinada segundo resultados apresentados nos itens 3.1 a 3.4 do presente capítulo. Apenas o antiumectante foi incorporado aos conídios extraídos, para evitar absorção de água do ambiente e germinação durante o armazenamento. Os demais adjuvantes foram adicionados no momento do uso da formulação.

2.3. Avaliação da viabilidade de *Bipolaris euphorbiae* durante o período de armazenamento da formulação

Após vigorosa agitação para homogeneizar a mistura do antiumectante com os conídios em pó, o material foi dividido em porções de 0,1 g e acondicionado em frascos de vidro hermeticamente vedados para avaliação da viabilidade.

Os frascos permaneceram armazenados em temperatura ambiente e a 4°C no refrigerador por 245 dias. A quantidade de conídios foi calculada de modo a obter a concentração de 10^6 conídios g^{-1} da preparação.

A viabilidade dos conídios foi avaliada mensalmente, de acordo com metodologia descrita por FRANCISCO et al. (2006).

Para análise dos dados foi usado um esquema fatorial com dois fatores, sendo estes: condição de armazenamento (temperatura ambiente e refrigeração) *versus* tempo (dias), contando com 5 repetições por tratamento.

2.4. Avaliação da infectividade de *Bipolaris euphorbiae* em *Euphorbia heterophylla*, após formulação

O ensaio foi desenvolvido no Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia (NEPEAM) da FCAV/UNESP – Jaboticabal. Os volumes do surfactante, fotoprotetor, espalhante adesivo e adesivo (selecionados com base nos resultados obtidos nos itens 3.1 a 3.4 do presente capítulo) necessários para obter as respectivas concentrações na calda de pulverização foram calculados e diluídos em 20 mL de água. No momento da pulverização adicionou-se mais 20 mL de água, e após vigorosa agitação acrescentou-se 0,4 g da mistura contendo os conídios e o antiumectante (definido conforme apresentado no item 3.3). Tal quantidade da mistura foi calculada para obter a concentração de 10^6 conídios mL^{-1} de calda preparada.

Foram utilizadas 30 plantas de *E. heterophylla*, contendo de 6 a 10 folhas e divididas em 3 grupos homogêneos: 1) pulverizadas com água destilada; 2) pulverizadas com a mistura dos adjuvantes, exceto o antiumectante; 3) pulverizadas com a calda formada pelos conídios do fungo e os adjuvantes.

Cada planta foi pulverizada com 3 mL das respectivas caldas, utilizando um pulverizador manual. A calda contendo o fungo foi filtrada em tecido *voile* para evitar o entupimento do bico do pulverizador. Após a pulverização as plantas permaneceram em temperatura ambiente (4 a 5 horas) para secagem da calda na superfície da planta, sendo em seguida transferidas para sala climatizada sob condições controladas de temperatura (25°C) e iluminação contínua por 24 h por 20 dias.

Foram avaliados os seguintes sintomas: necrose de borda, necrose pontual, clorose, queda foliar, efeito de murchamento, manchas no caule, perda de sustentação do caule, indução de inflorescência. Avaliou-se ainda a altura do caule.

2.5. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Para execução das análises estatísticas foi utilizado o programa ESTAT (1997), versão 2.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Toxicidade dos fotoprotetores ao *Bipolaris euphorbiae*

Dentre os parâmetros que compuseram o IB, a esporulação do fungo foi o que sofreu maior influência, comparando-se com o controle (Tabelas 2 e 3). Os demais parâmetros foram menos afetados pela ação da maioria dos produtos testados, embora tenham ocorrido diferenças significativas em relação ao controle em alguns tratamentos.

Apenas o produto NeoHeliopan AV® nas concentrações de 0,5 e 1%, foi considerado tóxico ao fungo, inibindo completamente a germinação, crescimento e esporulação (Tabela 2). O derivado químico que compõe este produto comercial é um dos mais utilizados na proteção da radiação UVB do espectro eletromagnético (MONTEIRO, 2008) e de acordo com a legislação brasileira a concentração permitida de uso varia de 2 a 7,5%, para formulações desenvolvidas pela indústria farmacêutica. No presente trabalho as concentrações utilizadas foram consideravelmente menores do que o indicado, sendo que apenas 0,01; 0,05 e 0,1% do produto se mostraram compatíveis ao fungo (Tabela 2).

Todas as concentrações de NeoHeliopan Hydro®, assim como 0,1; 0,5 e 1% de NeoHeliopan E1000®, foram consideradas moderadamente tóxicas ao fungo, mas quando usado na concentração de 0,01 e 0,05% este último produto se mostrou compatível com o fungo (Tabela 2).

A germinação e esporulação de *B. euphorbiae* em presença de Tinosorb M® não diferiram significativamente do controle e para o crescimento radial não houve diferença que justificasse a realização de análise estatística (Tabela 3). Baseado nestes dados, o cálculo do índice biológico variou de 81 a 95, o que classifica este produto, em todas as concentrações testadas, como compatível com o fungo. Este

fotoprotetor, considerado de última geração, vem sendo amplamente utilizado em todo o mundo e caracteriza-se por ser o único filtro orgânico constituído por partículas microfinas e cuja ação de proteção UV consiste na absorção, reflexão e dispersão (LIM; THOMAS; RIGEL, 2005). Além disso, é um produto fotoestável; característica importante no desenvolvimento de formulações que contenham filtros solares, uma vez que podem interagir com outros compostos da formulação que podem estar sujeitos à degradação resultante da exposição à radiação UV (MESTRES et al., 1997; WISSING e MULLER, 2001).

Tabela 2 - Toxicidade dos fotoprotetores NeoHeliopan Hydro®, NeoHeliopan AV® e NeoHeliopan E1000® para *Bipolaris euphorbiae* cultivado em meio de cultura contendo diversas concentrações dos produtos.

Fotoprotetores e concentrações	Viabilidade (%)	Crescimento (mm)	Esporulação (nº de con.x10 ⁶)	IB	Classificação toxicológica
NeoHeliopan Hydro®					
Controle	87,7 A	99,0 A	7,8 A		-
0,01%	86,2 A	85,5 AB	4,1 BC	64	MT
0,05%	81,8 A	84,6 BC	3,5 BC	62	MT
0,1%	81,4 A	77,3 D	6,1 B	64	MT
0,5%	81,8 A	79,8 CD	1,3 D	52	MT
1%	80,4 A	78,3 D	2,1 CD	55	MT
Teste F	1,21 ^{NS}	19,81 ^{**}	22,54 ^{**}	-	-
CV (%)	6,15	2,69	9,22	-	-
NeoHeliopan AV®					
Controle	88,3 A	90,0 A	1,6 A	-	-
0,01%	80,0 B	90,0 A	0,9 AB	80	C
0,05%	88,1 A	90,0 A	1,8 A	107	C
0,1%	84,3 AB	60,8 B	1,7 A	91	C
0,5%	0,0 C	0,0 C	0,0 B	0	T
1%	0,0 C	0,0 C	0,0 B	0	T
Teste F	1129,97 ^{**}	164,14 ^{**}	6,75 ^{**}	-	-
CV (%)	3,02	12,51	6,06	-	-
NeoHeliopan E1000®					
Controle	95,6 A	90,0 A	1,7 A	-	-
0,01%	94,4 AB	90,0 A	1,4 AB	92	C
0,05%	90,5 B	90,0 A	1,2 ABC	87	C
0,1%	81,9 C	63,3 C	0,6 BCD	56	MT
0,5%	79,5 C	66,8 B	0,3 CD	50	MT
1%	78,1 C	65,8 B	0,2 D	48	MT
Teste F	39,26 ^{**}	559,03 ^{**}	8,32 ^{**}	-	-
CV (%)	2,77	0,75	3,55	-	-

Valores originais, mas análises estatísticas de esporulação e viabilidade realizadas com dados transformados em log x e arc sen x/100, respectivamente Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). NS não significativo, ** significativo a 1% de probabilidade, IB Índice biológico. CV coeficiente de variação. MT moderadamente tóxico, C compatível, T tóxico.

Os demais fotoprotetores foram compatíveis ao fungo nas concentrações de 0,01 a 0,1% (Tabela 3), exceto o complexo de filtros UVA/UVB a 0,05% que foi considerado moderadamente tóxico (IB=66).

Tabela 3 - Toxicidade dos fotoprotetores Tinosorb M®, Complexo de filtros UVA/UVB e Eusolex 232® e Eusolex 6007® para *Bipolaris euphorbiae* cultivado em meio de cultura contendo diversas concentrações dos produtos

Fotoprotetores e concentrações	Viabilidade (%)	Crescimento (mm)	Esporulação (nº de con x 10 ⁶)	IB	Classificação toxicológica
Tinosorb M					
Controle	98,2 A	90,0	3,1 A	-	-
0,01%	98,8 A	90,0	1,7 A	81	C
0,05%	98,4 A	90,0	1,9 A	83	C
0,1%	98,7 A	90,0	2,7 A	95	C
0,5%	98,8 A	90,0	2,3 A	89	C
1,0%	98,7 A	90,0	1,8 A	82	C
Teste F	0,30 ^{NS}	-	0,66 ^{NS}	-	-
CV (%)	2,28	-	8,79	-	-
Complexo de filtros UVA/UVB					
Controle	98,4 A	90,0 A	3,2 A	-	-
0,01%	98,8 A	90,0 A	0,9 B	76	C
0,05%	98,9 A	90,0 A	0,7 B	66	MT
0,1%	98,6 A	90,0 A	0,8 B	68	C
0,5%	98,6 A	90,0 A	0,4 B	62	MT
1,0%	98,7 A	81,0 B	0,5 B	59	MT
Teste F	0,08 ^{NS}	152,78**	5,82**	-	-
CV (%)	2,13	0,34	6,42	-	-
Eusolex 232					
Controle	97,6 AB	90,0 A	1,8 A	-	-
0,01%	98,3 A	90,0 A	0,8 BC	75	C
0,05%	97,4 AB	90,0 A	0,7 BC	75	C
0,1%	97,4 AB	90,0 A	1,1 AB	83	C
0,5%	96,6 B	90,0 A	0,4 C	55	MT
1,0%	97,0 AB	65,5 B	0,3 C	50	MT
Teste F	3,85**	5461,68**	12,36**	-	-
CV (%)	1,26	0,65	2,53	-	-
Eusolex 6007					
Controle	97,9 A	90,0	1,6 A	-	-
0,01%	98,7 A	90,0	1,0 AB	95	C
0,05%	98,3 A	90,0	0,7 BC	75	C
0,1%	97,7 A	90,0	0,6 BC	73	C
0,5%	96,8 A	90,0	0,4 BC	67	C
1,0%	96,8 A	90,0	0,2 C	62	MT
Teste F	2,32 ^{NS}	-	8,50**	-	-
CV (%)	1,99	-	2,93	-	-

Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). NS não significativo, ** significativo a 1% de probabilidade, IB Índice biológico. CV coeficiente de variação. MT. moderadamente tóxico, C. compatível, T. tóxico

Os efeitos adversos da radiação UVB e da radiação solar na germinação de conídios foram demonstrados em vários trabalhos (RANGEL et al., 2004; RANGEL et al., 2005; BRAGA et al., 2006). Dentre os danos, destacam-se os efeitos sobre a membrana citoplasmática, organelas e ao DNA que resultam no atraso da germinação, inativação de conídios e, conseqüentemente, redução da atividade do fungo sobre a praga-alvo (EDGINGTON et al., 2000; RANGEL et al., 2006; CHELICO e KHACHATOURIANS, 2008).

Apesar da ampla gama de fotoprotetores disponíveis no mercado e com potencial para uso em formulações de produtos biológicos, estudos envolvendo a compatibilidade destes produtos com agentes fúngicos de controle, são escassos na literatura, principalmente com fitopatógenos, o que justifica a importância dessa pesquisa.

A compatibilidade dos fotoprotetores Oxibenzona®, NeoHeliopan AV® e NeoHeliopan E1000® com o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* foi avaliada por SANTOS et al. (2011). Os autores observaram que diferentes concentrações dos produtos não causaram efeitos deletérios sobre a germinação e consideraram os produtos como compatíveis ao fungo. Entretanto essa avaliação não levou em consideração o modelo do IB, que considera também os dados referentes ao crescimento radial e esporulação.

A exposição à radiação solar direta, principalmente aos raios ultravioletas, representa um dos mais importantes fatores ambientais que reduzem a eficiência de agentes biológicos em condições de campo. Entretanto, a tolerância à radiação UV é uma característica variável entre espécies de fungos utilizadas no biocontrole de pragas (SANTOS et al., 2011).

Segundo MORAES et al. (2011), conídios de *B. euphorbiae* mostraram-se tolerantes às radiações solar e ultravioleta, mantendo-se viáveis (germinação maior que 92%) mesmo após 8 horas de exposição à radiação emitida por simulador solar e 90 minutos à radiação UV, sem o uso de qualquer formulação. Apesar dos dados obtidos por estes autores demonstrarem que o fungo, é originalmente bastante resistente a tais condições, é interessante a associação deste fitopatógeno com fotoprotetores, no intuito de aumentar sua eficiência em condições de campo, visto que a exposição aos raios solares pode durar mais que 8 horas.

Dentre os fatores de proteção à radiação UV intrínsecos aos conídios de fungos, destacam-se os pigmentos localizados na parede celular e que atuam no bloqueio da entrada de radiação (RANGEL et al., 2005; BRAGA et al., 2006). Hifas e conídios de fungos do gênero *Bipolaris* apresentam coloração escura devido a presença de melanina na parede celular (WEIKERT-OLIVEIRA et al., 2002) e em microorganismos, a função primária deste pigmento é reduzir os efeitos prejudiciais da radiação UV às células. A correlação entre a concentração de melanina e tolerância a UV vem sendo discutida. A melanina também está associada à proteção contra elevadas temperaturas e à tensões químicas, como presença de metais pesados e agentes oxidantes (GOMEZ e NOSANCHUK, 2003; ALLAM e ABD EL-ZAHER, 2012). Entretanto, esse aspecto precisa ser investigado.

Dentre os produtos testados, o fotoprotetor Tinosorb M® foi considerado o mais adequado para esta função, em razão da compatibilidade em todas as concentrações testadas e às características do produto, como a fotoestabilidade. Para definir a concentração adequada do produto, há necessidade de conduzir estudos em que o fungo seja exposto às radiações solar e ultravioleta, associado aos fotoprotetores. Portanto, para compor a formulação à base do fungo, foi escolhida a concentração de 1% do produto, sugerindo que esta permitiria maior proteção ao patógeno.

3.2. Toxicidade dos surfactantes ao *Bipolaris euphorbiae*

Todos os produtos, exceto Unitol L20® a 0,01% e Tween 80 nas concentrações de 0,01 a 0,5%, foram considerados tóxicos ou moderadamente tóxicos ao fungo *B. euphorbiae* (Tabelas 4 e 5).

A germinação dos conídios foi o parâmetro que sofreu menor influência quanto à presença dos surfactantes no meio de cultura, com exceção do Triton X-100®, cuja relação entre a concentração do produto e a porcentagem de conídios viáveis foi inversamente proporcional (Tabela 5).

Segundo OSHEROV e MAY (2000), uma fonte de carbono é necessária como um sinal extracelular para que ocorra a tradução, e conseqüentemente a germinação dos conídios. Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que o fungo

utilizou, a princípio, fontes endógenas de carbono e nitrogênio ao invés de fontes exógenas presentes no meio de cultura (LEFEBVRE, 1931), o que permitiu a germinação dos conídios (Tabelas 4 e 5). Entretanto, para a continuidade do desenvolvimento, a hifa tem que sofrer uma extensão após a formação do tubo germinativo, o que exige a utilização de fontes exógenas de macronutrientes (SOARES, 2011), presentes no meio contendo os surfactantes. Tal fato pode ter influenciado negativamente o crescimento, exceto nas concentrações de 0,01 a 0,5% de Tween 80 (Tabela 4) e a esporulação de *B. euphorbiae* nos demais tratamentos (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4 - Toxicidade dos surfactantes Unitol L20®, Ultranex NP 95® e Tween 80® para *Bipolaris euphorbiae* cultivado em meio de cultura contendo diversas concentrações dos produtos

Surfactantes e concentrações	Viabilidade (%)	Crescimento (mm)	Esporulação (nº de con.x10 ⁶)	IB	Classificação toxicológica
Unitol L 20®					
Controle	99,9 A	80,6 A	11,0 A	-	-
0,01%	99,8 A	72,0 A	6,4 B	77	C
0,05%	98,9 A	39,5 B	5,5 B	54	MT
0,1%	99,3 A	34,1 B	2,5 C	40	T
0,5%	99,6 A	18,9 C	0,9 CD	25	T
1%	99,9 A	12,4 C	0,0 D	17	T
Teste F	1,82 ^{NS}	80,99**	44,14**	-	-
C.V. (%)	2,6	6,77	6,56	-	-
Ultranex NP 95®					
Controle	99,9 A	80,6 A	2,8 A	-	-
0,01%	99,9 A	30,5 B	1,9 B	34	T
0,05%	99,6 A	22,5 C	2,0 B	33	T
0,1%	99,8 A	20 CD	1,9 B	28	T
0,5%	99,4 A	18,1 CD	1,9 B	26	T
1%	99,6 A	17,6 D	1,8 B	25	T
Teste F	0,62 ^{NS}	305,77**	32,48**	-	-
C.V. (%)	2,74	3,38	6,27	-	-
Tween 80®					
Controle	99,6 A	90,0 A	3,0 A	-	-
0,01%	99,7 A	90,0 A	1,8 AB	82	C
0,05%	99,6 A	90,0 A	0,8 B	69	C
0,1%	99,6 A	90,0 A	1,0 B	71	C
0,5%	99,2 A	90,0 A	0,8 B	68	C
1%	99,2 A	84,5 B	0,4 B	60	MT
Teste F	0,97 ^{NS}	8,85**	8,26**	-	-
CV (%)	2,29	1,69	5,09	-	-

Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). NS não significativo, ** significativo a 1% de probabilidade, IB Índice biológico CV coeficiente de variação. MT. moderadamente tóxico, C. compatível, T. tóxico

Tabela 5 - Toxicidade dos surfactantes Triton X-100® e Ultrol IT 80® para *Bipolaris euphorbiae* cultivado em meio de cultura contendo diversas concentrações dos produtos.

Surfactantes e concentrações	Viabilidade (%)	Crescimento (mm)	Esporulação (nº de con.x10 ⁶)	IB	Classificação toxicológica
Triton X-100®					
Controle	99,6 A	90,0 A	2,7 A	-	-
0,01%	97,6 AB	42,5 B	1,3 B	52	MT
0,05%	97,0 B	18,8 C	0,4 BC	26	T
0,1%	85,1 C	14,2 D	0,2 C	19	T
0,5%	35,3 D	13,6 D	0,2 C	14	T
1%	7,6 E	13,5 D	0,1 C	9	T
Teste F	452,30**	1963,49**	24,27**	-	-
CV (%)	3,82	2,02	3,45	-	-
Ultrol IT 80®					
Controle	93,3 A	90,0 A	8,0 A	-	-
0,01%	87,9 AB	29,0 B	1,3 B	31	T
0,05%	83,8 BC	16,3 C	0,5 B	20	T
0,1%	86,1 BC	15,8 C	0,5 B	20	T
0,5%	79,4 C	13,5 D	0,4 B	17	T
1%	80,6 BC	13,5 D	0,4 B	18	T
Teste F	11,77**	4776,55**	45,59**	-	-
CV (%)	3,28	1,31	5,82	-	-

Valores originais, mas análises estatísticas de esporulação e viabilidade realizadas com dados transformados em $\log x$ e $\arcsin x/100$, respectivamente. Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). NS não significativo, ** significativo a 1% de probabilidade, IB Índice biológico. CV coeficiente de variação. MT. moderadamente tóxico, T. tóxico.

O papel dos surfactantes dentro das formulações vem sendo investigado (CONNICK Jr; LEWIS; QUIMBY Jr, 1990; DAIGLE e CONNICK Jr, 1990; BOYETTE et al., 1996), confirmando que esta classe de adjuvantes pode contribuir para o aumento da atividade dos fitopatógenos no controle de plantas daninhas. Segundo GREEN et al. (1998), os surfactantes podem melhorar a molhabilidade, a deposição e retenção dos conídios sobre as folhas e prolongar a retenção de água.

No entanto, não há diretrizes para a seleção deste tipo de adjuvante para uso associado a agentes de biocontrole. Assim, existe necessidade de se investigar e selecionar surfactantes compatíveis para os diferentes sistemas “patógeno - planta daninha” (SANYAL; BHOWMIK; ABBAS, 2008).

Os surfactantes Herbitensil® e Silwet® suprimiram significativamente o crescimento vegetativo de *B. euphorbiae*, enquanto que o produto Natur'Oleo® proporcionou um incremento no crescimento, superando os resultados obtidos no controle (NEMOTO et al., 2002). Tais resultados corroboram com os obtidos por TOFFANELLI (1997), que também verificou o efeito inibitório do surfactante Triton X-100® sobre o crescimento do fungo, na concentração recomendada pelo fabricante e

em metade desta. Entretanto, nestes trabalhos não foi determinada a classificação toxicológica dos produtos em relação ao fitopatógeno, diferentemente do presente estudo, que pôde afirmar, baseado no IB, o perfil de toxicidade dos produtos ao fungo.

O efeito de cinco surfactantes sobre o fungo *Alternaria helianthi*, potencial bioagente de controle do carrapichão (*Xanthium strumarium* L), uma importante planta daninha na cultura da soja, foi avaliado por Sanyal, Bhowmik e Abbas (2008). Os autores observaram que os produtos Silwet L-77® e Activator 90® incrementaram a germinação e infectividade dos conídios, considerando-os compatíveis ao fungo; entretanto também não avaliaram outros parâmetros que pudessem traçar, com maior precisão, o perfil toxicológico do produto a este fitopatógeno.

No presente trabalho, o surfactante Tween 80® foi compatível ao fungo, exceto a 1%, e pode ser considerado um agente dispersante passível de utilização. Contudo, estudos de dispersão de conídios devem ser conduzidos de modo a selecionar a concentração adequada do produto para exercer tal função. Para compor a formulação à base de *B. euphorbiae* foi arbitrariamente escolhida a concentração de 0,1% do produto.

3.3. Toxicidade dos antiumectantes ao *Bipolaris euphorbiae*

As diferentes concentrações dos antiumectantes carbonato de cálcio, talco, celulose microcristalina e dióxido de silício não interferiram no desenvolvimento de *B. euphorbiae*, especialmente quanto a germinação e crescimento, sendo considerados compatíveis a este e passíveis de utilização em uma formulação (Tabelas 6 e 7).

Embora a taxa de germinação tenha sido considerada satisfatória nos tratamentos contendo 0,5 e 1% de óxido de magnésio, os demais parâmetros foram consideravelmente afetados (Tabela 7), sugerindo que inicialmente o fungo utilizou fontes endógenas de macronutrientes, permitindo a germinação, mas posteriormente usou fontes exógenas presentes no meio de cultura contendo o antiumectante, o que causou efeitos deletérios sobre o fitopatógeno (LEFEBVRE, 1931; SOARES, 2011). As mesmas concentrações de carbonato de sódio anidro, também foram

consideradas tóxicas ao fungo, provocando efeitos significativos desde o início do processo de desenvolvimento (Tabela 6).

Segundo GAUGLER (1997) existem semelhanças entre as indústrias farmacêutica, de cosméticos e de alimentos com o desenvolvimento de formulações a base de agentes biológicos, no sentido de buscar ingredientes que sejam seguros, de baixo custo e não tóxicos. Assim sendo, os produtos testados neste ensaio são comumente utilizados na indústria alimentícia e permitidos pela Legislação brasileira para consumo humano.

Tabela 6 - Toxicidade dos antiemectantes carbonato de cálcio, talco e carbonato de sódio anidro para *Bipolaris euphorbiae* cultivado em meio de cultura contendo diversas concentrações dos produtos.

Antiemectantes e concentrações	Viabilidade (%)	Crescimento (mm)	Esporulação (nº de con.x10 ⁶)	IB	Classificação toxicológica
Carbonato de cálcio					
Controle	95,6 A	90,0	4,8 A	-	-
0,01%	93,5 AB	90,0	3,6 A	90	C
0,05%	94,9 AB	90,0	8,0 A	129	C
0,1%	94,4 AB	90,0	4,8 A	100	C
0,5%	95,0 A	90,0	3,6 A	79	C
1,0%	92,2 B	90,0	6,3 A	113	C
Teste F	4,74*	-	2,44 ^{NS}	-	-
CV (%)	1,56	-	9,26	-	-
Talco					
Controle	99,9 A	90,0	10,5 A	-	-
0,01%	99,6 A	90,0	7,0 AB	86	C
0,05%	99,6 A	90,0	8,0 AB	90	C
0,1%	99,9 A	90,0	2,5C	67	C
0,5%	99,8 A	90,0	4,5 BC	75	C
1,0%	99,9 A	90,0	4,0 BC	77	C
Teste F	0,47 ^{NS}	-	5,67**	-	-
CV (%)	2,45	-	10,61	-	-
Carbonato de sódio anidro					
Controle	99,8 A	90,0 A	9,0 A	-	-
0,01%	99,0 A	90,0 A	4,3 B	67	C
0,05%	98,6 A	90,0 A	4,5 B	78	C
0,1%	99,3 A	90,0 A	1,1 C	62	MT
0,5%	62,4 B	20,0 B	0,2 C	18	T
1,0%	7,7 C	0,0 C	0,0 C	1	T
Teste F	791,43**	45844,64**	20,52**	-	-
CV (%)	2,60	0,62	9,16	-	-

Valores originais, mas análises estatísticas de esporulação e viabilidade realizadas com dados transformados em log x e arc sen x/100, respectivamente. Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p ≥ 0,05). NS não significativo, **, * significativo a 1% e a 5% de probabilidade, respectivamente. IB Índice biológico. CV coeficiente de variação. MT. moderadamente tóxico, C. compatível, T. tóxico.

Resultados de estudos que abordaram a associação de fungos fitopatogênicos com antiumectantes passíveis de utilização em formulações de bioherbicidas não foram encontrados na literatura, o que torna este estudo importante sob tal ponto de vista

Tabela 7 - Toxicidade dos antiumectantes óxido de magnésio, celulose microcristalina e dióxido de silício para *Bipolaris euphorbiae* cultivado em meio de cultura contendo diversas concentrações dos produtos.

Antiumectantes e concentrações	Viabilidade (%)	Crescimento (mm)	Esporulação (nº de con.x10 ⁶)	IB	Classificação toxicológica
Óxido de magnésio					
Controle	99,9 A	90,0 A	5,8 A	-	-
0,01%	99,5 A	90,0 A	6,0 A	102	C
0,05%	99,7 A	90,0 A	7,3 A	111	C
0,1%	93,6 B	90,0 A	5,5 A	97	C
0,5%	93,2 B	23,3 B	0,2 B	23	T
1,0%	93,7 B	6,8 C	0,0 B	13	T
Teste F	74,18**	56,64**	15,33**	-	-
CV (%)	1,63	11,87	9,62	-	-
Celulose microcristalina					
Controle	99,6 A	90,0	1,7 A	-	-
0,01%	99,5 A	90,0	1,4 AB	93	C
0,05%	99,7 A	90,0	1,6 A	103	C
0,1%	99,6 A	90,0	1,3 AB	90	C
0,5%	99,5 A	90,0	1,1 AB	84	C
1,0%	99,1 A	90,0	0,9 B	88	C
Teste F	0,23 ^{NS}	-	4,12*	-	-
CV (%)	2,66	-	11,46	-	-
Dióxido de silício					
Controle	98,2 A	90,0	1,65 A	-	-
0,01%	97,2 A	90,0	1,68 A	100	C
0,05%	97,0 A	90,0	0,93 A	81	C
0,1%	97,6 A	90,0	0,90 A	80	C
0,5%	97,9 A	90,0	0,85 A	69	C
1,0%	97,4 A	90,0	0,78 A	77	C
Teste F	1,12 ^{NS}	-	3,39*	-	-
CV (%)	1,46	-	3,54	-	-

Valores originais, mas análises estatísticas de esporulação e viabilidade realizadas com dados transformados em log x e arc sen x/100, respectivamente. Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p ≥ 0,05). NS não significativo, **, * significativo a 1% e a 5% de probabilidade, respectivamente. IB Índice biológico. CV coeficiente de variação. C. compatível, T. tóxico.

Embora diferentes produtos tenham se mostrado compatíveis ao *fungo B. euphorbiae* o antiumectante dióxido de silício, a 1%, foi escolhido para compor a formulação. Em razão de sua textura, o produto é constituído por um pó muito fino

que permite aumentar o volume da preparação (conídios + antiumectante), facilitando o manuseio para obtenção de uma mistura homogênea.

3.4. Toxicidade de espalhantes adesivos ao *Bipolaris euphorbiae*

Os produtos utilizados neste ensaio são comumente empregados em pulverizações e associados a herbicidas e outros defensivos agrícolas, visando melhorar a eficiência dos produtos, com exceção do polivinilpirrolidona (PVP), um polímero com função adesiva e rotineiramente usado para inoculação de sementes de leguminosas na agricultura atual (HOWIESON; EWING; THORN, 1987).

Os espalhantes adesivos testados causaram efeitos significativos sobre o fungo em um ou mais parâmetros avaliados, sendo na maioria, considerados tóxicos ou moderadamente tóxicos (Tabelas 8 e 9).

De acordo com os dados obtidos e cálculo do IB, a concentração recomendada do produto Haiten® (0,01%) mostrou-se compatível com *B. euphorbiae*, apresentando uma margem de segurança para seu uso, uma vez que o produto foi atóxico ao fungo, mesmo utilizado em concentração cinco vezes maior (0,05%) do que a recomendada (Tabela 9).

A concentração recomendada do produto DuFol® (0,02%) não foi testada devido a padronização metodológica estabelecida, mas pelos dados obtidos foi possível verificar a compatibilidade do produto com o fungo, na metade desta concentração.

Para potencializar a eficiência de herbicidas químicos são adicionados surfactantes e espalhantes adesivos à calda de pulverização. Sendo assim, tais classes de adjuvantes vêm sendo avaliadas quanto à possibilidade de uso associado com *B. euphorbiae*. A interação do fungo com adjuvantes e herbicidas comumente usados para controle do amendoim-bravo foi investigada por alguns autores (NEMOTO et al., 2002; TOFFANELLI, 1997; GAZZIERO et al., 1989). Entretanto esses autores não determinaram o perfil de toxicidade dos diversos produtos testados ao fungo, avaliando isoladamente parâmetros biológicos, diferentemente do presente trabalho que estabeleceu uma relação entre germinação, crescimento e esporulação, para traçar tal perfil.

Tabela 8 - Toxicidade dos espalhantes adesivos DuFol[®], Agral[®] e Energic[®] para *Bipolaris euphorbiae* cultivado em meio de cultura contendo diversas concentrações dos produtos.

Espalhantes adesivos e concentrações	Viabilidade (%)	Crescimento (mm)	Esporulação (nº de con.x10 ⁶)	IB	Classificação toxicológica
DuFol[®]					
Controle	99,6 A	90,0 A	3,9 A	-	-
0,01%	99,1 AB	75,3 B	1,9 B	71	C
0,05%	98,4 B	45,0 C	1,7 B	52	MT
0,1%	98,3 B	38,3 D	1,0 B	41	T
0,5%	98,4 B	29,0 E	0,9 B	36	T
1,0%	98,3 B	28,3 E	0,9 B	35	T
Teste F	6,32**	978,87**	11,05**	-	-
C.V. (%)	1,26	1,60	4,87	-	-
Agral[®]					
Controle	98,9 A	90,0 A	1,8 A	-	-
0,01%	98,6 A	51,8 B	1,2 A	68	C
0,05%	98,2 A	30,5 C	1,0 A	51	MT
0,1%	98,2 A	25,8 D	1,2 A	53	MT
0,5%	98,0 A	21,3 E	1,0 A	47	MT
1,0%	98,1 A	20,8 E	1,0 A	46	MT
Teste F	1,66 ^{NS}	4752,20**	1,36 ^{NS}	-	-
C.V. (%)	1,25	0,92	3,67	-	-
Energic[®]					
Controle	98,9 A	90,0 A	1,3 A	-	-
0,01%	97,9 AB	47,5 B	0,7 B	57	MT
0,05%	97,6 B	30,0 C	0,6 B	46	MT
0,1%	5,2 C	23,8 D	0,5 BC	30	T
0,5%	4,7 C	18,3 E	0,3 BC	18	T
1,0%	4,4 C	15,3 F	0,1 C	12	T
Teste F	3737,13**	3286,21**	17,03**	-	-
CV (%)	2,28	1,25	1,83	-	-

Valores originais, mas análises estatísticas de esporulação e viabilidade realizadas com dados transformados em log x e arc sen x/100, respectivamente. Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p ≥ 0,05). NS não significativo, ** significativo a 1% de probabilidade. IB Índice biológico. CV coeficiente de variação. MT. moderadamente tóxico, C. compatível, T. tóxico.

Os espalhantes adesivos Energic[®] e Aterbane[®], nas doses recomendadas pelos fabricantes influenciaram significativamente a germinação de *B. euphorbiae*, embora tenha se mantido acima de 80%, após 490 minutos de incubação (NEMOTO et al., 2002). Tal resultado não foi obtido no presente estudo cuja germinação, após 420 minutos, foi de 5,2% usando metade da dose recomendada pelo fabricante (0,1%) (Tabela 8).

Tabela 9 - Toxicidade do espalhante adesivo Haiten® e do agente adesivo PVP K-30® para *Bipolaris euphorbiae* cultivado em meio de cultura contendo diversas concentrações dos produtos

Espalhantes adesivos e concentrações	Viabilidade (%)	Crescimento (mm)	Esporulação (nº de con.x10 ⁶)	IB	Classificação toxicológica
Haiten®					
Controle	99,3 A	90,0 A	1,1 A	-	-
0,01%	99,1 A	90,0 A	0,9 AB	94	C
0,05%	98,7 A	60,5 B	0,7 ABC	68	C
0,1%	98,4 A	44,8 C	0,6 BC	56	MT
0,5%	92,3 B	26,0 D	0,3 C	36	T
1,0%	91,2 B	23,3 E	0,2 C	30	T
Teste F	71,18**	1594,09**	9,43**	-	-
C.V. (%)	1,43	1,42	1,91	-	-
PVP K-30®					
Controle	99,3 A	90,0	10,2 A	-	-
0,01%	98,4 AB	90,0	3,3 A	71	C
0,05%	98,9 AB	90,0	2,3 A	66	MT
0,1%	97,3 B	90,0	4,5 A	76	C
0,5%	97,9 AB	90,0	5,8 A	81	C
1,0%	97,2 B	90,0	7,8 A	90	C
Teste F	5,54**	-	2,26 ^{NS}	-	-
CV (%)	1,75	-	33,16	-	-

Valores originais, mas análises estatísticas de esporulação e viabilidade realizadas com dados transformados em log x e arc sen x/100, respectivamente Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p ≥ 0,05). NS não significativo, ** significativo a 1% de probabilidade, IB Índice biológico. CV coeficiente de variação. MT. moderadamente tóxico, C. compatível, T. tóxico.

O efeito de 10 espalhantes adesivos no desempenho biológico e infectividade do fitopatógeno *Cylindrocarpon* sp. sobre a macrófita aquática *Sagittaria montevidensis* que vem se destacando por conta do profuso crescimento em áreas agrícolas e reservatórios, foi avaliado por FIORILLO (2007). Os produtos Aterbane® e Energic® reduziram, em média, 55% do crescimento do fungo em relação à testemunha, enquanto que Silwet®, Herbitensil®, Agral® e Haiten® proporcionaram um incremento significativo na esporulação. As melhores condições para germinação foram obtidas na presença de Tween (84%) e Aterbane (81%).

Para PVP K-30®, embora a análise da germinação tenha mostrado diferenças significativas entre os tratamentos, a porcentagem de conídios viáveis é considerada satisfatória do ponto de vista do controle biológico (Tabela 9). O número de conídios produzidos foi diretamente proporcional ao aumento da concentração do produto, exceto no tratamento contendo 0,05% que apresentou o menor valor, mas não

diferiu estatisticamente dos demais. A maioria das concentrações foram consideradas compatíveis ao fungo, e embora 0,05% tenha sido classificada como moderadamente tóxica, o valor do índice biológico (IB=66) está no limite máximo para esta classificação (Tabela 9).

Para compor a formulação foram escolhidos o espalhante adesivo Haiten®, na concentração recomendada pelo fabricante (0,01%) e o adesivo PVP K-30® a 0,1%, sendo atóxicos ao fungo.

3.5. Avaliação da viabilidade de *Bipolaris euphorbiae* durante o armazenamento da formulação

A análise de variância mostrou que a interação dos fatores condição de armazenamento *versus* período de avaliação foi significativa ($F = 48,21^{**}$) e o desdobramento desta interação (Tabela 10) permitiu avaliar a manutenção da viabilidade do fungo ao longo do tempo.

Tabela 10 - Desdobramento da interação condições de armazenamento *versus* período de avaliação, significativa para a viabilidade de conídios de *Bipolaris euphorbiae* armazenados por 245 dias em temperatura ambiente e sob refrigeração

Período de avaliação (dias)	Viabilidade dos conídios (%)		Teste F
	Condição de armazenamento		
	Temperatura ambiente	Refrigeração (4°C)	
0	97,78 Aa	97,00 Aa	0,07 ^{NS}
31	97,44 Aa	98,04 Aa	0,04 ^{NS}
61	96,80 Aa	92,80 Aa	1,87 ^{NS}
92	77,50 Bb	92,98 Aa	28,04 ^{**}
122	75,02 Bb	89,96 Aa	26,12 ^{**}
153	74,80 Bb	90,12 Aa	27,47 ^{**}
184	64,00 Bc	93,08 Aa	98,97 ^{**}
214	59,60 Bc	94,06 Aa	138,98 ^{**}
245	35,20 Bd	94,92 Aa	417,40 ^{**}
Teste F	100,80 ^{**}	1,75 ^{NS}	

Médias seguidas por pelo menos uma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). NS não significativo; **significativo a 1% de probabilidade.

Durante os primeiros 61 dias as condições de armazenamento não determinaram diferenças significativas na viabilidade dos conídios, sendo mantida maior que 92% (Tabela 10). A partir da avaliação seguinte (92 dias), a condição de armazenagem passou a ser considerada um fator limitante para a manutenção da viabilidade, sendo que a refrigeração a 4°C proporcionou os melhores resultados ao longo de 245 dias de avaliação, não havendo diferença significativa na viabilidade considerando este período (Tabela 10). Segundo Elzein, Kroschel e Müller-Stöver (2004), a estocagem sob baixas temperaturas permite manter o patógeno em um estado fisiologicamente dormiente e consequentemente prolongar sua viabilidade.

Estudos que abordam o desenvolvimento de bioprodutos devem enfatizar a busca de alternativas que permitam o armazenamento a longo prazo em temperatura ambiente, a fim de facilitar a distribuição e uso destes produtos (ELZEIN; KROSCHER; CADISCH, 2008).

A manutenção da viabilidade de microrganismos em formulações, durante o armazenamento, é dependente do teor de umidade. FENG; POPRAWASKI; KHACHATOURIANS (1994) observaram a correlação entre estes dois aspectos. No entanto, a adição de dióxido de silício cuja função seria dificultar a absorção de água pelo fungo, impedindo sua germinação, não foi suficiente para manter os conídios viáveis em temperatura ambiente ao longo do período avaliado, observando-se uma redução de 64% na viabilidade entre a primeira e a última avaliação. Uma provável alternativa seria a busca por adjuvantes com propriedades termoestabilizadoras que, associados ao patógeno, melhorem sua estabilidade durante o armazenamento sob tal condição.

As condições de armazenamento de uma formulação granulada do fungo antagonista *Fusarium oxysporum* foi avaliada por Elzein, Kroschel e Müller-Stöver (2004). Os autores observaram que clamidósporos do patógeno mantiveram-se 25-69% e 100% viáveis após um ano armazenados em temperatura ambiente e a 4°C, respectivamente, sugerindo que é mais provável que armazenamentos a longo prazo sejam bem sucedidos mantendo-se o agente de controle em baixas temperaturas.

A mesma formulação de *F. oxysporum* mantida a 4°C foi avaliada quanto à eficiência em infectar *Striga hermonthica* (striga ou erva bruxa) após cinco anos de armazenamento, comparando-se com uma formulação fresca do fungo (ELZEIN;

KROSCHER, CADISCH, 2008). Ambas as preparações mostraram-se altamente eficientes causando doença em 100% das plantas de stiga. Os autores concluíram que os ingredientes da formulação não afetaram a virulência e eficácia de *F. oxysporum*, que apresentou o mesmo potencial de controle, mesmo após o longo período de armazenamento. No presente trabalho não foi possível avaliar a eficiência da formulação à base de *B. euphorbiae* sobre *E. heterophylla* ao final do período avaliado (245 dias).

Diferentes formulações de *Penicillium oxalicum* foram avaliadas quanto à manutenção da viabilidade sob temperatura ambiente e a 4°C, considerando também o tipo de embalagem (a vácuo ou não), durante um ano (SABUQUILLO; de CALL; MELGAREJO, 2010). As formulações armazenadas sob baixa temperatura apresentaram taxa de germinação significativamente maior do que as armazenadas em temperatura ambiente, independente do tipo de embalagem. Os autores verificaram ainda que o fungo formulado foi capaz de reduzir em 50% a ocorrência de *Fusarium* na cultura de tomate, comprovando a eficiência do bioproduto armazenado.

O fungo *Colletotrichum truncatum* foi altamente virulento para *Sesbania exaltata*, importante planta daninha de ocorrência em culturas de algodão, soja e arroz, mesmo depois de 8 anos de armazenamento a -20 °C e a virulência foi um pouco menor quando o armazenamento foi feito a 4°C (SCHISLER e JACKSON, 1993). Os autores observaram que a sobrevivência dos conídios deste fitopatógeno em formulações armazenadas à temperatura ambiente, foi significativamente menor do que quando armazenado em temperaturas mais baixas.

3.6. Avaliação da infectividade de *Bipolaris euphorbiae* em *Euphorbia heterophylla*, após formulação

Sintomas típicos de infecção causados pelo fungo foram observados (Tabela 11), embora este não tenha causado a mortalidade das plantas. Todas as plantas submetidas à pulverização com a calda contendo conídios do fungo apresentaram pelo menos um ou mais sintomas de infecção pelo fungo. Observou-se notada incidência de clorose foliar, equivalente a 70% das plantas do tratamento contendo o

fungo. Manchas no caule e queda foliar foram observadas em 30% das plantas no tratamento contendo o fungo. A ocorrência de lesões foliares, incluindo pontos de necrose e necrose nas bordas foi de 40% e 20%, respectivamente. No tratamento cujas plantas foram pulverizadas apenas com a mistura de adjuvantes, observaram-se pontos de necrose em 20% das plantas. Os produtos utilizados (Tinosorb M[®], Tween 80[®], Haiten[®] e PVP K-30[®]) para compor a formulação do tipo pó molhável, podem ter contribuído para a ocorrência de alterações na morfologia da cera epicuticular ou lesões no tecido foliar, resultando nos pontos de necrose observados. Este fato pode facilitar a ação do fitopatógeno, contribuindo para a ocorrência dos demais sintomas observados. A indução de inflorescência da planta e o murchamento de algumas folhas foram verificados em 30% das plantas. Em nenhuma planta foi observada a perda de sustentação do caule.

De modo geral, 70% das plantas de amendoim-bravo pulverizadas com a calda contendo o fungo associado aos adjuvantes apresentaram pelo menos um sinal de inibição de desenvolvimento, comparando-se os tratamentos controle e, em média, a altura do caule (43,7 cm) foi 18% menor dos que as plantas pulverizadas com água (53,2 cm) e a mistura de adjuvantes (53,8 cm).

Tabela 11 - Sintomas de infecção de *Euphorbia heterophylla* causados pela pulverização com a formulação de *Bipolaris euphorbiae*.

Sintomas avaliados	Plantas com sintomas (%)		
	Pulverizadas com água	Pulverizadas com adjuvantes	Pulverizadas com fungo + adjuvantes
Necrose de borda	0	0	20
Necrose pontual	0	20	40
Clorose	0	10	70
Queda foliar	0	0	30
Murchamento	0	0	30
Manchas no caule	0	0	30
Perda de sustentação do caule	0	0	0
Indução de inflorescência	0	0	30

A ação de *B. euphorbiae* se dá pela produção de uma toxina, ainda não caracterizada, durante o processo de infecção e que causa danos aos tecidos vegetais (GAZZIERO e YORINORI, 1993). Segundo VIDHYASEKARAN et al. (1986), a toxina é responsável pela patogenicidade do fungo. O cultivo sucessivo em meio de cultura sintético possivelmente é uma explicação para o fato de *B. euphorbiae* não ter causado mortalidade das plantas, pois pode ter diminuído sua capacidade de produzir a toxina. Apesar disso, foi possível reisolar o patógeno de folhas com sintomas de infecção.

Novos estudos devem ser conduzidos visando incrementar a virulência do patógeno e avaliar sua infectividade após longo do período de armazenamento em temperatura ambiente e em condições de campo. A formulação obtida no presente trabalho foi capaz de manter a infectividade de *B. euphorbiae* para *E. heterophylla* e pode representar um passo importante no sentido de obter um bioproduto à base do fungo.

4. CONCLUSÕES

- *Bipolaris euphorbiae* é afetado pela ação de fotoprotetores, surfactantes, antiumectantes e espalhantes adesivos usados como adjuvantes na formulação de um bioproduto à base do fungo.
- O desenvolvimento do fungo é influenciado pela concentração dos adjuvantes usados para compor a formulação;
- A temperatura afeta a longevidade da formulação. Conídios formulados e armazenados sob refrigeração apresentam maior viabilidade ao longo do período de armazenamento.
- A formulação não influencia a patogenicidade, pois o fungo formulado é capaz de mostrar sintomas de infecção em *Euphorbia heterophylla*.

5. REFERÊNCIAS

ALLAM, N.G; ABD EL-ZAHER, E.H.F. Protective role of *Aspergillus fumigatus* melanin against ultraviolet (UV) irradiation and *Bjerkandera adusta* melanin as a candidate vaccine against systemic candidiasis. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.11, n.24, p.6566-6577, 2012.

BOYETTE, C.D.; QUIMBY Jr., P.C.; CAESAR, A.J.; BIRDSALL, J.L.; CONNICK Jr., W.J.; DAIGLE, D.J.; JACKSON, M.A.; EGLEY, G.H.; ABBAS, H.K. Adjuvants, formulations and spraying systems of improvement of mycoherbicides. **Weed Technology**, Champaign, v.10, p.637-644, 1996.

BRAGA, G.U.L; RANGEL, D.R.; FLINT, S.D.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Conidial pigmentation is important to tolerance against solar-simulated radiation in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Photochemistry and Photobiology**, Oxford, v.82, p.418-422, 2006.

CALDWELL, C.J.; HYNES, R.K.; BOYETCHKO, S.M.; KORBER, D.R. Colonization and bioherbicidal activity on green foxtail by *Pseudomonas fluorescens* BRG100 in a pesta formulation. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.58, p.1-9, 2012.

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, 2008.

CONNICK Jr, W.J.; LEWIS, J.A.; QUIMBY Jr, P.C. Formulation of biocontrol agents for use in plant pathology. In: BAKER, R.R; DUNN, P.E.; LISS A.R. (Eds.). **New directions in biological control: alternatives for suppressing agricultural pests and diseases**. New York, 1990. p.345-372.

DAIGLE, D.J.; CONNICK Jr, W.J. Formulation and application technology for microbial weed control. In: HOAGLAND R.E. (Ed.). **Microbes and microbial products as herbicides**. American Chemical Society, Washington, D.C., 1990. p.288-304.

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.

ELZEIN, A.; KROSCHER, J.; CADISCH, G. Efficacy of Pesta granular formulation of *Striga*-mycoherbicide *Fusarium oxysporum* f. sp. *strigae* Foxy 2 after 5-year of storage. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Geisenheim, v.115, n.6, p.259-262, 2008.

ELZEIN, A.; KROSCHER, J.; MÜLLER-STÖVER, D. Optimization of storage conditions for adequate (long) shelf-life of "Pesta" formulation of *Fusarium oxysporum* "Foxy 2", a potential mycoherbicide for *Striga*: effects of temperature, granule size and water activity. **Biocontrol Science and Technology**, Abingdon, v.14, n.6, p.531-544, 2004.

ESTAT: sistema para análise estatística. Versão 2.0. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 1997. Disponível em <http://www.fcav.unesp.br/download2/software/estat/>./>

FALK, R.H.; GUGGENHEIM, R.; SCHULKE, G. Surfactant induced phytotoxicity. **Weed Technology**, Champaign, v.8, p.519-525, 1994.

FENG, M.G.; POPRAWASKI, T.J.; KHACHATOURIANS, G.G. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. **Biocontrol Science and Technology**, Abingdon, v.4, p.3-34, 1994.

FIORILLO, C.M.T. **Controle biológico de *Sagittaria montevidensis* com *Cylindrocarpon* sp.** 2007. 88 f. Tese (Doutorado em Agronomia - Produção Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal, 2007.

FRANCISCO, E.A.; MOCHI, D.A.; CORREIA, A.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.

GAUGLER, R. Alternative paradigms for commercializing biopesticides. **Phytoparasitica**, Rehovot, v.25, n.3, p.179-182, 1997.

GAZZIERO, D.L.P.; CALÇAVARA, P.R.; YORINORI, J.T.; ARRABAL, C.A. Compatibilidade da mistura de *Helminthosporium* sp. com diferentes adjuvantes. In: **Resultados de Pesquisa de Soja 1988/89**. EMBRAPA, Londrina, 1989, p.282-283.

GAZZIERO, D.L.P.; YORINORI, J.T. **Experiência sobre o controle biológico de *Euphorbia heterophylla* no Brasil**. FUNEP, Jaboticabal, 1993, 11 p.

GLARE, T.; CARADUS, J.; GELERNTER, W.; JACKSON, T.; KEYHANI, N.; KÖHL, J. MARRONE, P.; MORIN, L.; STEWART, A. Have biopesticides come of age? **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v.30, n.8, p.250-258, 2012.

GOMEZ, B.L.; NOSANCHUK, J.D. Melanin and fungi. **Current Opinion in Infectious Diseases**, London, v.16, n.2, p.91-96, 2003.

GREAVES, M.P.; MACQUEEN, M.D. The use of mycoherbicides in the field. **Aspects of Applied Biology**, Wellesbourne, n.24, p.163-168, 1990.

GREEN, S.; STEWART-WADE, S.M.; BOLAND, G.H.; TESHLE, M.P.; LUI, S.H. Formulating microorganisms for biological control of weeds. In: BOLDAN, G.H.; KUYKENDALL, L.D. (Eds.). **Plant microbes interactions and biological control**. New York: Marcel Dekker, 1998. p.249-281.

HOWIESON, J.G., EWING, M.A., THORN, C.W. **Inoculation and time pelleting of medic seed**. Victoria: Western Australian Department of Agricultural, 1987, 5 p.
LEFEBVRE, C.L. Preliminary observations on two species of *Beauveria* attacking the corn borer, *Pyrausta nubilalis* hubner. **Phytopathology**, Saint Paul, v.21, p.1115-1128, 1931.

LIM, H.W.; THOMAS, L.; RIGEL, D.S. Photoprotection. In: RIGEL, D.S.; WEISS, R.A.; LIM, H.W.; DOVER, J.S. (Eds.). **Photoaging**. Marcel Dekker, Inc., 2005, p.397.

LOUREIRO, E. de S.; BATISTA FILHO, A.; LEITE, L. G.; ALMEIDA, J. E. M. Viabilidade de conídios e blastósporos de *Sporothrix insectorum* (Hoog e Evans) armazenados em diferentes temperaturas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.70, n.1, p.89-91, 2003.

MESTRES, G.M; FERNANDEZ, C.; PARSOTAM, N.; NIELLOUD, F.; MESTRES, J.P.; MAILLOLS, H. Stability of UV filters in different vehicles: solvents and emulsions. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v.23, n.7, p.647-655, 1997.

MONTEIRO, M.S.S.B. **Filtros Solares em Nanocosméticos: desenvolvimento e avaliação da segurança e eficácia.** 2008. 164 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, UFRJ, Rio de Janeiro, 2008.

MORAES, C.; MONTEIRO, A.C.; MOCHI, D.A. Reaction of *Bipolaris euphorbiae* to environmental factors and its tolerance to solar and ultraviolet radiation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v.27, p.1449-1456, 2011.

NEMOTO, M.C.M.; NAHAS, E.; PITELLI, R.A.; COELHO, L. Germination and mycelial growth of *Bipolaris euphorbiae* Muchovej e Carvalho as influenced by herbicides and surfactants. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo, v.33, n.4, p.352-357, 2002.

OSHEROV, N.; MAY, G. Conidial germination is *Aspergillus nidulans* requires RAS signaling and protein synthesis. **Genetics**, Austin, v.155, n.2, p.647-656, 2000.

PENARIOL, M.C., MONTEIRO, A.C., PITELLI, R.A., PEREIRA, G.T. Produção de *Bipolaris euphorbiae* em meios de cultura sólidos e líquidos obtidos de grãos e resíduos agroindustriais. **Bragantia**, Campinas, v.67, n.4, p.805-814, 2008.

PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; MACDONALD, K.D.; BUFTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, New York, v 5, p.141-238, 1953.

PRASAD, R. Influence of several pesticides and adjuvants on *Chondrostereum purpureum* - a bioherbicide agent for control of forest weeds. **Weed Technology**, Champaign v.8, p.445-449, 1994.

RANGEL, D.E.; 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**, New York, v.93, n.2, p.127-134, 2006.

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

RANGEL, D.E.; 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**, New York, v.87, p.77-83, 2004.

ROSSI-ZALAF, L.S.; ALVES, S.B.; LOPES, R.B.; SILVEIRA NETO, S.; TANZINI, M.R. Interação de microrganismos com outros agentes de controle de pragas e doenças. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. (Eds.) **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. FEALQ, Piracicaba, p.270-302, 2008.

SABUQUILLO, P.; de CAL, A.; MELGAREJO, P. Development of a dried *Penicillium oxalicum* conidial formulation for use as a biological control agent against *Fusarium* wilt of tomato: Selection of optimal additives and storage conditions for maintaining conidial viability. **Biological Control**, Orlando, v.54, p.221-229, 2010.

SANTOS, P. de S.; da SILVA, M.A.Q.; MONTEIRO, A.C.; GAVA, C.A.T. Improving photoprotection of *Beauveria bassiana* conidia for biological control of the cactus pest *Dactylopius opuntiae* in the semiarid region northeast of Brazil. **Biocontrol Science and Technology**, Ottawa, v.21, n.8, p.893-902, 2011.

SANYAL, D.; BHOWMIK, P.C.; ABBAS, H.K. Effect of surfactants on bioherbicidal activity of *Alternaria helianthi* on multiple-seeded cocklebur. **Plant Pathology Journal**, London, v.7, n.1, p.104-108, 2008.

SCHISLER, D. A.; JACKSON, M. A. Storage and efficacy of liquid culture produces microsclerotia of the bioherbicidal fungus *Colletotrichum truncatum*. In: II International Bioherbicide Workshop: "Bioherbicides - Applying the Temperate Experience to the Tropics", 1993, Quebec, **Abstracts**...

SOARES, F.B. **Impacto de fungicidas e inseticidas na densidade populacional de *Beauveria bassiana* no solo sob efeito da microbiota nativa**. 2011. 87 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal, 2011.

TESHLER, M.P.; ASH, G.J.; ZOLOTAROV, Y.; WATSON, A.K. Increased shelf life of a bioherbicide through combining modified atmosphere packaging and low temperatures. **Biocontrol Science and Technology**, Abingdon, v.17, n.4, p.387-400, 2007.

TESSMANN, D.J. **Controle biológico: aplicações na área de ciências das plantas daninhas**. In: OLIVEIRA Jr, R.S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M.H. (Eds). *Biologia e manejo de plantas daninhas*. Omnipax, Curitiba, 2011, 348 p

TOFFANELLI, C.M. **Interferência de herbicidas e surfactantes na ação de fungo *Bipolaris euphorbiae* Muchovej e Carvalho para o controle de *Euphorbia heterophylla* L. (amendoim-bravo)**. 1997. 60f. Monografia (Graduação em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal, 1997.

VIDHYASEKARAN, P.; BORROMEO, E.S.; MEW, T.W. Host specific toxin production by *Helminthosporium oryzae*. **Phytopathology**, St. Paul, v.76, p.261-266, 1986.

WEIKERT-OLIVEIRA, R.C.B.; de RESENDE, M.A.; VALÉRIO, H.M.; CALIGIORNE, R.B.; PAIVA, E. Genetic variation among pathogens causing "*Helminthosporium*" diseases of rice, maize and wheat. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, n.6, p.639-643, 2002.

WISSING, S.A.; MULLER, H. Solid lipid nanoparticles (SLN) - a novel carrier for UV blockers. **Pharmazie**, Berlin, v.56, p.783-786, 2001.

WOMACK, J.G.; BURGE, M.N. Mycoherbicide formulation and the potential for bracken control. **Pesticide Science**, London, v.37, p.337-341, 1993.

WRAIGHT, S.P.; JACKSON, M.A.; DE KOCK, S.L. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. In: BUTT, T.M., JACKSON, C., MAGAN, N. (Eds.). **Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential**. CABI Publishing, Wallingford, 2001, p.253-287.

WYSS, G.S.; CHARUDATTAN, R.; ROSSKOPF, E.N.; PITELLI, R.C. Effects of selected pesticides and adjuvants on germination and vegetative growth of *Phomopsis amaranthicola*, a biocontrol agent for *Amaranthus spp.* **Weed Research**, Oxford, v.44, p.469-482, 2004.

CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

A obtenção de um bioherbicida compreende o desenvolvimento de diversas etapas. Inicia com a produção em larga escala do patógeno, prossegue com a secagem e extração dos propágulos infectivos e com a adição de adjuvantes que visam manter a viabilidade e infectividade do bioagente ao longo do armazenamento e melhorar seu desempenho em campo.

Com base nos resultados obtidos nos ensaios deste trabalho foi possível verificar que a produção de *B. euphorbiae* por 10 dias pelo método convencional em meio sólido proporciona a melhor relação “esporulação com alta viabilidade versus tempo de cultivo”. A secagem pelo fluxo contínuo de ar e a obtenção de conídios por peneiramento favorecem a integridade dos conídios mantendo-os viáveis. Dentre os adjuvantes testados para formular um bioherbicida, o fotoprotetor Tinosorb M[®] a 1%, o surfactante Tween 80[®] a 0,1%, o antiumectante dióxido de silício a 1%, o espalhante adesivo Haiten[®] a 0,01% e o polímero adesivo PVP K-30[®] a 0,1% foram selecionados pela compatibilidade com *B. euphorbiae* e por não afetarem sua capacidade infectiva. A longevidade do fungo formulado é maior quando mantido sob refrigeração.

Embora estes achados representem um passo importante no desenvolvimento de um bioproduto à base de *B. euphorbiae*, há ainda vários aspectos que precisam ser investigados, tais como: a) buscar meios ou métodos que permitam a conservação do bioagente viável e infectivo em temperatura ambiente; b) verificar a manutenção da infectividade do fungo formulado, por pelo menos 12 meses de armazenamento; c) testar sua infectividade em diferentes biótipos de *E. heterophylla*; d) verificar a eficiência da formulação no controle de *E. heterophylla* em condições de campo.

O desenvolvimento de formulações é importante para tornar os bioprodutos disponíveis para uso no manejo integrado de plantas daninhas. Justifica-se, portanto, os esforços realizados para desenvolver esses produtos.