



FORMULAÇÃO DE ENTOMOPATÓGENOS

UMA BOA FORMULAÇÃO É A BASE PARA O SUCESSO DE UM INSETICIDA MICROBIANO

Introdução

A necessidade de se formular um microrganismo entomopatogênico justifica-se pela utilização deste como um bioinseticida, da mesma maneira que se usa um inseticida organossintético. Embora os entomopatógenos possam ser aplicados puros ou na forma em que são produzidos, muitas vezes tais condições não permitem a distribuição e a cobertura homogêneas. Isto pode ser conseguido pela formulação, acrescentando-se certos adjuvantes que melhoram o seu desempenho no campo, facilitam o manuseio e a aplicação e, principalmente, permitem o armazenamento sob condições onde minimiza-se o custo de armazenamento, com mínima perda das qualidades do produto.

O estudo das formulações de entomopatógenos tem avançado pouco no mundo, pois as formulações são, em geral, guardadas com grande segredo pelas companhias que as desenvolvem, de modo que a quantidade de informação disponível na literatura científica é bastante reduzida. No Brasil, instituições públicas e privadas desenvolvem seus estudos, testando produtos importados ou desenvolvendo tecnologia nacional, avaliando a eficiência no controle de pragas e vetores de doenças e a estabilidade do produto (vida de prateleira) em condições de armazenamento.

Uma boa formulação é a base para o sucesso de um inseticida microbiano. A possibilidade de serem obtidos produtos adequados depende das próprias características do microrganismo e sua relação com os adjuvantes e o ambiente de armazenamento. Deve-se também considerar os aspectos relacionados com a produção do microrganismo e a adequação do tipo de formulação a ser empregada com as características da cul-

tura e, principalmente, com a biologia e o comportamento do inseto. Além do potencial de uso do patógeno selecionado, a análise econômica da formulação também deve ser criteriosa, uma vez que na comercialização o preço final é um determinante na opção pelo produto. Portanto, as pesquisas devem ser dirigidas no sentido de se incorporar às formulações produtos de baixo custo, preferencialmente resíduos e subprodutos agroindustriais.

A formulação de um agente de controle microbiológico tem, em geral, o mesmo objetivo proposto para os inseticidas químicos, e que em última análise significa liberar o ingrediente ativo em uma forma apropriada de uso, de fácil aplicação, com alta eficiência e baixo custo. Entretanto, agentes microbiológicos de controle apresentam problemas específicos, próprios de sua natureza biológica e que exigem maior atenção durante esta fase do trabalho. Exposição ao calor, compostos tóxicos, secagem não-controlada e condições que permitam a germinação prematura do patógeno podem inviabilizar o bioinseticida.

Para tornar a exploração comercial mais viável, o ideal seria que o produto permanecesse estável, em condições ambientes, por pelo menos 20 a 24 meses. Em geral, pelo menos 18 meses de estabilidade são exigidos para tornar a formulação economicamente viável. Isto nem sempre é possível com o uso de microrganismos vivos, no entanto, em alguns casos, o produto pode ser refrigerado e utilizado dentro de um período restrito, como é o caso de nematóides.

Alguns estudos já realizados alertaram que, no desenvolvimento de formulações de entomopatógenos, a pesquisa deve orientar-se para a manutenção da viabilidade e virulência do microrganismo durante o processo de

Luis Francisco A. Alves

*Biólogo, prof. assist., Departamento de Ciências
Biológicas,
UNIOESTE, Cascavel - PR
lfaalves@unioeste.br*

Antônio Batista Filho

*Eng. agr., pesquisador científico,
Instituto Biológico de São Paulo, Campinas - SP*

produção, de forma a se obter um produto no qual sejam preservadas ou aumentadas estas propriedades. Devem ser considerados os efeitos da temperatura, umidade e tipos de inertes sobre a estabilidade do patógeno antes e depois de ele alcançar o ambiente de aplicação.

Os componentes presentes nas formulações devem contribuir para o incremento da estabilidade, virulência e eficácia do agente de biocontrole. Estes componentes devem, também, aumentar a persistência do produto, a adesividade sobre a planta hospedeira e/ou inseto e a atratividade para a praga. A persistência no ambiente é característica desejável principalmente no caso em que o microrganismo é depositado sobre a superfície foliar, para ser ingerido pelo inseto. A maior parte dos patógenos de insetos são altamente suscetíveis à luz solar e exigem sistemas de proteção para prolongarem sua atividade. A quantidade reduzida de informações sobre a compatibilidade entre os entomopatógenos e os componentes de formulações é um dos obstáculos que dificultam o avanço da área e deve ser priorizada pela pesquisa.

Outro ponto importante a ressaltar é a necessidade de que o bioinseticida formulado seja compatível com as técnicas de aplicação e os equipamentos existentes, caso contrário encontrará dificuldades para concorrer no mercado e terá sua aceitação limitada. Em geral, a aplicação de inseticidas microbianos tem sido realizada com equipamentos e tecnologia desenvolvidos para os inseticidas químicos. Em alguns casos, pequenas adaptações têm permitido melhor distribuição do produto microbiano no campo.

Além dessas exigências, a formulação deve ser submetida aos testes de segurança para fins de registro e que consideram, entre outros parâmetros, a pureza, a toxicidade a vertebrados e espécies não-alvo, a segurança à cultura, e o risco de explosão e inflamabilidade.

Devido à multiplicidade de aspectos a serem considerados na formulação de inseticidas microbianos, pesquisas neste assunto devem envolver técnicos especialistas em diversas áreas.

Formulações de vírus de poliedrose nuclear de *Anticarsia gemmatalis* (VPNAg)

À semelhança dos inseticidas químicos, muitas das pesquisas sobre formulação de vírus entomopatogênicos têm sido realizadas pelo setor privado, o que torna, muitas vezes, indisponível ao

público. Quanto às pesquisas realizadas pelo setor público, têm sido usualmente dirigidas para as misturas de tanque com vistas a aumentar a eficiência do patógeno com relação a uma determinada praga. O desenvolvimento comercial de inseticidas virais não poderá deixar de considerar que as formulações sejam biologicamente e fisicamente estáveis no armazenamento e distribuição. Os vírus entomopatogênicos sendo constituídos de nucleoproteínas são suscetíveis a desnaturação quando expostos a altas temperaturas. Entre 38 e 42°C, foi observada perda de atividade dentro de poucos meses ou mesmo semanas. Acima de 50°C, a atividade do patógeno é perdida em questão de horas ou minutos. Contudo, é necessário frisar que, em condições de campo, a temperatura tem pouca influência na inativação do vírus, ao contrário da radiação ultravioleta, considerada por diversos autores como o principal fator responsável pela perda de atividade do entomopatógeno. Foi observado que preparações de Baculovirus anticarsia expostas à radiação UV apresentaram atividades significativamente reduzidas. Nesse caso, formulações oleosas e pó molhável reduziram o impacto da radiação sobre o vírus tanto a nível de laboratório como de campo. A manutenção da atividade promovida pelas formulações permite que ocorra uma reposição natural do vírus no campo, aliada à contribuição dos artrópodes predadores e parasitóides na disseminação do patógeno, chegando a provocar focos primários da doença. Outro ponto importante a ser considerado é a possibilidade de se aplicar o produto formulado durante todo o dia, ao contrário das preparações impuras de *B. anticarsia*, que normalmente são aplicadas ao entardecer, com vistas a minimizar os efeitos da radiação ultravioleta, garantindo assim um maior número de horas de atividade do vírus. A contribuição de outros fatores para inativação de viroses de insetos em condições de campo parece não ser tão significativa quando comparada à radiação solar. A umidade relativa do ar tem pouco efeito sobre o vírus. Contudo, a umidade proveniente do orvalho encontrado sobre a superfície das folhas pode reduzir a estabilidade do microrganismo. A remoção de vírus das plantas pela ação da chuva e do vento tem sido pouco estudada. No caso de folhagens de couve, foi observado que poucos vírus são retirados das folhas pela simulação de chuva ou lavagem. Além das características físicas do vegetal, as formulações podem auxiliar na fixação do patógeno à planta. Quanto ao

armazenamento de Baculovirus em ambiente, os trabalhos apresentam uma grande variação de resultados, consequência dos diferentes tipos de formulações e do período de tempo estudado. Em todos os casos é desejável que a atividade do patógeno seja preservada por pelo menos 18 meses. Raros são os trabalhos que avaliam o efeito da umidade em formulações de Baculovirus. Em geral, a estabilidade das preparações virais aumenta à medida que decresce a umidade do produto. Entretanto, existe relato de que o vírus de granulose de *Pieris rapae* foi mais estável quando armazenado úmido. Temperaturas elevadas aceleram os efeitos danosos da alta umidade. A concentração de íons hidrogênio é importante para a estabilidade das formulações de vírus durante o armazenamento. Alguns autores têm observado que Baculovirus é inativado por valores extremos de acidez ou alcalinidade e sugerem que o pH de uma formulação deveria ser próximo ao da neutralidade. As formulações podem aumentar ou inibir a alimentação da praga e provocam maior ou menor mortalidade em menor ou maior tempo. Devem possuir partículas de tamanho adequado e fagoestimulantes, para assim garantir a ingestão das toxinas ou propágulos associados aos inertes, pois, na maioria dos casos, há relação direta entre taxa de ingestão e eficiência de controle. Existem no mercado produtos fagoestimulantes para serem utilizados em mistura durante o preparo da calda, mas nem sempre os resultados têm aumentado a eficiência do bioinseticida. Os processos de produção e formulação devem ser orientados também com base econômica. O preço do produto deve ser compatível com a realidade do mercado, em relação a inseticidas químicos e demanda potencial, para que o bioinseticida possa tornar-se competitivo. A partir de 1985, o Instituto Biológico e a ESALQ/USP iniciaram um projeto de desenvolvimento de formulações de Baculovirus anticarsia que resultou no estabelecimento de uma formulação oleosa dentro das características físicas desejáveis e com boa estabilidade, razoável persistência e alta eficiência no controle de *Anticarsia gemmatalis*. Formulações de fungos entomopatogênicos

Em função das próprias dificuldades impostas por suas características naturais, existem poucos casos de sucesso de produtos formulados de fungos entomopatogênicos, embora estes sejam bastante estudados. O grande problema está na manutenção de sua atividade ao longo do período de armazenamento,

principalmente quando são preparados na forma sólida. De modo geral, maior destaque é dado aos Deuteromicetos, pela amplitude de utilização, principalmente no Brasil. Ainda assim, alguns estudos já realizados no Instituto Biológico demonstraram o sucesso de *Metarhizium anisopliae* formulado em pó seco (fubá de milho) no controle da broca dos citros (*Diploschema rotundicole*) ou mesmo misturado ao substrato de crescimento (arroz cozido) moído, usado no controle de diversas espécies de cigarrinhas em cana-de-açúcar e pastagens. Sendo, para este último caso, avaliado o efeito de moagens (moimho de martelo), que não afetaram a viabilidade e também a compatibilidade com inertes e adjuvantes de diversos grupos químicos, com resultados variados. Além das preparações sólidas, existem também formulações granuladas e formulações líquidas, grânulos de micélio, encapsuladas em amido ou alginato de sódio. No caso do micélio seco, preservava-se o material vegetativo em baixa umidade, que após o contato com o meio torna-se ativo novamente, continuando seu crescimento até a fase de reprodução. As formulações encapsuladas, principalmente com amido, atuam de maneira similar, porém conferem maior proteção ao fungo e ainda podem fornecer nutrientes para o crescimento das hifas, podendo também ser incluídos outros produtos que venham a aumentar a eficiência do produto no campo ou aumentar a preservação. A formulação oleosa tem a vantagem de, em muitos casos, dispensar a incorporação de agentes molhantes ou adesivos, sendo estudada para o controle de gafanhotos, cigarras e moscas-brancas nos EUA e também no Brasil, principalmente por pesquisadores do Cenargen/Embrapa, visando melhorar a eficiência e estabilidade de *Metarhizium flavoviride* para o controle de gafanhotos migratórios. Algumas formulações especiais, como pastas e iscas, preparadas no momento da aplicação, também têm se mostrado bastante eficientes. Como exemplo, *B. bassiana*, para o controle de *Cosmopolites sordidus*. O fungo, produzido em arroz, é homogeneizado com o substrato até se obter a consistência pastosa, sendo aplicado sobre iscas de pseudocaules de bananeiras que já produziram e que exercem forte atração sobre adultos da praga. Testou-se também a impregnação de iscas de papelão Termitrap com conídios e pasta de arroz + conídios e micélio seco do fungo *B. Bassiana*, obtendo-se excelentes resultados em condições de laboratório e também no campo, com manutenção da população bai-

xa durante cinco meses. Uma isca à base de conídios de *B. bassiana* (447), tendo, além de outros inertes, amendoim como atraente, foi desenvolvida para o controle de *Solenopsis* spp. e outras formigas, nos EUA. Deve-se ressaltar, contudo, que produtos à base de outros fungos como *Hirsutella thompsonii* e *Verticillium lecanii* foram ou ainda são comercializados em países do hemisfério norte, o que demonstra seu potencial. Formulações de *Bacillus sphaericus*

O interesse comercial pelas bactérias entomopatogênicas surgiram em meados da década de 50, quando, atentas aos resultados de pesquisas, as indústrias ligadas à área farmacêutica introduziram em sua linha de produção o gênero *Bacillus*. Inicialmente as variedades conhecidas tinham sua atividade restrita a insetos da ordem *Lepidoptera*. Ainda hoje a variedade *kurstaki* é utilizada na maioria dos produtos comerciais, em diferentes formulações, sendo que outras variedades patogênicas também a lepidópteros foram descobertas e são também produzidas. O grande impulso na utilização de bactérias para o controle de insetos ocorreu após a descoberta de variedades e isolados patogênicos a larvas de culicídeos, principalmente dos gêneros *Culex*, *Anopheles* e *Aedes*. Nestas descobertas incluem-se *B. sphaericus* (*B.sph.*) e *B. thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*). Isto porque tais agentes de controle mostravam-se altamente promissores no controle de vetores de doenças e abriam nova perspectiva de mercado a ser explorado. Atualmente, a maioria dos produtos é à base de *Bti*, sendo este utilizado no mundo todo em formulações líquidas e sólidas. O tipo de formulação a ser desenvolvido deve estar de acordo com os hábitos do inseto e também com as características dos locais onde se encontram os criadouros. Por esta razão é que se encontram disponíveis preparações sólidas flutuantes (liberação lenta) para aplicações em áreas cobertas por vegetação, visando insetos que se alimentam próximo à superfície, ou líquidas para aplicações em áreas abertas e com dispersão mais rápida que atinge também larvas que se alimentam no fundo. No Brasil, há em andamento alguns projetos de pesquisa com formulações de bactérias entomopatogênicas utilizadas no controle de vetores. A Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) desenvolve, em associação com uma empresa privada, uma formulação líquida (concentrado emulsionável), a qual se encontra em fase de patenteamento, o que impõe algumas restrições com relação à divulgação dos resultados obtidos. Ainda assim, os primeiros dados obtidos em

testes realizados em Montes Claros/MG garantem boas perspectivas, e os estudos de estabilidade em condições ambiente, após 14 meses, mostraram apenas redução de 10% na CL50. A partir de 1995, o Departamento de Entomologia da ESALQ e a Seção de Controle Biológico das Pragas e o Centro Piloto de Formulações de Defensivos Agrícolas, ambos pertencentes ao Instituto Biológico de São Paulo, vêm desenvolvendo, em conjunto, um projeto de pesquisa no qual visa-se uma formulação sólida de *B. sphaericus*. Neste trabalho foram avaliados diversos isolados do entomopatógeno, obtidos de diferentes regiões do Brasil e também realizados diversos experimentos com inertes e adjuvantes para serem incorporados à formulação, avaliando-se, além da compatibilidade, a fluabilidade e dispersão na superfície da água. Após uma série de experimentos chegou-se a uma formulação granulada (G4) preparada pelo método de spray-on, usando-se como veículo sabugo de milho triturado, além de adjuvantes que aumentam a adesividade do complexo esporo-cristal ao inerte e promovem a liberação gradativa, comprovada em testes específicos. Estudos de armazenamento em diferentes condições indicaram a proteção da formulação ao patógeno em relação à temperatura elevada, pois lotes mantidos durante 60 dias a 50°C mantiveram cerca de 50% da atividade original, enquanto o preparado não-formulado neste mesmo período não se mostrou patogênico. Além disso, a formulação também apresentou maior atividade que o microrganismo não-formulado quando exposto à radiação UV proveniente de lâmpada germicida. Neste caso, após 15 minutos de exposição a formulação manteve-se próxima da totalidade em sua ação entomopatogênica, enquanto o não-formulado não causou mortalidade superior a 30%. Atualmente, o produto em teste encontra-se armazenado há 12 meses com redução de 30% da atividade, em testes de laboratório (CL), mas sem qualquer prejuízo nos testes em maior escala, sendo a mortalidade obtida pelas amostras próxima de 100% em 48 horas. Estudos de campo vêm sendo realizados em conjunto com a Universidade Estadual de Londrina/PR, visando avaliar o potencial do produto em condições reais, uma vez que em criadouros simulados, ricos em matéria orgânica, a atividade entomopatogênica frente a larvas de 3º e 4º ínstar de *C. quinquefasciatus* foi detectada após 18 dias, com valores próximos a 100%. Esta última também abriga um projeto de pesquisa, porém visando o desenvolvimento de uma formulação à base de *Bti*.