**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Incremento da vida de prateleira de *Metarhizium anisopliae* e
Beauveria bassiana em dispersões oleosas através de secagem de
conídios, surfactantes e aditivos**

Giuliano Pauli

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba
2014**

Giuliano Pauli
Biólogo

Incremento da vida de prateleira de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em dispersões oleosas através de secagem de conídios, surfactantes e aditivos

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **ITALO DELALIBERA JÚNIOR**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Pauli, Giuliano

Incremento da vida de prateleira de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em dispersões oleosas através de secagem de conídios, surfactantes e aditivos / Giuliano Pauli. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2014.
158 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Formulação 2. Tempo de prateleira 3. Dispersão oleosa 4. *Metarhizium anisopliae*
5. *Beauveria bassiana* 6. Surfactantes 7. Controle biológico 8. Fungos entomopatogênicos
I. Título

CDD 589.24
P327i

A Deus, pela dádiva da vida

**Dedico aos meus pais Donizete e Elaine,
e a minha esposa Vanessa.**

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, pela oportunidade de aprendizagem e qualificação.

Ao Prof. Sérgio Batista Alves (*“in memoriam”*) pelo impulso e inestimáveis ensinamentos durante o início de minha carreira na patologia de insetos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia pela oportunidade de concluir mais esta etapa em minha formação acadêmica;

Ao Prof. Dr. Ítalo Delalibera Jr, meu orientador, pela confiança, apoio, amizade, motivação e inestimável colaboração durante o meu doutoramento;

Ao Prof. Sinval Silveira Neto pela amizade, conselhos e ensinamentos.

Ao Giovane Marcio Coura Jr pelo inestimável auxílio na execução dos experimentos

Aos professores do Departamento de Entomologia, pelos ensinamentos;

A FMC Química do Brasil, em nome de Yemel Mayo Ortega e Danilo Tubaldini, pelo apoio durante a realização desse trabalho e por entenderem a importância da conclusão dessa etapa;

A Solange Aparecida Vieira Barros, técnica do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano, pela amizade duradoura e apoio na execução do trabalho;

Aos amigos do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos pela convivência e colaborações;

As famílias Pauli e Caviolli, agradeço pela dedicação sem limites, em especial aos meus pais Donizete e Elaine, minha irmã Giovana, e avós Deize, Paulo e Doris;

Aos amigos da república Kantagalo e de SBO, pela convivência e inestimável apoio;

A minha querida companheira e esposa, Vanessa da Silveira Duarte, a quem admiro como profissional e como pessoa, pela paciência e apoio.

EPÍGRAFE

“É difícil controlar uma praga sem a utilização de um produto químico, entretanto é impossível controlar uma praga sem a atuação de entomopatógenos”

Sérgio Batista Alves

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Cenário brasileiro da utilização de formulações de fungos entomopatogênicos	17
2.2 Fatores ambientais deletérios aos fungos entomopatogênicos e vantagens da formulação.....	19
2.3 Dispersão Oleosa de fungos entomopatogênicos	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Isolados e procedimentos utilizados para produção e análise de viabilidade e análise estatística usados em todos os experimentos.....	27
3.1.1 Procedência dos isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> e <i>Beauveria bassiana</i>	27
3.1.2 Produção de conídios aéreos de <i>Metarhizium anisopliae</i> e <i>Beauveria bassiana</i>	27
3.1.3 Avaliação da viabilidade de conídios	28
3.1.4 Análises estatísticas	29
3.2 Estabilidade de blastosporos de <i>Metarhizium anisopliae</i> e <i>Beauveria bassiana</i> formulados em diferentes inertes sólidos	30
3.3 Comparação de metodologias para a extração de conídios	32
3.4 Atividade de água e escolha do óleo vegetal	34
3.5 Compatibilidade de emulsionantes puros diretamente misturados aos conídios	36
3.6 Estabilidade de formulações oleosas contendo emulsionantes	37
3.7 Efeito da adição de dessecantes no tempo de prateleira de conídios formulados em óleo vegetal	38
3.8 Efeito da adição de dessecantes no tempo de prateleira de conídios formulados em óleo vegetal + emulsionantes.....	39
3.9 Efeito da pré-secagem do óleo no tempo de prateleira de conídios	40
3.10 Efeito da formulação dispersão oleosa na proteção de conídios expostos a radiação UV.....	41

3.11 Efeito da formulação dispersão oleosa de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> na eficiência de controle de <i>Tenebrio molitor</i>	42
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 Estabilidade de blastosporos de <i>Metarhizium anisopliae</i> e <i>Beauveria bassiana</i> formulados em diferentes inertes sólidos	45
4.2 Comparação de metodologias para extração de conídios.....	49
4.3 Aatividade de água e escolha do óleo vegetal	53
4.4 Compatibilidade de emulsionantes puros diretamente misturados aos conídios	61
4.5 Estabilidade de formulações oleosas contendo emulsionantes	66
4.6 Efeito da adição de dessecantes no tempo de prateleira de conídios formulados em óleo vegetal:	72
4.7 Efeito da adição de dessecantes no tempo de prateleira de conídios formulados em óleo vegetal + emulsionantes	84
4.8 Efeito da pré-secagem do óleo no tempo de prateleira de conídios.....	89
4.9 Efeito da formulação dispersão oleosa na proteção de conídios expostos a radiação UV	97
4.10 Efeito da formulação dispersão oleosa de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> na eficiência de controle de <i>Tenebrio molitor</i>	99
5 CONCLUSÕES	105
REFERÊNCIAS	107
ANEXOS.....	117

RESUMO

Incremento da vida de prateleira de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em dispersões oleosas através de secagem de conídios, surfactantes e aditivos

Formulações a base de dispersões oleosas de conídios aéreos de fungos entomopatogênicos apresentam diversas vantagens em comparação à aplicação de produtos não formulados; entretanto, a complexidade e a falta de compreensão dos fatores que influenciam a persistência desse tipo de formulação fazem com que ainda seja pouco utilizada. O efeito de diferentes níveis de secagem de conídios, tipo de óleo, métodos de extração, estabilidade de blastosporos, compatibilidade de surfactantes e adição de dessecantes foram avaliados para o desenvolvimento de micopesticidas formulados em óleo. Os melhores resultados obtidos com os conídios em óleo foram avaliados quanto à proteção conferida à radiação UV e a eficiência das formulações na mortalidade de *Tenebrio molitor*. Seis diferentes níveis de secagens de conídios de *Beauveria bassiana*, com atividades de água variando de 0,875 a 0,134 e cinco diferentes secagens de conídios de *Metarhizium anisopliae* com atividades de água variando de 0,954 a 0,272 foram formulados em óleo de soja e girassol ou mantidos como conídios puros e armazenados a 26°C e 30°C. Conídios mais secos sobreviveram por mais tempo e o óleo de girassol foi o mais compatível. Os métodos de extração de conídios do substrato por peneiramento, lavagem em óleo e lavagem em água foram comparados, com melhor resposta no tempo de prateleira para a lavagem em óleo para os dois fungos. A lavagem em água foi eficiente para *B. bassiana*, mas altamente deletéria para *M. anisopliae*. Zeolita clinoptololita foi a argila mais eficiente na manutenção da viabilidade de blastosporos de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, e apesar de resultados promissores a estabilidade desses propágulos foi muito inferior a de conídios aéreos. Vinte surfactantes foram avaliados quanto a inocuidade aos conídios, em dois ensaios culminando com a seleção dos quatro mais compatíveis, dois deles KBRAdj e Tween 80, avaliados nos experimentos posteriores demonstrando potencial para compor a formulação como agentes emulsionantes. Sílica e glicerol foram avaliados como agentes dessecantes na formulação e respostas distintas foram observadas. O glicerol foi altamente incompatível, enquanto diferentes concentrações de sílica (1, 3 e 5%) incrementaram a sobrevivência dos conídios em até sete vezes. As vantagens da presença da sílica ficaram evidentes também em combinações de óleo de girassol com os quatro emulsionantes selecionados. A secagem prévia do óleo incrementou a sobrevivência de conídios, e para *B. bassiana* o melhor tratamento foi obtido com a secagem prévia do óleo e a adição de sílica durante o armazenamento atingindo TL₂₀ de mais de 150 dias. As dispersões oleosas proporcionaram sobrevivência até sete vezes superior para conídios expostos a radiação UV em relação a conídios não formulados e dois experimentos comprovaram que as formulações oleosas testadas foram mais eficientes no controle de insetos, com reduções de até 2,3 vezes no tempo de sobrevivência de insetos. Os resultados descritos neste trabalho permitiram um melhor entendimento dos fatores críticos que afetam a vida de prateleira de conídios, e indicam procedimentos que podem ser utilizados para melhorar a estabilidade de micopesticidas formulados em óleo.

Palavras-chave: Formulação; Tempo de prateleira; Dispersão oleosa; *Metarhizium anisopliae*; *Beauveria bassiana*; Surfactantes; Controle biológico; Fungos entomopatogênicos

ABSTRACT

Shelf life enhancement of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in oil-based dispersions through drying of conidia, surfactants and additives

Oil-based formulations of aerial conidia of entomopathogenic fungi have several advantages compared to the use of unformulated products; however, the complexity and lack of understanding of the factors that influence the persistence of this type of formulation make it still not widely used. The effect of different levels of drying conidia, oil type, extraction methods, blastospores stability, compatibility of surfactants and addition of desiccant were evaluated for the development of a mycopesticide oil formulation. The best results obtained with aerial conidia were evaluated regarding the protection against UV radiation and the efficacy of the formulations to control *Tenebrio molitor*. Six levels of drying of *B. bassiana* conidia, with water activity ranging from 0,875 to 0,134 and five levels of drying conidia of *M. anisopliae* with water activity ranging from 0,954 to 0,272 were formulated in soybean and sunflower oils or kept as pure conidia and stored at 26°C and 30°C. The driest conidia had the prolonged shelf life and sunflower oil was the most compatible. The methods of conidia extraction from the substrate by sieving, washing with oil and flushing in water were compared and longest shelf life was obtained for washing with oil for both fungi. The water extraction was efficient for *B. bassiana*, but highly deleterious to *M. anisopliae*. Zeolita clinoptololita was the most compatible clay in maintaining the viability of blastospores of *M. anisopliae* and *B. bassiana*, and despite promising results in the stability, the shelf life of these propagules was much lower than aerial conidia. Twenty surfactants were evaluated for safety to conidia in two trials resulting in the selection of the four most compatible, two of them KBRAdj and Tween 80, were evaluated in subsequent experiments demonstrating potential as emulsifiers in oil-based formulations. Silica and glycerol were evaluated as desiccating agents in the formulation and distinct responses were observed. Glycerol was highly toxic to the fungi, while different concentrations of silica increased the survival of the conidia up to seven times. The advantages of silica were evident also in combinations of sunflower oil with the four selected emulsifiers. Removing the water from the oil increased the survival of conidia, and for *B. bassiana* the best treatment was obtained by drying the oil prior and keeping the silica during storage resulting in a TL₂₀ of over than 150 days. Oil-based formulation provided survival up to seven times higher for conidia exposed to simulated UV radiation compared to unformulated conidia, and two experiments showed that oil formulations were more efficient in the insect control, with reductions of up to 2.3 times on the survival time of insects. The results described in this work, allowed a better understanding of the critical factors that affect the shelf-life of conidia, and indicate methods that can be used to improve the stability of mycopesticides in oil-based formulations.

Keywords: Formulation; Shelf life; Oil-based formulation; *Metarhizium anisopliae*; *Beauveria bassiana*; Surfactants; Biological control; Entomopathogenic fungi

1 INTRODUÇÃO

O controle microbiano de insetos é comprovadamente eficaz no controle de pragas, entretanto resultados inconsistentes em condições de campo têm sido um dos principais entraves para o aumento da utilização dessa ferramenta no controle de insetos. Isto se deve, em parte, à limitada tecnologia de formulação, armazenamento e aplicação de microrganismos e a uma falta de compreensão dos mecanismos que regem a estabilidade física e biológica desses produtos. Um bom exemplo é o programa de utilização de *Metarhizium anisopliae* que hoje é aplicado em aproximadamente 2 milhões de hectares, entretanto na maioria dessa área pouco se evoluiu quanto a utilização de produtos formulados e quanto a tecnologia de aplicação quando comparado ao processo utilizado desde o início desse programa na década de 60. Ainda se utilizam produtos não formulados, que necessitam de refrigeração durante o armazenamento, comprometendo em alguns casos a eficiência dessa ferramenta de controle.

A formulação é etapa chave no desenvolvimento de um produto microbiano, principalmente para os produtos à base de propágulos infectivos vivos. Formular um patógeno é acrescentar a ele compostos que melhorem seu desempenho no campo, protejam a estrutura infectiva de condições adversas, facilitem o manuseio e aplicação e principalmente permitam o armazenamento em condições de baixo custo, com a menor perda possível de qualidade.

A escolha do tipo de formulação depende inicialmente da característica do propágulo infectivo produzido, dessa forma, como no Brasil se utiliza quase que exclusivamente a fermentação final em substrato sólido, resultando na produção de conídios aéreos a dispersão (ou suspensão concentrada) oleosa é uma das opções mais indicadas. A hidrofobicidade dos conídios facilita a formulação em óleo, que além de proporcionar proteção ao conídio contra diferentes fatores ambientais e químicos possibilita em certas circunstâncias o armazenamento em temperatura ambiente por um maior período de tempo. Tratando-se de um organismo vivo a compatibilidade entre todos os ingredientes da formulação é um fator crítico. Nesse contexto, em uma dispersão oleosa, além da seleção do veículo oleoso que pode ser de origem vegetal ou mineral, estudos detalhados para a escolha do agente emulsionante e determinação da umidade em que os propágulos serão formulados são essenciais.

Além de conídios outras estruturas fúngicas como blastosporos, microescleródios e micélio podem ser exploradas no manejo de pragas, entretanto deve-se ter atenção especial para as particularidades de cada propágulo, o que vai repercutir na escolha do tipo formulação. Além desses fatores a formulação deve considerar a bioecologia da praga alvo, ou seja, uma formulação para o controle de lagartas desfolhadoras apresentará diferenças marcantes de um produto idealizado para o controle de pragas de solo.

Todos esses fatores relacionados com a natureza física e química são importantes no desenvolvimento de uma formulação parecem estar sendo negligenciados, quando se considera a qualidade de uma parcela significativa dos produtos comerciais existentes no mercado brasileiro. Portanto, um micopesticida não se restringe a seleção de um isolado virulento, é necessário entender as condições básicas para que o fungo alcance sua máxima eficiência no campo garantindo o sucesso do controle microbiano de pragas e doenças.

Nesse contexto, objetivou-se com esse trabalho entender os fatores que influenciam de forma significativa o tempo de prateleira e a eficiência de dispersões oleosas de conídios. Os objetivos específicos foram:

- Determinar a compatibilidade de quatro inertes na sobrevivência de blastosporos;
- Comparar os métodos de peneiramento, lavagem em água e lavagem em óleo na extração de conídios do arroz e a importância da extração no tempo de prateleira após armazenamento;
- Avaliar a sobrevivência de conídios com diferentes atividades de água e a compatibilidade desses com os óleos de girassol e soja;
- Avaliar a compatibilidade de 20 surfactantes diretamente combinados aos conídios e em dispersões oleosas;
- Investigar o efeito da adição de dessecantes no tempo de prateleira dos conídios em dispersão oleosa com e sem emulsionantes;
- Determinar a resposta da pré-secagem do óleo no tempo de prateleira das formulações;
- Determinar a sobrevivência de conídios formulados durante exposição à radiação UV;
- Determinar a eficiência de diferentes formulações na mortalidade de *Tenebrio molitor*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cenário brasileiro da utilização de formulações de fungos entomopatogênicos

Fungos entomopatogênicos têm se mostrado muito eficazes no laboratório, entretanto, em alguns casos, apresentam falhas em condições de campo, mesmo após o desenvolvimento de um produto para a comercialização. Comumente essas falhas são causadas pela baixa estabilidade do produto durante a armazenagem que precede a aplicação, assim muito pouco ingrediente ativo viável realmente atinge o alvo. A formulação desempenha papel fundamental na diminuição desses problemas, tornando os microrganismos mais efetivos no campo seja pelo aumento de sua persistência ou de sua atividade inseticida (BURGUES; JONES, 1998; LACEY et al., 2001; JACKSON; DUNLAP; JARONSKI, 2010).

A tecnologia de formulação deve ser considerada em todos os estágios da produção do microrganismo para culminar em resultados satisfatórios. O método de produção geralmente influencia no tipo de formulação, que por sua vez pode levar a alterações no sistema de produção como um todo. É possível citar quatro funções básicas da formulação, são elas: 1- estabilizar o microrganismo durante a produção, distribuição e armazenagem; 2- facilitar o manuseio e aplicação do produto para que facilmente atinja o alvo; 3- proteger o microrganismo de condições ambientais desfavoráveis, 4- aumentar a persistência e potencializar a atividade, reprodução, contato e interação com a praga alvo (JONES; BURGUES, 1998).

No cenário mundial, mais de 80 companhias atuam no mercado de micopesticidas, totalizando 171 produtos (FARIA, WRAIGHT, 2007), e a demanda por esses produtos vem aumentando exponencialmente com o surgimento de novas empresas e comercialização de novos micopesticidas. A grande maioria desses produtos, o que corresponde a mais de 75% desse número, é à base de conídios aéreos de fungos da ordem Hypocreales, com destaque para *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *Isaria fumosorosea* e *B. brongniartii*. A América Latina representa 42% desse mercado, e apenas o Brasil apresentava em 2009, 40 micopesticidas comerciais oriundos de 19 empresas (MICHEREFF FILHO et al., 2009).

Desses 40 produtos, a maioria não tem registro; 2,5% dos produtos são comercializados na forma de material técnico (conídios puros), 72,5% correspondem

aos concentrados técnicos (substratos líquidos ou sólidos colonizados por fungos) e apenas 25% são, de fato, formulações, todas elas do tipo dispersão oleosa (MICHEREFF FILHO et al., 2009). Essas poucas formulações disponíveis hoje no mercado ainda necessitam ser melhoradas para se obter propriedades físico-químicas fundamentais para um longo tempo de vida de prateleira e eficiência consistente em campo (LI et al., 2010).

Os produtos à base de fungos não formulados (concentrados técnicos), tal como o arroz + fungo (AF) úmido ou parcialmente seco podem ter sua qualidade comprometida na ausência de algum beneficiamento ou formulação, embora existam muitos micopesticidas no mercado enquadrados nessa categoria. A lenta ação dos patógenos, comercializados *in natura* (AF), associada à má qualidade (baixa viabilidade e concentração) de alguns produtos, geraram grande insatisfação dos agricultores, em função da disparidade e falta de consistência de resultados em campo. Grandes quantidades de material não formulado podem ser difíceis de manusear, especialmente na forma de pós-secos baseados em conídios hidrofóbicos, além de ter seu desempenho afetado negativamente pelas condições ambientais adversas. A adoção de tecnologias de formulação para os fungos entomopatogênicos é um fator crítico para as empresas do setor, pois além de agregar valor, incrementam a vida de prateleira e eficácia de controle da formulação (ALVES et al., 1998).

De modo geral a formulação de entomopatógenos deve levar em consideração as limitações específicas relacionadas à natureza desses microrganismos, entre elas é possível citar: sensibilidade térmica, incompatibilidade com substâncias químicas componentes das formulações, necessidade de condições específicas para o desenvolvimento, atratividade/repelência de alguns tipos de propágulos, adequação ao sistema de produção disponível, economicidade e segurança (ingredientes inertes e surfactantes devem ter toxicologia favorável). Todos esses fatores, que tornam o desenvolvimento de um biopesticidas uma tarefa multidisciplinar, aliada a restrição de informações científicas e de profissionais especializados repercutem negativamente na qualidade e custo das formulações comerciais (ALMEIDA et al., 2008)

A formulação pó molhável é sem dúvida a mais estudada, devido ao seu baixo custo de produção e facilidade de confecção. Assim, uma formulação que contém conídios de fungo mais o amido (arroz moído) que age como um molhante

ou surfactante pode ser considerado um pó molhável. Essa formulação quando elaborada com o amido do meio de cultura pode conter as toxinas desses fungos o que potencializa a ação do patógeno. A maioria das formulações pó molhável pode permanecer viável por 2 a 3 meses em temperatura ambiente (25°C), necessitando de refrigeração quando armazenados por períodos maiores, atingindo tempos de prateleira de mais de 3 meses a 10°C e de até um ano a -4°C (ALMEIDA et al., 2008).

Apesar das claras vantagens proporcionadas pelos diferentes tipos de formulação, a maioria dos biopesticidas comercializados no Brasil ainda não são formulados e nem ao menos registrados. Além disso, esses produtos não possuem informações técnicas claras quanto à classificação taxonômica do ingrediente ativo e, geralmente, usam o parâmetro biológico de “unidades formadoras de colônia (UFC)” para expressar a concentração do ingrediente ativo, o que pode dificultar a discriminação de qual tipo de propágulo está sendo utilizado como ingrediente ativo (MASCARIN; PAULI, 2010).

Dessa forma, produtos formulados, contendo materiais tais como óleos, umectantes, protetores de UV e nutrientes têm grande potencial de oferecer resultados melhores e mais consistentes no controle das pragas em condições de campo (WRAIGHT; JACKSON; KOCK, 2001). Apesar disso, as poucas empresas brasileiras que investem em formulação mantêm essa tecnologia como segredo industrial, ficando o conhecimento muito restrito.

2.2 Fatores ambientais deletérios aos fungos entomopatogênicos e vantagens da formulação

A formulação de fungos entomopatogênicos cria um paradigma muito diferente do observado para ingredientes ativos químicos. Inicialmente, o propágulo fúngico deve ser mantido vivo e capaz de infectar o hospedeiro durante todo o período de armazenamento até sua utilização, para fins de comercialização esse período deve ser de no mínimo um ano (JACKSON; DUNLAP; JARONSKI, 2010). Entretanto, por se tratar de um propágulo vivo, diversos fatores são deletérios para manutenção da viabilidade no armazenamento e persistência desses microrganismos no campo, principalmente a temperatura, a umidade e a radiação ultravioleta.

2.2.1 Temperatura

A vida de prateleira de biopesticidas fúngicos invariavelmente decresce com o aumento de temperatura, já que adicionalmente a presença de nutrientes e oxigênio, a temperatura é um dos principais moduladores o metabolismo fúngico (BURGES, 1998).

A secagem de conídios de *M. anisopliae* aumenta a sua tolerância ao estresse térmico (McCLATCHIE et al., 1994; HEDGECOCK et al., 1995; MOORE; LANGEWALD; OBOGON, 1997; HONG; ELLIS; MOORE, 1997, HONG et al., 1998). Tolerância adicional a temperatura é atingida pela preservação de conídios de *M. anisopliae* var. *acridum* em estado de anabiose, essa característica pode ser particularmente importante para o armazenamento e aplicações de campo em ambientes tropicais, em que a temperatura pode chegar a 50°C (McCLATCHIE et al., 1994). Hong, Ellies e Moore (1997) demonstraram uma relação logarítmica negativa entre o teor de umidade de conídios de *M. anisopliae* var *acridum* e sua capacidade de sobreviver ao estresse térmico (50°C). O limite inferior dessa relação foi de 4,6% de umidade e o limite superior variou entre 21,2% e 31,8% de teor umidade. Dentro desse limite, a sobrevivência de conídios submetidos a temperatura de 50°C foi incrementada com a diminuição da umidade, entretanto abaixo do limite inferior (4,6%) ou acima do limite superior modificações na umidade não impactaram a tolerância ao estresse térmico (HONG et al., 1998)

Abreu et al. (1983) verificaram que o armazenamento dos conídios a -13°C foi eficiente para a manutenção da viabilidade por até um ano. Alves et al. 1996 avaliando a sobrevivência de conídios de *B. bassiana* após 7 anos de armazenagem obtiveram 0% de viabilidade após 24 horas de incubação e 100% de viabilidade após 72 horas.

Formulações de *M. anisopliae* armazenadas a em freezer mantiveram mais de 70% de viabilidade após 660 dias (ALVES et al., 1987).

2.2.2 Umidade

O balanço de água é fundamental para o metabolismo dos fungos entomopatogênicos. A germinação de conídios e o crescimento hifal são favorecidos em umidade relativa entre 95-100%, e estas funções cessam a aproximadamente

93% (BURGES, 1998). No entanto, a umidade relativa do microambiente deve ser considerada quando se avalia o potencial de germinação, já que conídios são capazes de obter a umidade necessária para germinar nas membranas intersegmentares dos insetos mesmo em climas secos (BATEMAN et al., 1993; BURGES, 1998).

A secagem de conídios de *M. anisopliae* var *acridum* influencia a tolerância a altas temperaturas, sendo conídios mais secos os mais tolerantes. Embora o processo de secagem por convecção possa remover a água de forma mais eficiente, os conídios sobrevivem melhor a altas temperaturas (50°C) quando o processo de secagem é realizado de forma gradativa e lenta, com 50 e 60% de umidade relativa (HONG; JENKINS; ELLIS, 2000).

A sobrevivência de *M. anisopliae* var *acridum* é prolongada em alta umidade relativa (96-98%), através da manutenção da atividade metabólica, mas não permitindo a germinação (DAOUST; ROBERTS, 1983), ou em umidade relativa muito baixa (4-6%) pela redução do metabolismo (McCLATCHIE et al., 1994; HEDGECOCK et al., 1995; MOORE; LANGEWALD; OBOGON, 1997; HONG; ELLIS; MOORE, 1997; HONG et al., 1998). Além da redução do metabolismo, com baixa umidade (4 a 6%), a água metabólicamente ligada pode ser removida sugerindo a importância dos dissacarídeos, como por exemplo a trealose, na estabilização da membrana (BEKER et al., 1984; CROWE et al., 1990).

A redução do metabolismo em teores de umidade mais elevados também pode ser obtida pela remoção de oxigênio a partir do material formulado (JIN et al., 1999). Danos na membrana por embebição podem ocorrer durante a re-hidratação dos conídios, resultando em perda de material citoplasmático. Estes efeitos prejudiciais podem ser reduzidos através da incubação de esporos em alta umidade relativa durante pelo menos 1 hora antes da suspensão em água (MOORE; LANGEWALD; OBOGON, 1997) ou pela imersão dos esporos em uma mistura de surfactantes, tal como o álcool etoxilado, com razão de equilíbrio hidrofílico-lipofílico (HLB) de 10 (JIN et al., 1999).

Os efeitos do estresse hídrico nas células podem ser divididos em duas categorias: efeitos em teores de umidade mais elevados onde a água metabólica ainda está disponível e; efeitos em teores de umidade baixos onde a água metabólica que envolve e estabiliza as biomoléculas foi removida (CROWE et al., 1990).

Em teores de umidade mais elevados, os osmólitos compatíveis funcionam para estabilizar as biomoléculas no interior das células. Solutos compatíveis; incluindo eletrólitos, tais como sais inorgânicos e compostos nitrogenados e não-eletrólitos como carboidratos e polióis, podem acumular em alta concentração, sem inibir ou desestabilizar enzimas (BROWN, 1976).

O mecanismo pelo qual a hipótese de osmólitos compatíveis funciona para estabilizar biomoléculas (por exemplo, proteínas e membranas) envolve exclusão preferencial dos osmólitos compatíveis da superfície das biomoléculas, resultando em uma situação termodinamicamente desfavorável e reduzindo a denaturação de biomoléculas (CROWE et al., 1990). Polióis são também utilizados por esporos na regulação osmótica e a concentração de poliol em conídios aéreos pode influenciar a germinação em condições de baixa disponibilidade de água (HALLSWORTH; MAGAN, 1995) e a germinação de *M. anisopliae* e *L. lecanii* em pulgões *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) (ANDERSEN; MAGAN; CHANDLER, 1999).

Biomoléculas, como membranas e proteínas estão rodeados por uma camada molecular da água que atua na estabilização por ligações de hidrogênio (CROWE et al., 1990). Sob condições de desidratação extrema esta água é removida, resultando na desestabilização das biomoléculas e sugerindo uma participação extremamente importante de alguns dissacarídeos na estabilização da membrana.

Dissacarídeos não redutores, particularmente a trealose, tem a capacidade de estabilizar as membranas (CROWE; CROWE; CHAPMAN, 1984; CROWE et al., 1988; 1990; LESLIE et al., 1995) e enzimas; (CARPENTER; CROWE, 1988a, 1988b; COLAÇO et al., 1992) preservando-as sob condições de extrema dessecação quando a água molecular é removida. Esta propriedade parece ser única em dissacarídeos e em açúcares com maiores pesos moleculares e não é uma propriedade de outros crioprotetores, como "solutos compatíveis" descritos acima, que só fornecem estabilidade na presença de água livre (CROWE et al., 1990).

Dissacarídeos fornecem maior proteção a dessecação quando presentes em ambos os lados da bicamada fosfolipídica, requerendo a produção de açúcar endógeno ou a absorção a partir do ambiente (CROWE; CROWE; CHAPMAN, 1984). No entanto, dissacarídeos exógenos também têm demonstrado capacidade de aumentar a sobrevivência de microrganismos quando expostos à dessecação (LESLIE et al., 1995). As propriedades físicas destes açúcares exógenos podem afetar a tolerância ao estresse térmico dos conídios, entretanto quando a

temperatura de armazenamento começa a exceder a temperatura de vitrificação do açúcar, ocorre o aumento da atividade molecular resultando em danos irreparáveis aos conídios secos (TAN et al., 1995).

Conídios de *M. anisopliae* são capazes de sobreviver a secagem até atingir menos de 5% de umidade, sugerindo que o papel da trealose se inicia com a retirada da água ligada em condições de baixa umidade, mesmo esses conídios produzindo trealose em baixas concentrações (HALLSWORTH; MAGAN, 1994). Várias pesquisas têm demonstrado os efeitos benéficos de vários dissacarídeos não redutores, particularmente a trealose, na sobrevivência de leveduras durante a liofilização (BERNY; HENNERBERT, 1991; TAN et al., 1994; DINIZ-MENDEZ et al., 1999; LODATO; HUERGO; BUERA, 1999). Além disso, a maltose tem sido utilizada para proteger os micélios de *M. anisopliae*, durante a secagem ao ar (KRUEGER et al., 1992).

2.2.3 Radiação ultravioleta

A radiação ultravioleta causa danos diretos na estrutura do DNA e danos indiretos causados pela formação de moléculas de oxigênio reativo (IGNOFFO; GARCIA, 1978, IGNOFFO, 1992). A meia vida da maioria dos conídios de fungos entomopatogênicos varia de 1 a 4 horas sobre radiação simulada e de 4 a 400 horas sobre radiação solar nas folhas de plantas; as diferenças parecem ser provocadas pela proteção conferida pela planta ou pelo tempo de amostragem em trabalhos de campo (IGNOFFO, 1992).

Fargues et al. (1996) compararam a suscetibilidade de conídios aéreos de diferentes gêneros de fungos entomopatogênicos e concluíram que o mais tolerante a radiação solar simulada foi *M. flavoviridae* seguido por *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *I. fumosorosea* foi o menos tolerante. A sobrevivência dos conídios de *M. anisopliae* (var *acridum*) foi de 46, 23, 8 e 5% após 1, 2, 4 e 8 horas de exposição a UVB, respectivamente.

Alves et al. (1998) avaliaram a sobrevivência de *M. anisopliae* após 6 horas de exposição à radiação solar simulada e obtiveram viabilidades de 73, 50 e 0,5% em óleo puro, dispersão oleosa e suspensão aquosa, respectivamente.

Suspensões oleosas tem demonstrado aumento significativo na tolerância de conídios à radiação ultravioleta em experimentos de laboratório, principalmente pela

reflexão e refração da radiação pelo óleo em que os conídios ficam encapsulados (BURGES, 1998).

2.3 Dispersão oleosa de fungos entomopatogênicos

Um dos tipos de formulação mais simples é a oleosa, em que conídios são misturados em óleo puro ou em óleos emulsionáveis. Um aumento na eficiência de aplicações de conídios formulados em óleo tem sido amplamente reportado na literatura quando comparada a aplicações de conídios em água (PRIOR; JOLLANDS; LE PATOUREL, 1988; BATEMAN et al., 1993, 1998; INYANG et al., 2000; BATTA, 2003; POLAR et al., 2005). Vários fatores podem explicar a vantagem da aplicação de preparações oleosas em relação às aquosas, incluindo a melhor adesão em superfícies hidrofóbicas (MALSAM et al., 2002), redução da lavagem de conídios de superfícies pela chuva (INGLIS et al., 2000; INYANG et al., 2000; WRAIGHT; RAMOS, 2002), proteção contra os danos de embebição (FARIA; HAJEK; WRAIGHT, 2009), maior tolerância a radiação ultravioleta (PRIOR; JOLLANDS; LE PATOUREL, 1988; MOORE et al., 1993; ALVES et al., 1998; HEDIMBI et al., 2008) e proteção contra fungicidas químicos incompatíveis (LOPES et al., 2011)

Conídios de *B. bassiana* formulados em óleo de girassol e armazenados a 22°C mantiveram 90% de viabilidade por 240 dias (MARQUES, 1993). Alves e Bateman (2000) desenvolveram uma formulação a base de óleo Codacide com conídios de *M. anisopliae* para armazenamento em temperatura ambiente por um período similar. Formulações oleosas também permitem que o conídio fúngico seja aplicado desidratado o que reduz o efeito do estresse térmico (McCLATCHIE et al., 1994; HEDGECOCK et al., 1995; HONG; ELLIS; MOORE, 1997; HONG et al., 1998); além de serem compatíveis com a aplicação de ultra-baixo volume. Estas vantagens podem ser particularmente importantes quando se usa fungos entomopatogênicos para o controle de insetos praga em ambientes de alta temperatura, baixa umidade e alta insolação, como por exemplo o controle de gafanhotos no continente africano (BURGES, 1998).

Dispersões oleosas, entretanto, não são compostas apenas pelos conídios e óleo, é necessário adicionar um surfactante que permite a mistura dessa formulação em água para a aplicação.

Surfactantes são compostos ativos capazes de reduzir a superfície ou a tensão interfacial entre líquidos, sólidos e gases, tornando possível que eles se misturem ou fiquem dispersos como uma emulsão em água ou outro líquido (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000). Apresentam uma porção hidrofóbica ligada a um grupo funcional hidrofílico e são comumente utilizados em formulações de pesticidas químicos com a função de potencializar a ação do ingrediente ativo (OROS, CSERHATI, VRBANOVA, 1999; KROGH et al., 2003). Os surfactantes podem ser categorizados em aniônicos, catiônicos, não iônicos e anfóteros de acordo com a carga de sua porção hidrofílica após a dissociação em solução aquosa (VAN VALKENBURG, 1985). Surfactantes não iônicos são o produto da reação de um óxido de alquilenos, geralmente óxido de etileno, com álcoois graxos, ácidos graxos, alquilfenóis, alquilamina ou outros compostos que apresentem ao menos um átomo de hidrogênio e uma cadeia de carbonos entre C8-C18 (LEVITZ, 2002).

Apesar de apresentar características toxicológicas favoráveis comparado aos outros surfactantes, os surfactantes não iônicos têm capacidade de lise de microrganismos (DEMEULENAERE; HOFTE, 2000; STANGHELLINI et al, 1996, 1996b, 2000) e inclusive são eficientes no controle de algumas doenças de plantas. Substâncias com capacidade de modificar superfícies, incluindo os surfactantes não iônicos, sabidamente podem romper membranas celulares por dissolver a camada lipídica. Essa característica reduz a tensão superficial da membrana, o que resulta na lise da célula pela entrada de água. O balanço hidrofílico lipofílico dos compostos tem papel essencial na modulação desse processo (GARETH, 2000). O tamanho do arranjo de polímeros da porção hidrofílica do surfactante tem participação chave na capacidade de lise de células, e influência na mortalidade ou na compatibilidade desses surfactantes aos patógenos (DE JONGHE; HERMANS; HÖFTE, 2007). A atividade anti-microbiana de um surfactante é usualmente relacionada ao tamanho de sua cadeia de ácidos graxos, um fator chave na determinação da solubilidade da molécula (MALINA; SHAI, 2005).

Apesar de o óleo proteger os conídios de diversos fatores deletérios, a adição de protetores solares é uma estratégia interessante para aumentar a persistência de conídios após a pulverização (ALVES; PEREIRA, 1998).

Protetores solares solúveis em óleo não conseguem aumentar a eficácia de *M. anisopliae* var. *acridum* em ensaios de campo, apesar de alguns destes materiais

melhorarem a proteção contra UV em experimentos de laboratório (MOORE et al., 1993; HUNT et al., 1994; SHAH et al., 1998). A proteção conferida em laboratório ocorre, pois como a aplicação é realizada em placas de Petri, forma-se uma camada muito fina de óleo sobre os conídios (MOORE et al., 1993; HUNT et al., 1994), entretanto em aplicações no campo sobre a superfície foliar esta proteção não é confirmada (INGLIS; GOETTEL; JOHNSON, 1995).

Nas folhas os protetores solares aplicados com o óleo se espalham sobre a superfície hidrofóbica sendo absorvidos pelo mesófilo da planta e deixando os esporos expostos à luz solar direta (INGLIS; GOETTEL; JOHNSON, 1995; BURGESS, 1998). Esporos formulados em óleos emulsionáveis também demonstraram melhoria significativa na tolerância de *M. anisopliae* à luz solar simulada em experimentos em laboratório (ALVES et al., 1998). Os valores de germinação de conídios para a melhor formulação oleosa foi de $73 \pm 13\%$, enquanto que para a aquosa foi de $0,5 \pm 0,2\%$ após 6 horas de exposição à luz solar simulada. Dispersões oleosas podem ser particularmente úteis na formulação de conídios submersos de *M. anisopliae* que não podem ser suspensos diretamente em óleo. Uma dispersão oleosa foi testada em ensaios de campo com conídios submersos de *M. anisopliae* var *acridum* contra *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae) e *Zonocerus variegatus* (Orthoptera: Pyrgomorphidae) (JENKINS; THOMAS, 1996). A aplicação de conídios submersos em dispersão oleosa resultou em menor tempo de sobrevivência de insetos quando comparada a aplicação de conídios aéreos em óleo ou conídios submersos em água contendo adjuvante, ademais a dispersão oleosa incrementou a persistência dos conídios submersos em níveis suficientes para causar infecções secundárias (JENKINS; THOMAS, 1996).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de insetos do Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, situado em Piracicaba, São Paulo, Brasil.

3.1 Isolados e procedimentos utilizados para produção e análise de viabilidade e análise estatística usados em todos os experimentos

3.1.1 Procedência dos isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*

Os fungos *M. anisopliae* (ESALQ-PL43), isolado de *Mahanarva posticata* em Fleixeiras-AL e *B. bassiana* (ESALQ-1432) isolado de *Diaphorina citri* em Piracicaba-SP foram obtidos do banco de entomopatógenos do laboratório de Patologia e controle Microbiano de Insetos, ESALQ-USP, esses isolados estão armazenados na forma de conídios puros em freezer -40°C. Amostras de conídios das duas espécies fúngicas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultura B.D.A. (Batata Dextrose Agar-Difco®) previamente autoclavado, e foram espalhadas por toda a superfície do meio com o auxílio de uma alça de Drigalski. As placas permaneceram incubadas em câmara climatizada tipo B.O.D. ($26 \pm 1^\circ\text{C}$, 12 horas de fotofase) por 10 dias até que ocorresse a conidiogênese. Conídios oriundos dessas placas serviram de fonte de inóculo para a realização da produção sólida e líquida dos patógenos.

3.1.2 Produção de conídios aéreos de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*

Com exceção do bioensaio que visou avaliar a estabilidade de formulações à base de blastosporos todos os outros bioensaios foram executados com conídios aéreos oriundos de fermentação sólida em grãos de arroz. Para isso foi utilizado o método das bandejas descrito por Alves e Pereira (1998), em que sacos de polipropileno foram preenchidos com 200 g de arroz parboilizado e pré-cozido

durante aproximadamente cinco minutos e posteriormente submetidos à autoclavagem por 20 minutos a 120°C. Após resfriamento, 10 mL de suspensões contendo 5×10^6 conídios.mL⁻¹ foram inoculados no arroz, em câmara de fluxo laminar. Em seguida os sacos foram transferidos para câmara climatizada (26 ± 1°C, 12 horas de fotofase) onde permaneceram por quatro dias até que ocorresse a completa colonização do arroz pelo micélio fúngico. Bandejas plásticas (46 x 30 x 11cm) foram superficialmente esterilizadas com solução a 0,2% de hipoclorito de sódio e álcool a 70% e após a completa secagem receberam o substrato colonizado. As bandejas permaneceram sobrepostas em sala climatizada (26 ± 2°C, 12 horas de fotofase) por três a cinco dias para estimular a conidiogênese e após esse período as bandejas foram cruzadas, iniciando assim o processo de pré-secagem do substrato contendo os conídios, esse procedimento perdurou por dois a três dias. Decorrida a pré-secagem os conídios aéreos foram extraídos do substrato com o auxílio de um agitador magnético contendo peneiras de 32 mesh (Bertel- Caieiras-SP- www.bertel.com.br). As amostras de conídios puros produzidos constituíram o inóculo para a execução dos experimentos apresentados nesse trabalho.

3.1.3 Avaliação da viabilidade de conídios

Independente do experimento todas as avaliações de viabilidade de conídios foram realizadas pelo método descrito por Oliveira (2009). Para formulações em pó (conídios puros) efetuou-se a diluição em água deionizada esterilizada contendo 0,05% de Tween 80 padronizando a concentração da suspensão para aproximadamente 1×10^6 conídios.mL⁻¹. Para as formulações em óleo (dispersões oleosas), 1 mL foi transferido para tubos tipo *Eppendorf* (1,5 mL) e os mesmos centrifugados por cinco minutos à 2500 rpm (573,1xg), posteriormente o sobrenadante foi descartado e os tubos mantidos invertidos sobre papel filtro por 15 minutos. Após a eliminação do óleo foi adicionado aos conídios 100 µL do emulsionante KBRAdj e procedeu-se a homogeneização com o auxílio da ponteira da micropipeta. A suspensão (emulsionante + conídios) foi ressuspensa em 1 mL de água deionizada estéril contendo 0,05% de Tween 80, agitada em vortex por dois minutos e sonicada por três minutos. Realizou-se diluições para padronização da concentração em aproximadamente 1×10^6 conídios.mL⁻¹.

As diluições foram inoculadas em placas de Petri tipo Rodac™ (60 x 10 mm; Falcon) contendo 5 mL de meio de cultura B.D.A. (Difco®) com antibiótico Pentabiótico (5 mg/L) e 10 µL/L do fungicida Derosal®, independente da formulação. 150 µL das suspensões fúngicas foram transferidos para as placas, cobrindo os quatro quadrantes centrais, e as placas permaneceram abertas no fluxo laminar até a evaporação da água, que ocorreu por volta de 10 minutos, posteriormente as mesmas foram fechadas e mantidas em câmara incubadora tipo B.O.D. ($26 \pm 1^\circ\text{C}$, 12 horas de fotofase) por 24 horas. A análise de viabilidade foi efetuada pela contagem direta em microscópio de luz no aumento de 400x focando no centro da placa e totalizou 200 conídios por placa. Os conídios que apresentavam tubo germinativo de tamanho igual ou superior ao seu diâmetro foram considerados viáveis.

3.1.4 Análises estatísticas

Para a análise dos dados dos experimentos relacionados a seguir foram utilizadas técnicas estatísticas de modelos lineares generalizados: atividade de água e escolha do óleo vegetal (3.2), comparação de metodologias de extração de conídios (3.3), estabilidade de blastosporos formulados em diferentes inertes sólidos (3.5.), compatibilidade de emulsionantes puros aos conídios (3.6), estabilidade de formulações oleosas contendo emulsionantes (3.7), efeito da adição de dessecantes no tempo de prateleira de conídios formulados em óleo (3.8), efeito de dessecantes no tempo de prateleira de conídios formulados em óleo + emulsionantes (3.9), efeito da pré-secagem do óleo no tempo de prateleira de conídios (3.10) e efeito da formulação SC na proteção de conídios expostos a radiação UV.

No experimento que avaliou o efeito da formulação SC na proteção de conídios expostos a radiação UV foi utilizado o modelo binomial com função de ligação “probit” para o preditor linear. Para os outros experimentos, como as amostras possuíam muitas proporções iguais à zero, foi necessário utilizar modelos capazes de captar a superdispersão. O modelo que melhor se adequou foi o beta binomial, utilizando uma estrutura de regressão com função de ligação “logit” para o preditor linear, e nos casos em que a variabilidade estava relacionada com os tratamentos, foi utilizada uma estrutura de regressão com função de ligação “logit” para o

parâmetro de dispersão ϕ . Primeiramente foram considerados os modelos completos, nos quais o pacote VGAM do software R (www.r-project.org) foi utilizado para estimar os parâmetros. Com o modelo completo estimado, foi realizada uma análise de agrupamento no qual os grupos foram formados pelos tratamentos com estimativas dos parâmetros equivalentes. Posteriormente, o modelo final foi construído utilizando como variáveis explicativas os grupos formados na análise de agrupamento.

O ajuste dos modelos foi verificado mediante construção de gráficos de envelope simulado. A verificação de diferenças significativas entre as curvas foi feita pelo teste da razão de verossimilhança, e se uma curva testada com a outra mais próxima mostrou diferença significativa, não se fez necessária à comparação com uma curva mais distante.

Após o ajuste do modelo, para realizar o cálculo dos tempos letais utilizou-se as inversas dos modelos obtidos, que depende unicamente da proporção e dos parâmetros estimados. Na prática, encontrar as inversas dos modelos propostos não é trivial devido as grandes quantidades de parâmetros, porém alguns *softwares* possuem funções implementadas para realizar esses cálculos. Nesse trabalho foi utilizado o *software* R, no qual possui a função *predict* implementada que auxilia nos cálculos dos tempos letais.

Para os experimentos de virulência das formulações a *Tenebrio molitor* foram utilizadas técnicas estatísticas de análise de sobrevivência, pois os mesmos insetos foram observados ao longo do tempo. Para a construção das curvas de sobrevivência, foram utilizadas as estimativas de Kaplan-Meier. No último dia de avaliação, os insetos vivos foram considerados censurados. Para verificar a diferença entre as curvas de sobrevivência, foi utilizado o teste de *log-rank*, o qual é adequado para dados que possuem observações censuradas.

3.2 Estabilidade de blastosporos de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* formulados em diferentes inertes sólidos

Blastosporos dos dois fungos foram obtidos por fermentação líquida em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 150 ml de meio que ficaram sob agitação em

shaker orbital (180 RPM) por um período de cinco dias ($26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 12 horas de fotofase).

Para *M. anisopliae* foi utilizado o meio de cultura Adamek (1963) (4% glucose, 4% extrato de levedura, 3% milhocina) suplementado com 4% de Tween 80. Os corpos hifais unicelulares e com parede celular fina produzidos no meio Adamek foram caracterizados como blastosporos. Para *B. bassiana* foi utilizado o meio SDY (4% dextrose, 1% peptona, 10% extrato de levedura, 0,05% de antibiótico pentabiótico).

Após o crescimento fúngico as suspensões foram filtradas em peneira (200 mesh) para a retirada de fragmentos maiores de micélio visando à obtenção de uma suspensão contendo apenas blastosporos. Devido a menor concentração obtida para *M. anisopliae* a suspensão foi concentrada por centrifugação (Sorvall RT 6000, 3 minutos, 1500rpm/5393g). A concentração final de blastosporos foi aferida em câmara de Neubauer e totalizou $5,65 \times 10^6$ blastosporos.ml⁻¹ para *M. anisopliae* e $2,41 \times 10^8$ blastosporos.ml⁻¹ para *B. bassiana*.

Quatro diferentes argilas foram utilizadas como inertes e foram adicionadas a 20 mL de suspensão de blastosporos para confecção das formulações, correspondendo cada uma a um tratamento, além do controle que constou apenas da suspensão de blastosporos (suspensão líquida). As argilas utilizadas foram: Caulim (BrasilMinas- www.brasilminas.net), Talco (BrasilMinas), Zeolita 4A (Wetstop®) e Zeolita clinoptololita (BrasilMinas). Em função das particularidades físicas das argilas, o que resulta em capacidade distinta na absorção de água, cada formulação foi preparada com diferentes quantidades de inertes, que foram capazes de absorver completamente 20 mL da suspensão de propágulos (Tabela 3.2.1).

Tabela 3.2.1 - Quantidades de inertes utilizados nas formulações pó-molhável adicionados a 20 ml de suspensão de blastosporos fúngicos

Fungo	Inerte	Quantidade (g)	Concentração (blastosporos/g de PM)
<i>M. anisopliae</i>	Caulim	20	$5,65 \times 10^6$
	Talco	35	$3,22 \times 10^6$
	Zeolita4A	40	$2,82 \times 10^6$
	Zeolita	20	$5,65 \times 10^6$
<i>B. bassiana</i>	Caulim	22,5	$2,14 \times 10^8$
	Talco	37,5	$1,28 \times 10^8$
	Zeolita4A	36	$1,33 \times 10^8$
	Zeolita	22,5	$2,14 \times 10^8$

Decorrida a completa homogeneização das misturas (suspensão de blastosporos + argila), os tratamentos foram espalhados em placas de Petri e submetidos à pré-secagem em câmara de fluxo laminar por três horas. Posteriormente os grânulos foram desfeitos com auxílio de cadinho, e amostras de todas as formulações foram mantidas conjuntamente em uma mesma caixa plástica hermética de 3,2 L contendo 400 g de sílica gel, durante três dias em câmara incubadora tipo B.O.D ($26 \pm 1^\circ\text{C}$, 12 horas de fotofase), dessa forma a atividade de água dos diferentes tratamentos foi padronizada.

Após a secagem as formulações (1 g) foram transferidas para tubos tipo *Eppendorf* (1,5 mL), embaladas à vácuo, e armazenadas em refrigerador (4°C) e B.O.D. (26°C). O método das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por plaqueamento em meio B.D.A. (Difco®) foi utilizado para quantificação de propágulos viáveis. Foi efetuada uma avaliação prévia para definição da concentração inicial de propágulos viáveis por grama ou mL de cada tratamento, utilizando-se esse número como base para as determinações da redução da viabilidade dos propágulos nas avaliações subsequentes.

As avaliações foram realizadas aos 0, 15, 30, 50 e 93 dias após o armazenamento totalizando 200 observações por fungo. As estimativas dos parâmetros do preditor linear dos modelos estão apresentadas no Anexo A.

3.3 Comparação de metodologias para a extração de conídios

O método de extração de conídios do substrato é uma importante etapa para a formulação de fungos entomopatogênicos. A base para a execução desse ensaio foi arroz úmido colonizado pelos fungos após a conidiogênese em bandejas. Três métodos de extração foram comparados, lavagem do arroz + fungo em água, lavagem do arroz + fungo em óleo e peneiramento. No tratamento controle os conídios não foram extraídos do arroz. Como no método de extração em óleo o fungo foi armazenado no próprio óleo de extração e já é reconhecido o efeito do óleo na sobrevivência de conídios, os tratamentos resultantes da extração por lavagem em água e por peneiramento foram armazenados como conídios puros e também em óleo para comparação com o tratamento por extração em óleo. Desta forma, foram elaborados seis tratamentos para cada fungo, *M. anisopliae* e *B. bassiana*,

descritos a seguir e apresentados na Tabela 3.3.1. O tratamento 1 consistiu em pré-secagem em sala climatizada a 23°C por três dias e o fungo foi extraído do arroz por peneiramento em agitador magnético contendo peneiras de 32 mesh (Bertel) e a secagem final dos conídios puros foi feita em caixa plástica hermética de 3,2 L com 400 g de sílica gel.

O tratamento 2 consistiu de conídios oriundos de amostras do tratamento 1 que foram misturados em óleo de girassol. No tratamento 3 o arroz não passou por pré-secagem (*M. anisopliae*: aa: 0,990; *B. bassiana*: aa: 0,949) e foi imediatamente lavado em água (500 g de arroz + fungo e 600 mL de água) e os conídios filtrados em papel filtro qualitativo (Unifil™, 12,5 cm de diâmetro, 80 g/m², velocidade de filtração norma DIN 53137: 20 – 25 s) em funil de Büchner acoplado ao Kitasato e sob sucção imposta por uma bomba de vácuo. O papel de filtro contendo os conídios foi mantido em câmara de fluxo por 1 hora para pré-secagem e a secagem final dos conídios puros foi feita em caixa plástica hermética de 3,2 L com 400 g de sílica gel.

O tratamento 4 consistiu de amostras que passaram pelo mesmo procedimento do tratamento 3, sendo os conídios obtidos misturados em óleo. O tratamento 5 consistiu em pré-secagem do arroz + fungo em sala climatizada a 23°C por três dias. Este tratamento foi armazenado na forma de arroz + fungo seco e é referido a seguir como controle. O tratamento 6 consistiu de todos os passos do tratamento 5, mas ao final os conídios foram extraídos por lavagem em óleo de girassol (200 g de arroz + fungo em 300 mL de óleo). A secagem final de todos os tratamentos descritos acima foi feita em uma única caixa plástica hermética de 3,2 L com 400 g de sílica gel, visando à padronização da atividade de água (aa) dos conídios e os valores encontram-se na Tabela 3.3.1.

Tabela 3.3.1 - Tratamentos realizados no bioensaio de extração de conídios com distintos tipos de extração e formulação em óleo de girassol ou manutenção de conídios puros de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*

Tratamento ¹	Aa no momento da formulação	Extração	Formulação
1- EPP	Ma : 0,61 Bb: 0,56	Peneira	Conídios Puros
2- SCP	Ma : 0,61 Bb: 0,56	Peneira	Conídios + Óleo
3- EPA	Ma: 0,55; Bb: 0,53	Lavagem Água	Conídios Puros
4- SCA	Ma: 0,55; Bb: 0,53	Lavagem Água	Conídios + Óleo
5- A+F (controle)	Ma: 0,62; Bb: 0,67	-----	Conídios + Arroz
6- SCO	Ma: 0,62; Bb: 0,67	Lavagem Óleo	Conídios + Óleo

¹ EP = Esporos Puros, SC= Suspensão oleosa, P = extração por peneiras, A = Extração por lavagem em água, O = Extração por lavagem em óleo e A+F = Arroz + fungo seco

Após o processo de extração e formulação, alíquotas de 0,15 g ou 1 mL foram separadas em tubos tipo *Eppendorf* (1,5 mL) e embaladas à vácuo. As amostras foram mantidas a 26°C em B.O.D. e as avaliações de viabilidade ocorreram em intervalos de 15 dias após o armazenamento (15, 30, 45, 60, 75, 90 e 105 dias após armazenagem), totalizando sete avaliações e 672 observações para cada fungo.

A análise estatística foi realizada separadamente para *M. anisopliae* e *B. bassiana*, e o modelo final selecionado para ambos foi o beta binomial com função de ligação “logit”. As estimativas dos modelos encontram-se no Anexo B.

Com os modelos ajustados, foram feitas as comparações de proporções de viabilidade de conídios ao longo dos 105 dias, entre os tratamentos e também entre o fator presença e ausência de óleo.

3.4 Atividade de água e escolha do óleo vegetal

Para obtenção de conídios com diferentes níveis de umidade, amostras de 16,5 g de conídios de cada um dos patógenos foram mantidas em caixa plástica hermética (3,2 L) contendo 40 g de sílica gel dentro de câmara incubadora tipo B.O.D (26 ± 1°C, 12 horas de fotofase) por um, dois, três, quatro e cinco dias. As amostras de conídios utilizadas como controle não passaram pelo processo de secagem forçada, mas apenas pela pré-secagem em sala. Após os diferentes períodos de secagem as amostras de conídios foram rapidamente retiradas das câmaras de secagem e armazenadas em tubos tipo *Falcon* (50 mL), os quais foram

embalados à vácuo (Webomatic – Easy Pack- www.webomatic.de) em embalagem aluminizada evitando assim a troca de umidade das amostras.

As embalagens foram mantidas em freezer a -20°C até o uso. Decorrido o último dia de secagem alíquotas de 0,7 g de cada amostra foram utilizadas para determinação da atividade de água realizada a 25°C em analisador de atividade de água (LabMaster.aw, Novasina – Suíça - www.novasina.com). Os níveis de atividade de água resultantes dos diferentes períodos de secagem de cada um dos fungos encontram-se discriminados na Tabela 3.4.1 Para *M. anisopliae* a secagem foi realizada por até quatro dias e para *B. bassiana* por até cinco dias.

Tabela 3.4.1 - Níveis de atividade de água resultante de diferentes períodos de secagem de conídios de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*

Entomopatógeno	Período de secagem (dias)	Atividade de Água (25°C)
<i>Metarhizium anisopliae</i>	0	0,954
	1	0,785
	2	0,636
	3	0,498
	4	0,272
<i>Beauveria bassiana</i>	0	0,870
	1	0,778
	2	0,619
	3	0,480
	4	0,295
	5	0,134

Imediatamente após a análise, amostras de conídios correspondentes a cada uma das atividades de água foram quantificadas em câmara de Neubauer e alíquotas adicionadas aos óleos de soja e girassol (Liza™), ajustadas para a concentração final de 2×10^9 conídios.mL⁻¹. O tratamento controle consistiu de conídios puros com os diferentes níveis de atividade de água. Para *M. anisopliae*, o bioensaio constou de 15 tratamentos, sendo cinco níveis de secagem, dois tipos de óleo e cinco controles sem óleo. Para *B. bassiana* foi utilizado um tempo de secagem a mais totalizando 18 tratamentos. Os tratamentos foram mantidos a 26°C em câmara incubadora tipo B.O.D. e a 30°C em estufa microprocessada para cultura bacteriológica. Cada tratamento consistiu em 100 tubos tipo *Eppendorf* (1,5 mL), contendo 1,0 mL da suspensão oleosa ou 0,15 g de conídios puros, sendo 50 tubos armazenados a temperatura de 26°C e os outros 50 a temperatura de 30°C.

Para *M. anisopliae*, o bioensaio constou de 1500 tubos tipo *Eppendorf* (1,5 mL) independentes e para *B. bassiana* de 1800 tubos tipo *Eppendorf* (1,5 mL). As amostras correspondentes a cada uma das avaliações e temperatura de armazenamento foram embaladas à vácuo (Webomatic – Easy Pack) com o intuito de manter a atividade de água inicial dos tratamentos evitando-se a troca de umidade entre as amostras. Imediatamente após o processo de formulação, foi analisada a viabilidade dos conídios de todos os tratamentos (tempo 0), correspondendo a viabilidade inicial do ensaio. As análises de viabilidade subsequentes foram realizadas aos 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 e 135 dias após o armazenamento das amostras, totalizando nove avaliações e 4320 observações para *M. anisopliae* e 5184 observações para *B. bassiana*.

3.5 Compatibilidade de emulsionantes puros diretamente misturados aos conídios

Conídios de *B. bassiana* (aa: 0,187 / viabilidade inicial: 94,1%) e *M. anisopliae* (aa: 0,205 / viabilidade inicial: 88,6%) foram adicionados a amostras de 20 diferentes emulsionantes (Tabela 3.5.1) com o intuito de avaliar a compatibilidade e determinar a sobrevivência dos conídios após diferentes períodos de armazenamento a 26°C em câmara incubadora tipo B.O.D. O tratamento controle constou de conídios puros sem adjuvantes e os tratamentos nas combinações de conídios misturados aos emulsionantes e ajustados para concentração final de 2×10^9 conídios.mL⁻¹. Cada tratamento foi dividido em tubos *Eppendorf* (1,0 mL ou 0,15 g), sendo quatro repetições por período de avaliação, totalizando 40 tubos por tratamento. As avaliações foram realizadas aos 15, 30, 75, 98 e 125 dias após o armazenamento (880 observações por fungo) e seguiram o método da contagem direta de acordo com a metodologia descrita no item 3.1.3 para formulações oleosas com exceção da adição do emulsionante KBRA_{Adj}.

Tabela 3.5.1 - Emulsionantes utilizados nos testes de compatibilidade com os conídios dos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*

Código	Nome Comercial	Característica Química	HLB	Empresa
E1	CSO 40B	Óleo de mamona etoxilado 40 EO	13,0	Cognis
E2	Ultrol L60	Álcool Laurílico etoxilado 6 EO	11,5	Oxiteno
E3	Ultrol L90	Álcool Laurílico etoxilado 9 EO	13,4	Oxiteno
E4	Ultrol L20	Álcool Laurílico etoxilado 2 EO	6,4	Oxiteno
E5	KBRAdj	Solubilizador de óleos	-	Em fase de registro
E6	Ultrasist 1180	Ésteres etoxilados e alcoóis etoxilados		Oxiteno
E7	Tween 80	Monooleato de Sorbitano etoxilado 20 EO	15	Oxiteno
E8	Silwet L77	Heptametiltrisiloxano com éter metil aliloxipoli(etilenoglicol)	7,0	Momentive Performance Materials Ltd.
E9	Ultracid GS60	Ácido graxo de soja 6 EO	9,7	Oxiteno
E10	Ultradet LE600	Poliéter glicólico graxo	-	Oxiteno
E11	Ultramona R150	Óleo de mamona etoxilado 15 EO	8,3	Oxiteno
E12	Agnique BL 4130	Combinação de tensoativos	-	Cognis
E13	Dehydol CD2	Álcool laurílico etoxilado 2 OE	-	Cognis
E14	Dehydol CD6	Álcool laurílico etoxilado 6 EO	-	Cognis
E15	Eumulgin L	PPG-1 PEG-9 Éter lauril glicol	-	Cognis
E16	Ultrol L30	Álcool Laurílico etoxilado 3 EO	8,3	Oxiteno
E17	Ultrol L70	Álcool Laurílico etoxilado 7 EO	12,1	Oxiteno
E18	Ultrol L80	Álcool Laurílico etoxilado 8 EO	12,9	Oxiteno
E19	CSO 40	Óleo de mamona etoxilado 40 EO	13,0	Cognis
E20	CSO 30LM	Óleo de mamona etoxilado 30 EO	-	Cognis

Com os modelos ajustados para *B. bassiana* e *M. anisopliae* (Anexo D), foram realizadas as comparações das proporções de viabilidade ao longo dos 125 dias, entre os tratamentos agrupados e os não agrupados.

3.6 Estabilidade de formulações oleosas contendo emulsionantes

Nesse bioensaio foram utilizados conídios dos fungos *M. anisopliae* (Ma) e *B. bassiana* (Bb) submetidos a dois períodos de secagem em câmara hermética contendo 16,5 g de conídios e 80 g de sílica gel por quatro e cinco dias (T1 e T2), que resultaram nos níveis de atividade de água e viabilidade inicial de: MaT1: aa:

0,281 / viabilidade inicial: 85,8% - MaT2: aa: 0,205 / viabilidade inicial: 88,6% - BbT1: aa: 0,292 / viabilidade inicial: 95,3% e BbT2: aa: 0,187 / viabilidade inicial: 94,1%.

Os conídios foram formulados em óleo de girassol (controle) e em formulações contendo óleo de girassol mais 5% (v/v) de cada um dos 20 emulsionantes (Tabela 3.5.1), na concentração final de 2×10^9 conídios.mL⁻¹. Para cada patógeno em cada um dos dois níveis de secagem resultaram 21 tratamentos. As formulações foram transferidas para tubos *Eppendorf* (1,5 mL) com quatro repetições por intervalo de avaliação e foram armazenadas a 26°C ou 30°C efetuando-se avaliações de viabilidade aos 15, 30, 68 e 96 dias após a armazenagem, totalizando 1344 observações para cada espécie fúngica. A metodologia empregada para a avaliação da viabilidade de conídios foi semelhante ao descrito no item 3.1.3.

Com os modelos ajustados para *B. bassiana* e *M. anisopliae*, foram realizadas as comparações das proporções de viabilidade de conídios ao longo dos 96 dias, entre os tratamentos agrupados e os não agrupados por tipo de secagem e temperatura.

3.7 Efeito da adição de dessecantes no tempo de prateleira de conídios formulados em óleo vegetal

Ensaio 1: O objetivo do bioensaio foi avaliar a ação de agentes dessecantes no aumento do tempo de prateleira de conídios formulados em óleo de girassol. Os dessecantes utilizados foram Sílica gel (Chemco; 1-4mm, indicador azul SiO₂ pureza min: 98%, Densidade: 0,7g/cm³) e Glicerol (Chemco; C₃H₅(OH)₃ min: de 99,5%, Densidade a 25°C: 1,26g/cm³), e os mesmos foram avaliados nas proporções de 1, 3 e 5% (m/v). Foram formulados conídios de *M. anisopliae* e *B. bassiana* com dois períodos distintos de secagem (os mesmos do item anterior) utilizando-se a mesma concentração de conídios do bioensaio anterior. Foram utilizadas quatro repetições por tratamento e cada uma delas consistiu de 30 mL da formulação armazenadas em tubo de vidro (40 x 120mm) contendo os agentes dessecantes (tratamentos) ou sem adição dos dessecantes (testemunha). O volume exato de cada repetição foi determinado para cálculo da quantidade de dessecante utilizado. O bioensaio foi composto por 14 tratamentos para cada espécie fúngica e para cada intervalo de avaliação 500 µL da formulação foram retirados do frasco de vidro correspondente a cada repetição.

O método de análise foi o mesmo exemplificado no item 3.1.3 e as avaliações foram realizadas aos 15, 53, 69, 90, 130 e 160 dias após o armazenamento a 26°C em B.O.D. totalizando 672 observações para cada fungo.

Ensaio 2: O bioensaio foi repetido no tempo e apenas o dessecante sílica gel foi utilizado. A metodologia foi a mesma exemplificada acima, entretanto com outro lote de conídios de *M. anisopliae* (aa: 0,160, viabilidade inicial: 86,94%) e *B. bassiana* (aa: 0,152, viabilidade inicial: 94,9%) secos por cinco dias em câmara hermética contendo 100 g de sílica gel. As avaliações foram realizadas aos 24, 36, 51, 65, 79, 107, 133, 165, 197, 220 e 257 dias após a armazenagem a 26 e 30°C totalizando 704 observações por fungo.

3.8 Efeito da adição de dessecantes no tempo de prateleira de conídios formulados em óleo vegetal + emulsionantes

O objetivo do bioensaio foi avaliar a ação de dessecantes no aumento do período de tempo de prateleira de conídios formulados em óleo de girassol contendo emulsionantes. Os emulsionantes selecionados para esse experimento foram: E5, E7, E8 e E11 e o dessecante foi a sílica gel na proporção de 5% (m/v). Foram formulados conídios de *M. anisopliae* (aa: 0,160, viabilidade inicial: 86,94%) e *B. bassiana* (aa: 0,152, viabilidade inicial: 94,9%) secos por cinco dias em câmara hermética contendo 100 g de sílica gel.

Cada tratamento constou de quatro repetições e cada uma delas consistiu de 30 mL da formulação (óleo de girassol + 5% de emulsionantes + conídios) armazenadas em tubo de vidro (40 x 120mm) contendo o agente dessecante (tratamentos) ou sem adição do dessecante (testemunha). O volume exato de cada repetição foi determinado para cálculo da quantidade de dessecante utilizado. O bioensaio foi composto por 11 tratamentos para cada espécie fúngica e temperatura de armazenamento (26°C em B.O.D. e 30°C em estufa microprocessada para cultura bacteriana). As avaliações foram efetuadas aos 22, 37, 52, 65, 80, 109, 135, 165, 197, 219 e 257 dias após a mistura (1936 observações por espécie fúngica), e para cada intervalo de avaliação 500 µL da formulação foram retirados do frasco de vidro (120 x 40 mm) correspondente a cada repetição. O método de análise foi o mesmo exemplificado no item 3.1.3. para formulações oleosas.

3.9 Efeito da pré-secagem do óleo no tempo de prateleira de conídios

O objetivo do bioensaio foi avaliar o efeito da secagem prévia do óleo de girassol e do emulsionante comparando-se com combinações que receberam o dessecante apenas no momento da formulação. Para a secagem prévia, 200 mL de óleo de girassol e 200 mL do emulsionante E5 foram colocados separadamente em frascos tipo *Schott* (250 mL) contendo 140 g de sílica gel, e permaneceram por sete dias em câmara incubadora tipo BOD (26°C) antes de serem utilizados para a formulação. Como padrão de comparação foram utilizadas amostras de óleo e emulsionante que não passaram pelo processo de secagem, denominados “óleo sem secagem” e “E5 sem secagem”. Foram formulados conídios de *M. anisopliae* (aa: 0,092, viabilidade inicial: 91,6%) e *B. bassiana* (aa: 0,034, viabilidade inicial: 95,6%) secos por sete dias em frascos de vidro de 500 mL com tampa hermética contendo 200 g de sílica gel. Os tratamentos para cada espécie fúngica estão descritos a seguir e discriminados na Tabela 3.9.1: O tratamento 1 consistiu de 5 g de conídios puros alocados em frascos de vidro (40 x 120mm) sem óleo e o tratamento 2 foi semelhante ao T1 apenas com a adição de 5% de sílica gel ao frasco contendo os conídios. O tratamento 3 consistiu de conídios formulados (2×10^9 conídios.mL⁻¹) em 30 mL de óleo de girassol sem secagem prévia. O tratamento 4 foi semelhante ao T3 exceto pela adição de 5% de sílica ao frasco. O tratamento 5 consistiu de conídios formulados em óleo de girassol com secagem prévia e o tratamento 6 foi semelhante ao T5 mas com a adição de 5% de sílica gel. Os tratamentos 7 e 8 utilizaram o óleo pré-seco sendo que no T7 foi adicionado 5% do emulsionante seco enquanto no T8 foi adicionado 5% do emulsionante sem secagem prévia. O tratamento 9 foi semelhante ao T5 e com a adição de 0,5% de Sílica pirogênica, e o tratamento 10 foi semelhante ao T9 e adicionou-se 5% do emulsionante E5 pré-seco na formulação.

Tabela 3.9.1 - Combinação de fatores utilizados para confecção das formulações de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*

Tratamento	Óleo	Emulsionante	Sílica gel (5%)	Sílica Pirogênica (0,5% p/v)
1				
2			Sim	
3	Sem secagem			
4	Sem secagem		Sim	
5	Com secagem			
6	Com secagem		Sim	
7	Com secagem	Com secagem		
8	Com secagem	Sem secagem		
9	Com secagem			Sim
10	Com secagem	Com secagem		Sim

O bioensaio foi composto por 10 tratamentos para cada espécie fúngica armazenados a 26°C em B.O.D. e os mesmos tratamentos foram mantidos a 30°C em estufa microprocessada para cultura bacteriana. As avaliações foram efetuadas aos 14, 46, 68, 103 e 139 dias após a armazenagem (800 observações por fungo), e para cada intervalo de avaliação 500 µL ou 0,1 g da formulação foram retirados do frasco de vidro correspondente a cada repetição. O método de análise foi o mesmo exemplificado no item 3.1.3. para formulações oleosas e conídios puros.

3.10 Efeito da formulação dispersão oleosa na proteção de conídios expostos a radiação UV

Conídios de *M. anisopliae* e *B. bassiana* foram formulados em óleo emulsionável (óleo de girassol + 5% v/v do emulsionante E5) na concentração final de 2×10^9 conídios.mL⁻¹ além de conídios não formulados, ou seja mantidos como conídios puros. Foram preparadas suspensões em água para cada tratamento na concentração final de 1×10^8 conídios.mL⁻¹ e 2 mL foram pulverizados em torre de Potter (15lb/pol²) sobre lamínulas de vidro previamente esterilizadas. Posteriormente as lamínulas permaneceram por cinco minutos em temperatura ambiente para a completa secagem. Foram utilizadas quatro repetições por tratamento para cada período de avaliação e as lamínulas correspondentes a cada avaliação (todos os tratamentos) foram dispostas conjuntamente em uma única placa de Petri.

As lâmpadas da câmara foram ligadas 30 minutos antes da exposição, e após este período as placas foram colocadas dentro da caixa de madeira e expostas a

radiação UV por diferentes intervalos de tempo. Na parte superior das placas, foi colocado um filtro de acetato para que a radiação fosse uniforme e o espectro de radiação fosse reduzido somente para a radiação UV-B e parte da UV-A (290–400 nm). Uma placa foi retirada da câmara para cada avaliação que ocorreu após uma, duas, três e quatro horas de exposição. Uma avaliação prévia foi feita para determinar a viabilidade dos conídios no tempo zero, ou seja, antes da exposição à UV. A avaliação da viabilidade dos conídios foi realizada em placas contendo meio BDA (Difco®) contendo antibiótico pentabiótico (5 mg/L) e fungicida Derosal® (1 µL/L). O processo de lavagem consistiu da colocação da lamínula em tubo de vidro contendo 150 µL de água + espalhante adesivo (0,05% Tween 80) e a lamínula foi quebrada com o auxílio de uma ponteira estéril, posteriormente o tubo foi fechado com filme plástico, agitado por dois minutos em vórtex e sonificado por três minutos. Após a lavagem os 150 µL de suspensão foram transferidos para placa Rodac e a viabilidade aferida após 24 horas de incubação em câmara de germinação tipo B.O.D. ($26 \pm 1^\circ\text{C}$, 12 horas de fotofase).

Para cada espécie fúngica foi proposto um modelo para explicar a proporção de conídios viáveis considerando as variáveis explicativas tempo e tratamento.

As estimativas dos parâmetros, desvios padrões e valor-p do teste de significância para o modelo da função de ligação “*probit*” ($\pi = \Phi(X\beta)$), que explicam as proporções de viabilidade são apresentados no Anexo I.

O teste da razão de verossimilhança foi realizado para verificar as diferenças entre as curvas de cada fungo para os níveis da covariável óleo.

3.11 Efeito da formulação dispersão oleosa de *M. anisopliae* e *B. bassiana* na eficiência de controle de *Tenebrio molitor*

Ensaio 1: Insetos oriundos da criação do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos foram utilizados para o bioensaio. Foram separadas larvas de 1,0 a 1,15 cm de comprimento de *Tenebrio molitor* e agrupadas em conjuntos de 60 insetos. Os insetos foram acondicionados em placas de Petri e pulverizados em torre de Potter (15lb/pl²) com 2,0 mL de suspensões na concentração final de 1×10^8 conídios.mL⁻¹ de *M. anisopliae* ou *B. bassiana*, obtidas pela diluição em água estéril das formulações oleosas (óleo de girassol com 5% de emulsionante E5 e 2×10^9 conídios viáveis.mL⁻¹) ou dos conídios puros.

Após a pulverização os insetos permaneceram por um minuto nas placas de Petri, para redução da umidade, e posteriormente foram separados em grupos de 11 indivíduos que foram mantidos em placas de bioensaio (6 cm de diâmetro e 1,5 cm de altura) contendo cubos de cenoura, o que correspondeu a uma repetição.

O ensaio consistiu de duas testemunhas, sendo uma delas composta apenas por água estéril e a outra por óleo + emulsionante sem o fungo na mesma concentração utilizada nas formulações, dois tratamentos com *M. anisopliae* (MA) (conídios puros e formulação do tipo dispersão oleosa) além dos mesmos dois tratamentos com *B. bassiana* (BB). O bioensaio foi mantido em câmara incubadora a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12 horas de fotofase, e totalizou seis tratamentos divididos em cinco repetições de 11 insetos cada. A mortalidade foi verificada diariamente por 11 dias e os insetos mortos mantidos em câmara úmida para confirmação da mortalidade pelos patógenos após a conidiogênese nos cadáveres. Para a análise estatística foram considerados os tratamentos Controle, “MA” e “BB”, porém no tratamento controle foi constatado morte de nenhum inseto ele foi desconsiderado da análise. A formulação dispersão oleosa foi considerada como fator dentro dos tratamentos: “S” (Formulado) e “N” (Conídios puros). Os insetos que permaneceram vivos após os 11 dias foram considerados dados censurados do tipo I.

Para verificar a diferença entre os tratamentos foram realizadas as estimativas de Kaplan e Meier (1958) utilizando o *software* R e o teste de *logrank* para cada combinação de tratamento e óleo. Para garantir que o nível de significância global fosse de 5% foi necessário utilizar a correção de Bonferroni, a qual utilizou o novo nível de significância sendo 5% dividido pelo número de testes a serem aplicados, nesse caso 6 testes, resultando no nível de significância de 0,8% para cada teste.

Ensaio 2: A metodologia empregada no bioensaio 2 foi a mesma do bioensaio 1. Entretanto além de formulações compostas pelo emulsionante E5 foram utilizadas formulações com o emulsionante E7. O bioensaio consistiu de três testemunhas, sendo uma delas composta por água estéril e as outras compostas pelas duas formulações oleosas (E5 e E7), três tratamentos com *M. anisopliae* (conídios puros, formulação oleosa com E5 e formulação oleosa com E7) e os mesmos três tratamentos com *B. bassiana*.

No experimento realizado, foram considerados três tipos de tratamentos: água (Ep), formulação oleosa com emulsionante Tween (Sc Tw) e formulação oleosa com

emulsionante KBRAdj (Sc Sol). Para cada tratamento foi adicionado o fator fungo em três níveis, sendo eles: *B. bassiana* (Bb), *M. anisopliae* (Ma) e Controle (N), totalizando 9 possíveis combinações.

Cada parcela era composta por 11 insetos e o tempo do estudo foi fixado em 14 dias, caracterizando censuras do tipo I os insetos de continuaram vivos após os 14 dias. Para cada combinação de tratamento e fungo foram realizadas cinco repetições totalizando 495 observações. Os insetos tratados com a ausência do fator fungo (controle) tiveram 1% de falhas (mortalidade) ao longo dos 14 dias, sendo assim, o nível “controle” foi excluído da análise.

Para verificar a diferença entre os tratamentos foram realizadas as estimativas de Kaplan e Meier (1958) utilizando o *software* R. Como o teste de *logrank* foi significativo, fez-se necessário realizar o teste de comparações múltiplas para cada nível da covariável tratamento. Foi considerado um nível de significância global de 5% e utilizada a correção de Bonferroni, sendo assim, para cada teste o nível de significância considerado foi igual à $\alpha=1,66\%$ ($0,05/3$). Para verificar estatisticamente quais combinações de tratamento com fungo foram diferentes, foi realizado o teste de *logrank* com correção de Bonferroni para comparações múltiplas. Para manter o nível de significância global, o nível de significância de cada teste foi de $\alpha=0,0033$, o qual representou 5% dividido pelo número de testes realizado, para este caso 15.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estabilidade de blastosporos de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* formulados em diferentes inertes sólidos

A concentração final de blastosporos foi aferida em câmara de Neubauer e totalizou $5,65 \times 10^6$ blastosporos.ml⁻¹ para *M. anisopliae* e $2,41 \times 10^8$ blastosporos.ml⁻¹ para *B. bassiana*.

A argila Zeolita 4A foi a menos compatível com *B. bassiana*, independente da temperatura de armazenamento, tendo apresentado a taxa mais rápida de redução de viabilidade em comparação as demais argilas ($p < 0,001$), sendo superior apenas ao tratamento controle. No controle, observou-se mortalidade total dos blastosporos já na primeira avaliação e por este motivo os dados não foram inseridos na análise (Figura 4.1.1).

Figura 4.1.1 - Estimativas do modelo ajustado para viabilidade de blastosporos de *Beauveria bassiana* formulados em diferentes argilas. A) Armazenamento a 4°C; B) Armazenamento a 26°C

Para as duas temperaturas de armazenagem (4°C e 26°C) o melhor tratamento foi a combinação com Zeolita, que foi estatisticamente superior ao talco ($P < 0,001$), que por sua vez foi estatisticamente superior ao caulim. A TL_{20} a 4°C para a Zeolita foi de 84 dias, 20% superior ao obtido com o talco e 58% em relação ao Caulim. A 26°C a TL_{20} do melhor tratamento foi de 47 dias, 38% superior ao Talco e 3,35 vezes superior ao Caulim (Tabela 4.1.1).

Tabela 4.1.1 - Estimativas dos tempos letais em dias de blastosporos de *Beauveria bassiana* formulados em diferentes argilas e armazenados a 4 e 26°C

Redução de viabilidade (%)	Temperatura							
	4°C				26°C			
	Tratamento				Tratamento			
	Caulim	Talco	Zeol4A	Zeolita	Caulim	Talco	Zeol4A	Zeolita
20%	53	70	0	84	14	34	0	47
50%	88	>93	32	>93	49	70	0	82
90%	>93	>93	89	>93	>93	>93	46	>93

Para *M. anisopliae* os tratamentos Talco e Zeolita 4A causaram mortalidade total de propágulos já na primeira avaliação e não foram inseridos na análise.

Apesar dos tratamentos terem demonstrado tendência de redução de viabilidade próximas, os 3 tratamentos diferiram estatisticamente entre si ($P < 0,001$). O maior período de prateleira ocorreu com a Zeolita (Figura 4.1.2), seguida do controle e do Caulim para as duas temperaturas de armazenamento. O TL_{50} do tratamento Zeolita foi de 56 e 10 dias, a 4 e 26°C, respectivamente, valores 12 e 66% superiores aos do tratamento controle (Tabela 4.1.2).

Tabela 4.1.2 - Estimativas dos tempos letais em dias para blastosporos de *Metarhizium anisopliae* formulados em diferentes argilas e armazenados a 4 e 26°C

% de redução de viabilidade	Temperatura					
	4°C			26°C		
	Tratamento			Tratamento		
	Caulim	Controle	Zeolita	Caulim	Controle	Zeolita
20%	24	33	36	0	0	0
50%	40	50	56	0	6	10
90%	79	85	87	23	31	37

Figura 4.1.2 - Estimativas do modelo ajustado para viabilidade de blastosporos de *Metarhizium anisopliae* formulados em diferentes argilas. A) Armazenamento a 4°C; B) Armazenamento a 26°C

Os resultados obtidos nesse experimento demonstraram uma grande variabilidade na compatibilidade de inertes com blastosporos de *M. anisopliae* e *B. bassiana*. A Zeolita clinoptololita resultou no melhor tratamento para as duas espécies fúngicas, entretanto outra composição da mesma argila, a Zeolita 4A teve os piores resultados e no caso de *M. anisopliae* inviabilizou totalmente os blastosporos já na avaliação logo após a secagem anterior ao armazenamento.

Os resultados obtidos com os tratamentos denominados controle, em que os blastosporos foram armazenados no próprio meio líquido em que foi realizada a fermentação sugerem uma diferença significativa de comportamento entre as duas espécies fúngicas. Para *B. bassiana*, os blastosporos mantido sob-refrigeração ficaram completamente inviáveis já na primeira avaliação, diferentemente de *M.*

anisopliae em que os blastosporos no meio líquido sobreviveram mais do que alguns tratamentos que passaram pelo processo de secagem.

Sandoval-Conrado et al. (2001) observaram que blastosporos de *I. fumosorosea* formulados em diferentes inertes apresentaram resistências distintas à dessecação, com redução de até 90% da viabilidade para alguns deles após a secagem e antes do armazenamento. Diferentes concentrações de Caulim resultaram na maior estabilidade de armazenamento a 4°C com mais de 70% de viabilidade após seis semanas, entretanto após sete dias a 28°C o melhor tratamento manteve apenas 20% de viabilidade. Esses resultados foram equiparáveis aos obtidos com *M. anisopliae* nesse ensaio, entretanto ambos foram muito inferiores aos obtidos por Kleespies e Zimmerman (1994) com 43% de viabilidade de *M. anisopliae* após 12 semanas de armazenagem a 20°C e 45% de germinação após 7 dias a 35°C.

A formulação de *B. bassiana* à base de Zeolita apresentou o maior tempo de prateleira e manteve 80% de viabilidade após 47 dias a 26°C e 82 dias a 4°C. Apesar de resultados promissores para alguns tratamentos, a necessidade de refrigeração durante o armazenamento foi essencial para obtenção de tempos de prateleira aceitáveis para *B. bassiana*, já que para *M. anisopliae* mesmo em refrigeração os resultados foram muito inferiores. Nesse contexto, estes resultados indicam que ainda são necessários muitos estudos para que se consiga obter períodos de prateleira aceitáveis para produtos a base de blastosporos. A tolerância de blastosporos a dessecação está intimamente ligada às condições de fermentação, incluindo o meio de cultura e o nível de aeração para *I. fumosorosea* (JACKSON et al., 1997, JACKSON, 1999). Como no presente estudo estes fatores foram pouco explorados, é possível que o reduzido período de prateleira e a sobrevivência diferencial entre *B. bassiana* e *M. anisopliae* tenha sido influenciada pelas condições utilizadas. Desta forma, decidiu-se por investir nas próximas etapas desse estudo apenas nas formulações à base de conídios aéreos que apresentam maior resistência durante o armazenamento.

4.2 Comparação de metodologias para extração de conídios

Para *B. bassiana*, independente do método de extração a adição do óleo de girassol à formulação proporcionou maior tempo de prateleira de conídios, com diferenças significativas para conídios lavados em óleo ($P = 0,041$ Figura 4.2.1.A) peneirados ($P = 0,018$ Figura 4.2.1.B) e lavados em água ($P < 0,001$ Figura 4.2.1.C).

Figura 4.2.1 - Estimativas do modelo ajustado para as proporções de viabilidade de conídios de *Beauveria bassiana*: A) Arroz + fungo (A+F) e conídios extraídos pelo óleo (SCO); B) extração por peneira e formulação em óleo (SCP) ou conídios puros (EPP); C) extração por lavagem em água e formulação em óleo (SCA) ou conídios puros (EPA), armazenados a $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Viabilidade inicial de conídios de 98,3%.

Considerando as formulações com a presença de óleo, os três métodos de extração apresentaram a mesma tendência de redução de viabilidade não apresentando diferença significativa entre eles ($P = 0,808$), com comportamento praticamente idêntico para conídios lavados em água ou óleo, ambos com tempo necessário para redução de 50% da viabilidade inicial dos conídios (TL_{50}) de 56 dias e 60 dias para conídios peneirados (Tabela 4.2.1). Estes métodos de extração podem ser considerados para formulações em óleo vegetal como alternativa ao método padrão por peneiramento. Conídios extraídos em água (TL_{50} 47 dias) ou mantidos no arroz (TL_{50} 43 dias) apresentaram tempos de prateleira semelhantes ($P = 0,602$) e significativamente superiores aos conídios puros peneirados (TL_{50} de 28 dias) (EPA x EPP, $P = 0,006$; A+F x EPP, $P = 0,029$).

Os tempos letais 20% para conídios de *B. bassiana* submetidos aos diferentes tratamentos com presença e ausência de óleo variaram de <15 a 31 dias, demonstrando um baixo tempo de prateleira destas formulações (Tabela 4.2.1).

Tabela 4.2.1 - Tempos letais (em dias) estimados para conídios de *Beauveria bassiana* obtidos por diferentes métodos de extração e diferentes formas de armazenamento

Redução de viabilidade (%)	Formulação					
	Em óleo			Sem óleo		
	Extração de conídios			Extração de conídios		
	Óleo	Peneiramento	Água	A+F	Peneiramento	Água
20%	26	31	27	<15	<15	18
50%	56	60	56	43	28	47
90%	103	105	103	89	75	93

Arroz + fungo (A+F) e conídios extraídos pelo óleo (SCO); extração por peneira e formulação em óleo (SCP) ou conídios puros (EPP); extração por lavagem em água e formulação em óleo (SCA) ou conídios puros (EPA), armazenados a $26\pm1^{\circ}\text{C}$

Para *M. anisopliae*, a formulação em óleo de girassol proporcionou maior período de prateleira de conídios quando comparada a armazenagem sem óleo (Figura 4.2.2), com diferença significativa para conídios extraídos em óleo ($P = 0,009$) e conídios peneirados ($P < 0,001$). Entretanto, diferentemente de *B. bassiana*, para *M. anisopliae* o método de extração por lavagem em água reduziu significativamente ($P < 0,001$) a viabilidade dos conídios quando comparado aos outros métodos (Figura 4.2.2.C).

Figura 4.2.2 - Estimativas do modelo ajustado para as proporções de viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae*: A) Arroz + fungo (A+F) e conídios extraídos pelo óleo (SCO); B) extração por peneira e formulação em óleo (SCP) ou conídios puros (EPP); C) extração por lavagem em água e formulação em óleo (SCA) ou conídios puros (EPA), armazenados a $26\pm1^{\circ}\text{C}$. Viabilidade inicial de conídios de 95,2%.

Conídios extraídos e armazenados em óleo apresentaram TL_{20} de 38 dias e TL_{50} de 71 dias significativamente superiores ($P = 0,045$) aos conídios peneirados e formulados em óleo (TL_{20} de 20 dias e TL_{50} de 52 dias). Quando armazenados sem óleo, na forma de conídios puros ou junto com o arroz, todos os tratamentos

diferiram estatisticamente entre si ($P < 0,001$) com TL_{50} de 54, 36 e < 15 dias para os tratamentos arroz + fungo, conídios puros peneirados e conídios puros lavados em água, respectivamente (Tabela 4.2.2).

Tabela 4.2.2 - Tempos letais (em dias) estimados para conídios de *Metarhizium anisopliae* obtidos por diferentes métodos de extração e diferentes formas de armazenamento

Redução de viabilidade (%)	Formulação					
	Em óleo			Sem óleo		
	Extração de conídios			Extração de conídios		
	Óleo	Peneiramento	Água	A+F	Peneiramento	Água
20%	38	20	<15	22	<15	<15
50%	71	52	<15	54	36	<15
90%	>105	104	50	104	87	33

Arroz + fungo (A+F) e conídios extraídos pelo óleo (SCO); extração por peneira e formulação em óleo (SCP) ou conídios puros (EPP); extração por lavagem em água e formulação em óleo (SCA) ou conídios puros (EPA), armazenados a $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

Segundo Burges (1998) os métodos mais utilizados para a separação de conídios do substrato são: extração de conídios secos por peneiramento e extração por uma corrente de ar como, por exemplo, em dispositivo de leito fluidizado. Esses métodos por não envolverem um meio líquido carreador, assemelham-se com o que ocorre em cadáveres de insetos quando os conídios secos se soltam dos conidióforos e disseminam no ambiente. As principais limitações e preocupações em relação a estes métodos de extração são: rendimento parcial dos conídios produzidos no substrato, gasto energético alto para secagem do substrato junto com os conídios, preocupação com a contaminação no ambiente de trabalho. Apesar destas limitações considera-se a eficiência desses métodos satisfatória e poucos trabalhos foram conduzidos com o objetivo de desenvolver outros métodos de extração.

A extração dos conídios pela lavagem do arroz em água foi satisfatória para *B. bassiana*, já que os três métodos de extração testados (água, óleo e peneiramento) resultaram em viabilidade semelhante de conídios quando armazenados em óleo. Da mesma forma, os conídios puros lavados em água não formulados apresentaram tempo de prateleira superior aos conídios peneirados não formulados.

Burgues (1998) discute que a lavagem de conídios do substrato com água apresenta desvantagens tais como: A) a água pode retirar substâncias importantes presentes nos conídios, B) a quantidade de água para ser retirada pelo processo de

secagem pode ser maior e o método e temperatura de secagem são críticos para evitar o estímulo para a germinação dos conídios e C) os esporos secos tendem a se agrupar demandando posterior moagem. Para *M. anisopliae* a desvantagem desse método foi evidenciada com redução extremamente rápida na viabilidade, mais isto não pode ser explicado pela germinação de conídios durante a extração e secagem, já que nas avaliações de viabilidade praticamente todos os conídios não apresentavam emissão de tubo germinativo.

Para *M. anisopliae*, a manutenção de conídios no arroz resultou em tempo de prateleira superior aos conídios peneirados, o que não era esperado devido a maior umidade no arroz+fungo considerando a dificuldade de se retirar a maior porcentagem da umidade do arroz em relação a secagem dos conídios puros peneirados. Uma possível explicação é a teoria proposta por Shanley et al. (2009), que estudando bandas de auto-inoculação contendo *M. anisopliae* observaram altos níveis de viabilidade por até 112 dias em condições de campo, e propõem que a manutenção dos conídios ligados aos conidióforos exerce ação positiva no incremento da longevidade. Os autores justificam a hipótese citando trabalhos que comprovaram a manutenção da viabilidade de conídios em cadáveres esporulados por longos períodos (SPRENKEL; BROOKS, 1977; DAOUST; PEREIRA, 1986; THOMAS; GBONGBOUI; LOMER, 1996; SAWYER et al., 1997) e correlacionam a persistência prolongada dos fungos com a manutenção da ligação entre conídios e conidióforo.

A extração de conídios do substrato seco utilizando óleo mostrou-se a forma mais eficiente para a manutenção do tempo de prateleira dos conídios para as duas espécies fúngicas. Além do efeito na longevidade, esse método deve ser melhor avaliado, pois pode apresentar melhor rendimento da extração (devido a hidrofobicidade os conídios se misturam facilmente ao óleo e evitando a perda de esporos no ar) e se tornar mais atrativo economicamente pois evita-se a segunda etapa de secagem apenas de conídios. É necessário ainda avaliar a melhor relação entre a quantidade de óleo e de arroz para obter ao final uma concentração de conídios próxima ao valor utilizado nas formulações comerciais sem a necessidade de concentrar o produto. Magalhães e Frazão (1996) avaliaram a extração de conídios de *M. flavoviridae* em querosene e posterior formulação em óleo, entretanto os autores não avaliaram o tempo de prateleira dessa formulação nesse trabalho, entretanto o período de prateleira a temperatura ambiente deve ter sido curto, pois

nesse programa recomendava-se a refrigeração da formulação durante o transporte a armazenagem (SCHMIDT et al., 2007).

4.3 Atividade de água e escolha do óleo vegetal

As estimativas dos parâmetros para os seis tipos de secagem para *B. bassiana* são apresentadas na Figura 4.3.1, os coeficientes dos parâmetros relacionados à covariáveis óleo, temperatura e interação entre óleo e temperatura e as estimativas dos parâmetros para o preditor linear e dispersão são apresentadas no Anexo C.1.

Figura 4.3.1 - Estimativas dos parâmetros da covariável secagem do preditor linear do modelo escolhido para *Beauveria bassiana*. Relação entre o nível de secagem e a atividade de água: Sec0 (0,870); Sec1 (0,778); Sec2 (0,619); Sec3 (0,480); Sec4 (0,295); Sec5 (0,134)

Devido à similaridade dos parâmetros foram formados os seguintes agrupamentos:

- **Grupo 1:** Secagem 3 (0,480), 4 (0,295) e 5 (0,134).
- **Tratamentos não agrupados:** Secagem 0 (0,870), 1 (0,778) e 2 (0,619)

Conídios puros de *B. bassiana* apresentaram comportamentos distintos em função da temperatura de armazenamento (Figura 4.3.2). A 26°C, esse tratamento foi geralmente inferior as combinações de conídios com óleos vegetais, entretanto quando armazenados a 30°C o tempo de prateleira obtido com os conídios puros foi sempre superior em comparação as formulações oleosas. Além disso, o tempo de prateleira dos conídios armazenados na maior temperatura (30°C) foi superior ao

dos armazenados na menor temperatura (26°C) independente da atividade de água inicial dos conídios.

Figura 4.3.2 - Redução da viabilidade de *Beauveria bassiana* em função do tempo de secagem (diferentes níveis de atividade de água) e armazenamento em óleo ou sem óleo (conídios puros). A) Armazenagem a 26°C; B) Armazenagem a 30°C; Tratamentos agrupados: G1: níveis de secagem 3 (atividade de água (aa) =0,480), 4 (0,295aa) e 5 (0,134aa) e tratamentos não agrupados: níveis de secagem 0 (0,870aa), 1 (0,778aa) e 2 (0,619aa). G= óleo de Girassol; S= óleo de Soja e T= conídios puros. Viabilidade inicial de conídios de 96,3%.

Os melhores tratamentos a 26°C foram as combinações dos dois óleos vegetais aos conídios do grupo 1, representados por conídios mais secos (3 aa: 0,480; 4 aa: 0,295 e 5 aa: 0,134). Nessa combinação o óleo de soja foi ligeiramente superior ao óleo de girassol ($P=0,031$) com TL_{50} de 80 e 78 dias para soja e girassol, respectivamente. Entretanto, os dois óleos apresentaram comportamento semelhante quando combinados a conídios do segundo nível de secagem (aa: 0,619) ($P = 0,156$).

Todos os níveis de secagem diferiram quando armazenados na forma de conídios puros ($P < 0,001$), apresentando TL_{50} de 50, 38, <15 e 27 dias para secagens G1, 2 (aa 0,619), 1 (aa 0,778) e 0 (aa 0,870), respectivamente. Com exceção do nível de secagem 0 (aa 0,870) que foi superior ao nível 1 (aa 0,778), os conídios mais secos sobreviveram por mais tempo.

De forma distinta ao que ocorreu a 26°C, no armazenamento a 30°C os conídios puros apresentaram tempo de prateleira superior as combinações com os óleos vegetais para todos os níveis de secagem ($P < 0,001$), e com exceção da secagem 1 (aa 0,778), os outros níveis não diferiram entre si ($P = 0,73$ e $P = 0,271$). Os TL_{50} foram de 92, 80, 55 e 68 dias para G1, nível 2 (aa 0,619), nível 1 (aa 0,778) e nível 0 (aa 0,870) de secagem, respectivamente (Figura 4.3.2). Conídios com o mesmo nível de secagem apresentaram comportamento semelhante independente do tipo de óleo utilizado para o armazenamento, sem diferenciação entre soja e girassol. A melhor combinação foi com conídios do grupo 1 seguida pelos níveis de secagem 2 (aa 0,619), 0 (aa 0,870) e 1 (aa 0,778) com TL_{50} de no máximo 63 dias (Tabela 4.3.1)

Tabela 4.3.1 - Tempos letais (em dias) estimados para conídios de *Beauveria bassiana* com diferentes níveis de atividade de água e armazenamento em óleo ou sem óleo (conídios puros) a 26° C e 30° C

Atividade de Água	Armazenagem	Tempo Letal (dias)					
		% de redução da viabilidade					
		26°C			30°C		
		20%	50%	90%	20%	50%	90%
0,870	Girassol	17	54	113	<15	40	99
	Soja	20	57	114	<15	39	99
	Conídios puros	<15	27	85	32	68	127
0,778	Girassol	<15	41	99	<15	27	85
	Soja	<15	43	101	<15	27	85
	Conídios puros	<15	<15	72	19	55	114
0,619	Girassol	29	66	124	<15	52	110
	Soja	31	68	126	<15	51	110
	Conídios puros	<15	38	97	43	80	>135
G1(0,480	Girassol	40	78	134	27	63	121
0,295	Soja	43	80	>135	27	63	121
0,134)	Conídios puros	<15	50	109	55	92	>135

G1: Níveis de secagem 3 (atividade de água (aa) =0,480), 4 (0,295aa) e 5 (0,134aa) e tratamentos não agrupados: níveis de secagem 0 (0,870aa), 1 (0,778aa) e 2 (0,619aa)

As estimativas dos parâmetros para os cinco níveis de secagem de *M. anisopliae* são apresentadas na Figura 4.3.3 e no **Anexo C. 2** os coeficientes dos parâmetros relacionados às covariáveis óleo e temperatura, bem como as estimativas dos parâmetros para o preditor linear e para o parâmetro de dispersão.

Figura 4.3.3 - Estimativas dos parâmetros da covariável secagem do preditor linear do modelo escolhido para *Metarhizium anisopliae*. Relação entre o nível de secagem e a atividade de água: Sec0 (aa=0,954); Sec1 (0,785aa); Sec2 (0,636aa), Sec3 (0,498); e Sec4(0,272aa)

Devido à similaridade dos parâmetros foram formados os seguintes agrupamentos:

- **Grupo 1:** Secagem 0 (0,954) e 1 (0,785).
- **Grupo 2:** Secagem 2 (0,636) e 3 (0,498).
- **Tratamentos não agrupados:** Secagem 4 (0,272).

Para as formulações contendo *M. anisopliae* o efeito da presença ou ausência de óleo vegetal nas formulações não foi significativo ($P = 0,106$) e dessa forma a covariável óleo foi retirada do modelo, isso significa que independente da temperatura de armazenamento as combinações com os óleos não diferiram dos controles sem óleo (conídios puros). Os conídios mais secos oriundos do nível de secagem quatro (aa 0,272) apresentaram os maiores tempos de prateleira com TL_{50} de 74 dias a 26°C e 62 dias a 30°C (Figura 4.3.4). Esse tratamento foi 13,5% superior ao grupo 2 (níveis de secagem 2 e 3) ($P < 0,001$) quando armazenados a 26°C, entretanto no armazenamento a 30°C não foi constatada diferença significativa entre os tratamentos ($P = 0,056$).

Figura 4.3.4 - Redução estimada da viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae* com diferentes níveis de atividade de água (aa) armazenados em óleo de girassol ou soja e conídios puros. A) Armazenagem a 26° C; B) Armazenagem a 30° C; Tratamentos agrupados: G1: níveis de secagem 0 (aa=0,954) e 1 (0,785aa); G2: Níveis de secagem 2 (0,636aa) e 3 (0,498); e tratamento não agrupado: Sec4 (0,272aa). Viabilidade inicial de conídios de 95,8%.

Independente da temperatura de armazenamento os níveis de secagem 0 (aa 0,954) e 1 (0,785) (G1), constituídos pelos conídios com maior atividade de água, resultaram nos menores tempos de prateleira ($P < 0,001$), com TL_{50} de 38 e 26 dias, a 26 e 30°C, respectivamente, valores 49% e 58% inferiores aos obtidos com o nível 4 de secagem (aa 0,272). (Tabela 4.3.2).

Tabela 4.3.2 - Tempos letais (em dias) estimados para conídios de *Metarhizium anisopliae* com diferentes níveis de atividade de água armazenados a 26°C e 30°C para conídios armazenados em óleo de girassol ou soja e conídios puros

Redução de viabilidade (%)	Tempo (dias)					
	26°C			30°C		
	G1	G2	Sec4	G1	G2	Sec4
	0,954 e 0,785*	0,636 e 0,498*	0,272*	0,954 e 0,785*	0,636 e 0,498*	0,272*
20%	<15	33	44	<15	21	31
50%	38	64	74	26	52	62
90%	88	114	125	76	102	112

G1: níveis de secagem 0 e 1; G2: Níveis de secagem 2 e 3; Sec4: nível de secagem 4. * Atividade de água correspondente a cada nível de secagem

A secagem de conídios de *B. bassiana* e *M. anisopliae* foi um fator crítico para o aumento da vida de prateleira, independente da formulação em óleo ou manutenção dos conídios puros; quanto menor a atividade de água maior foi à longevidade dos conídios.

O agrupamento dos tratamentos com as amostras mais secas poderia sugerir que se chegou a um limite ótimo de secagem, em que abaixo desse valor não se observa ganhos na sobrevivência de conídios.

Hong, Ellis e Moore (1997) demonstraram uma relação logarítmica negativa entre teor de umidade de conídios de *M. acridum* e sua habilidade de sobreviver sob stress térmico (50°C), sendo o limite inferior da relação de 4,6% e o limite superior ficou entre 21,2 e 31,8% de umidade. Dentro desse intervalo, a diminuição da umidade aumentou a sobrevivência de conídios, entretanto abaixo do limite inferior, a secagem adicional não causou incremento da sobrevivência. Os períodos de prateleira obtidos nesse primeiro ensaio com todas as formulações foram baixos indicando que as menores atividades de água dos conídios obtidas ainda não foram adequadas. Isto foi comprovado em ensaios posteriores desse trabalho com atividades de água inferiores as obtidas nessa primeira etapa e que resultaram em

tempos de prateleira muito superiores para os dois fungos. Ademais, a utilização de apenas 40 g de sílica gel para a secagem dos conídios fez com que o tempo de secagem para obtenção de diferentes atividades de água fosse muito prolongado (4 a 5 dias) o que pode ter causado alguma debilidade nos conídios mais secos.

Diversos trabalhos comprovam a importância da secagem de conídios, e propõem-se que umidades relativas inferiores a 5% são ideais para uma maior estabilidade e longevidade de conídios e que o fator limitante para a obtenção de tempos de prateleira longos passa pela capacidade da formulação em manter os conídios ultra-secos (BURGES, 1998).

Utilizando-se as isotermas de sorção para *M. anisopliae* e *B. bassiana* apresentadas por Faria, Hajek e Wraight (2009) em que a atividade de água foi relacionada ao teor de umidade é possível estimar que os conídios de *M. anisopliae* utilizados apresentavam conteúdos de umidade de 36% (aa 0,954), 24,5% (aa 0,785), 15% (aa 0,636), 10,8% (aa 0,498) e 7,4% (aa 0,272) e os de *B. bassiana* de 30% (aa 0,870), 22,5% (aa 0,778), 15% (aa 0,619), 11% (aa 0,480), 7,8% (aa 0,295) e 4,9% (0,134). Esses valores são estimados já que as isotermas foram construídas com outros isolados fúngicos, entretanto essas estimativas são importantes para possibilitar a comparação dos dados com a maioria dos trabalhos já realizados, principalmente os mais antigos que apenas mensuravam a secagem de conídios mediante o teor de umidade. Os valores de umidade testados neste estudo estão acima da faixa utilizada por outros autores que demonstraram períodos mais longos de prateleira (inferiores a 5% de umidade).

Alguns trabalhos citam também que umidades próximas a 100% são adequadas para o armazenamento de conídios (BURGES, 1998; DAOUST; ROBERTS, 1983; JIN et al., 1999; SANDHU; RAJAK; AGARWAL, 1993). Nesse trabalho os tratamentos contendo conídios com as maiores atividades de água sempre resultaram em tempo de prateleira inferior as formulações com conídios mais secos, porém como todas as amostras haviam passado pelo processo de pré-secagem do arroz + fungo para permitir a extração de conídios, mesmo às amostras mais úmidas apresentaram umidades muito inferiores a 100% (*M. anisopliae* = 36% e *B. bassiana* = 30%), o que pode explicar o menor tempo de prateleira dessas amostras.

Formulações oleosas de *B. bassiana* quando armazenadas a 26°C foram superiores aos conídios puros e o inverso foi observado a 30°C. O comportamento

dos tratamentos a 26°C corroboram com os dados de Kim et al. (2011) com *Isaria fumosorosea* armazenada a 25°C em que formulações oleosas apresentaram 98,4% de viabilidade de conídios liofilizados após 9 meses enquanto conídios puros após 3 meses de armazenamento apresentaram apenas 34% de viabilidade. Os fatores responsáveis pelo comportamento diferencial de *B. bassiana* a 30°C em relação a 26°C, não são conhecidos. Esses tratamentos foram inclusive superiores aos armazenados a 26°C o que é contraditório considerando que o tempo de prateleira de biopesticidas geralmente diminui com o aumento da temperatura (BURGES, 1998), o que foi observado para *M. anisopliae*.

Os óleos de soja e girassol apresentaram comportamentos muito semelhantes, e em função de uma pequena diferença numérica na longevidade a 30°C optou-se por selecionar o óleo de girassol para as próximas etapas do trabalho. Diferenças de compatibilidade entre óleos vegetais são abordadas na literatura. KIM et al. (2011) selecionou o óleo de milho para formulações de *I. fumosorosea*, pois esse apresentou tempo de prateleira muito superior ao óleo de soja. O autor justifica essas diferenças baseado na proporção entre gorduras insaturadas/gorduras saturadas que no óleo de milho é de 6,7 e de 5,7 no óleo de soja, o que permitiria uma maior compatibilidade do óleo de milho. Entretanto, os óleos de girassol e soja avaliados no presente estudo apresentam proporções entre gorduras insaturadas/saturadas maiores do que as observadas por Kim et al. (2011), mas estes resultaram em tempos de prateleira de conídios semelhantes. O óleo de soja utilizado continha 16,7% de gorduras saturadas e 83,3% de insaturadas (24,1% monoinsaturadas e 59,1% poli-insaturadas) enquanto o óleo de girassol 11,7% de gorduras saturadas e 88,3% de gorduras insaturadas (25% monoinsaturadas e 63,3% poli-insaturadas).

Todas as análises de viabilidade realizadas nesse trabalho foram quantificadas após 24 horas de incubação diferentemente de muitos outros estudos sobre o assunto que utilizaram períodos muito superiores. Burges (1998) alertou sobre o risco da contagem de viabilidade após 24 horas de incubação em função da existência de uma proporção substancial de conídios com germinação mais lenta após longos períodos de armazenamento. De fato, Alves et al. (1996) avaliando a sobrevivência de conídios de *B. bassiana* após 7 anos de armazenagem obtiveram 0% de viabilidade após 24 horas de incubação e 100% de viabilidade após 72 horas. Moore et al. (1995) avaliando tempo de prateleira de formulação oleosa de *M. acridum* após 37 meses de armazenamento quantificaram 47% de viabilidade após

24 horas de incubação e 79% após 48 horas. Mesmo com esses resultados optou-se por manter padronizado o tempo de incubação de 24 horas, pois esse período é suficiente para germinação dos conídios não debilitados, situação indispensável para a eficiência de controle de formulações, pois a manutenção do vigor de conídios é essencial para a eficácia de formulação de micopesticidas (FARIA et al., 2010).

Mediante os resultados obtidos nesse experimento, ficou evidente que a secagem dos conídios foi fundamental para maior sobrevivência, dessa forma, nos experimentos posteriores a técnica de secagem foi ajustada, e para as formulações desenvolvidas nos estudos seguintes, selecionou-se o óleo de girassol.

4.4 Compatibilidade de emulsionantes puros diretamente misturados aos conídios

Para *B. bassiana* (aa 0,187), os tratamentos E6 (Ultrasist 1180) e E10 (Ultradet LE600) causaram mortalidade total dos conídios já na primeira avaliação e como não houve variância na taxa de viabilidade, não foi possível incluir esses tratamentos na análise estatística.

As estimativas dos parâmetros para os dezoito tratamentos e para o controle são apresentados na Figura 4.4.1.

Figura 4.4.1 - Estimativas dos parâmetros do preditor linear para cada tratamento da compatibilidade de *Beauveria bassiana* com emulsionantes puros diretamente misturados aos conídios

Devido à similaridade dos parâmetros foram formados os seguintes agrupamentos:

- Grupo 1: Tratamentos 12, 15 e 20.

- Grupo 2: Tratamentos 1 e 13.
- Grupo 3: Tratamentos 2, 14, 18 e Controle (T).
- Grupo 4: Tratamentos 3, 16, 17 e 19.
- Grupo 5: Tratamentos 4 e 11.
- Tratamentos não agrupados: Tratamentos 5, 7, 8 e 9.

Os emulsionantes E5 (KBRAdj) e E7 (Tween 80) apresentaram redução mais lenta na viabilidade de conídios de *B. bassiana* e por isso podem ser considerados mais compatíveis (Figura 4.4.2) e não diferiram significativamente entre si ($P = 0,074$), apresentando TL_{50} de 97 e 63 dias, respectivamente (Tabela 4.4.1). A viabilidade dos conídios armazenados em emulsionante E5 após 75 dias era de 75% e reduzindo para 36% aos 125 dias. O emulsionante E8 (Silwet L77) diferiu significativamente do E5 ($P < 0,01$), mas não apresentou diferença estatística para o E7 ($P = 0,291$) e apresentou TL_{50} de 41 dias. O grupo 5, formado pelos emulsionantes E11 (Ultramona R150) e E4 (Ultrol L20) apresentou TL_{50} de 31 dias e foi significativamente inferior ao emulsionante E7 ($P < 0,001$). Os demais grupos/tratamentos apresentaram rápida mortalidade de conídios com TL_{50} inferiores a 20 dias.

Figura 4.4.2 - Estimativas do modelo ajustado para as proporções de viabilidade de conídios de *Beauveria bassiana* (aa 0,187) para os tratamentos agrupados G1: E12, E15 e E20; G2: E1 e E13; G3: E2, E14, E18 e controle; G4: E3, E16, E17 e E19; G5: E4 e E11; e tratamentos não agrupados: E5, E7, E8 e E9. Viabilidade inicial de conídios de 94,1%.

Tabela 4.4.1 - Tempos letais (em dias) estimados para viabilidade de conídios de *Beauveria bassiana* submetidos aos diferentes tratamentos (emulsionantes)

Redução de viabilidade (%)	Grupos/Tratamentos								
	G 1	G 2	G 3	G 4	G 5	T 5	T 7	T 8	T 9
20%	<15	<15	<15	<15	<15	60	33	<15	<15
50%	<15	<15	<15	<15	31	97	63	41	20
90%	43	52	60	68	81	>125	117	91	72

Tratamentos agrupados G1: E12, E15 e E20; G2: E1 e E13; G3: E2, E14, E18 e controle; G4: E3, E16, E17 e E19; G5: E4 e E11; e tratamentos não agrupados: E5, E7, E8 e E9

Na primeira avaliação verificou-se que para *M. anisopliae* (aa 0,205) os tratamentos E2, E3, E6, E7, E10, E12, E15 e E20 apresentaram mortalidade total dos conídios já na primeira avaliação e desta forma não foram incluídos na análise estatística (variância = 0).

Para verificar quais tratamentos foram semelhantes, foi realizada a análise de agrupamento. As estimativas dos parâmetros para os 12 tratamentos e para o controle são apresentadas na Figura 4.4.3.

Figura 4.4.3 - Estimativas dos parâmetros do preditor linear para cada tratamento da compatibilidade de *Metarhizium anisopliae* com emulsionantes puros diretamente misturados aos conídios

Devido à similaridade dos parâmetros foram formados os seguintes agrupamentos:

- Grupo 1: Tratamentos 1, 4, 16 e 18.

- Grupo 2: Tratamentos 9, 14 e 19.
- Tratamentos não agrupados: Tratamentos 5, 8, 11, 13, 17 e controle (T).

O tratamento composto pelo emulsionante E5 (KBRAdj) resultou em redução da viabilidade mais lenta de conídios de *M. anisopliae* diferindo estatisticamente de todos os outros tratamentos ou grupos ($P < 0,001$) e apresentou TL_{20} de 34 dias enquanto todos os outros apresentaram TL_{20} inferior a 15 dias. (Fig.4.4.4). Os tratamentos com o emulsionante E8 (Silwet L77) e controle apresentaram comportamento semelhante ($P = 0,97$) resultando em maior longevidade de conídios comparados aos outros tratamentos ($P < 0,001$) com tempos letais 50% de 36 e 40 dias, respectivamente.

Figura 4.4.4 - Estimativas do modelo ajustado para as proporções de viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae* (aa 0,205) para os tratamentos agrupados: G1: E1, E4, E16, E18; G2: E9, E14, E19 e não agrupados T5, T8, T11, T13, 17 e controle. Viabilidade inicial de conídios de 88,6%.

Tabela 4.4.2 - Tempos letais (em dias) estimados para viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae* submetidos aos diferentes tratamentos (emulsionantes)

Redução de viabilidade (%)	Grupos/Tratamentos							
	G 1	E 5	E 8	E 11	E 13	E 17	Controle	G 2
20%	<15	34	<15	<15	<15	<15	<15	<15
50%	<15	64	36	<15	<15	<15	40	<15
90%	40	115	80	63	16	59	86	25

Tratamentos agrupados: G1: E1, E4, E16, E18; G2: E9, E14, E19 e não agrupados T5, T8, T11, T13, 17 e controle

Para utilização de dispersões oleosas em volume normal de aplicação, é necessária a ação de agentes emulsionantes para quebrar a tensão superficial entre os líquidos imiscíveis (água e óleo) e permitir a formação de uma suspensão homogênea em que a emulsão perdure por tempo suficiente até o final da aplicação. Apenas dessa forma se pode garantir a aplicação da mesma concentração da formulação por todo o volume da calda de aplicação. Vantagens adicionais da formulação oleosa serão discutidas nos experimentos posteriores em que se avaliou a virulência e a capacidade das formulações de proteger os conídios da radiação ultravioleta.

Poucos trabalhos foram publicados sobre a compatibilidade de adjuvantes para serem utilizados em formulações oleosas com a função de emulsionantes. No passado, uma das estratégias mais utilizadas com formulações oleosas foi a aplicação com ultra-baixo volume ou baixo volume (BURGES, 1998). Nessas estratégias de aplicação indicadas para regiões de clima seco, o produto não é diluído em água, dispensando a adição de um agente emulsionante. Certamente muitos estudos sobre compatibilidade não são publicados por interesses comerciais. Desta forma, a comparação dos resultados obtidos neste experimento com dados da literatura fica bastante limitada.

O efeito da aplicação conjunta de surfactantes com suspensões fúngicas foi estudado em trabalhos recentes para avaliação do aumento da eficiência de controle, melhoria na dispersão e aderência de conídios e proteção contra fatores adversos (MASCARIN et al., 2014; AKBAR et al., 2005; SANTOS et al., 2012). Entretanto, a compatibilidade revelada na maioria desses trabalhos não leva em consideração o armazenamento dos conídios em combinação com os surfactantes por um longo período de tempo, como feito no presente estudo.

Dos 20 surfactantes não iônicos testados 3 se destacaram pela compatibilidade para *B. bassiana*, sendo eles o E5, E7 e E8. Não se sabe a composição do E5 e esse composto está em fase de registro junto ao ministério da agricultura, o E7 (Tween 80) é um monooleato de sorbitano etoxilado e esse composto é normalmente utilizado como espalhante adesivo em laboratórios de microbiologia e o E8 (Silwet L77) um surfactante organosiliconado amplamente utilizado na agricultura. Os surfactantes E11 (Óleo de mamona etoxilado) e E4 (Álcool laurílico etoxilado) (G5), apesar de menos compatíveis que os três citados anteriormente foram superiores aos demais compostos testados. Com exceção do E7 (HLB = 15) e

E5 (sem informações de HLB) os demais apresentam balanço hidrofílico-lipofílico próximo e dentro do intervalo de 6,4 a 8,3. Para *M. anisopliae* o destaque foi para E5 que apresentou compatibilidade muito superior aos demais, seguido pelo E8.

A abordagem utilizada no presente estudo pela adição dos surfactantes puros aos conídios representa o pior cenário possível usado em testes de toxicidade por não utilizar a concentração em que os adjuvantes entrarão na composição de uma formulação oleosa. Embora esta combinação direta possa ser bastante prejudicial ao vigor dos conídios, esta é a forma mais rápida para selecionar os surfactantes mais compatíveis com os fungos. Entretanto, outro experimento descrito a seguir foi realizado onde os 20 compostos foram diluídos em óleo e combinados aos conídios.

4.5 Estabilidade de formulações oleosas contendo emulsionantes

Na análise preliminar verificou-se que para *B. bassiana* os tratamentos E2, E3, E6, E9, E12 e E15 não apresentaram variação na taxa de viabilidade (0% já na primeira avaliação), resultando na retirada desses tratamentos da análise estatística. As estimativas dos parâmetros para os 14 tratamentos e para o controle são apresentados na Figura 4.5.1.

Figura 4.5.1 - Estimativas dos parâmetros do preditor linear da sobrevivência de conídios de *Beauveria bassiana* formulados em óleo com diferentes surfactantes

Devido à similaridade dos parâmetros foram formados os seguintes agrupamentos:

- **Grupo 1:** Tratamentos 13 e 18.

- **Grupo 2:** Tratamentos 14 e 17.
- **Grupo 3:** Tratamentos 19 e 20.
- **Grupo 4:** Tratamentos 8 e 11.
- **Grupo 5:** Tratamentos 1 e 5.
- **Grupo 6:** Tratamentos 7 e Controle (T).
- **Tratamentos não agrupados:** Tratamentos 4, 10 e 16.

As estimativas dos parâmetros do preditor linear, do parâmetro de dispersão e o ajuste do modelo são apresentados no Anexo E.

A secagem não interferiu na longevidade dos conídios de *B. bassiana*, independente do tratamento, mas apesar da estimativa desse parâmetro ter recebido valor muito baixo, a variável foi significativa e permaneceu no modelo, esse fator justifica a proximidade das curvas para as secagens demonstradas na Figura 4.5.2.

O grupo 6 (E7 = Tween 80 e controle) se destacou como o que menos afetou a viabilidade de conídios diferindo do grupo 5 (E1= CSO 40B e E5= KBRAdj) ($P < 0,001$). A TL_{50} observado para o grupo 6 foi de 47 dias a 26°C e 34 dias para 30°C para o período de secagem 1 (aa 0,292) e de 46 e 31 dias a 26 e 30°C, respectivamente, para o período de secagem 2 (aa 0,187) (Figura 4.5.2).

O TL_{50} observado para o grupo 5 foi de 37 dias a 26°C e 21 dias para 30°C para o período de secagem 1 e de 34 e 19 dias a 26 e 30°C, respectivamente, para o período de secagem 2 (aa 0,187). O grupo 4 composto pelos emulsionantes E8 e E11 foi inferior ao G5 e G6 ($P < 0,001$), entretanto esse grupo se destacou dos demais quanto a longevidade dos conídios (Tabelas 4.5.1 e 4.5.2). Os outros tratamentos/grupos apresentaram TL_{50} inferior a 15 dias independente da temperatura de armazenamento e período de secagem dos conídios de *B. bassiana*.

Figura 4.5.2 - Estimativas do modelo ajustado para as proporções de viabilidade de conídios de *Beauveria bassiana* para os tratamentos das formulações oleosas com diferentes emulsionantes agrupados e não agrupados: A) Secagem 1 (aa 0,292) e temperatura 26°C; B) Secagem 2 (aa 0,187) e temperatura 26°C; C) Secagem 1 (aa 0,292) e temperatura 30°C e D) Secagem 2 (aa 0,187) e temperatura 30°C. Tratamentos agrupados: G1: E13, E18; G2: E14, E17; G3: E19, E20; G4: E8, E11; G5: E1, E5; G6: E7, controle, e tratamentos não agrupados: E4, E10 e E16. Viabilidade inicial secagem 1 de 95,3% e secagem 2 de 94,1%.

Tabela 4.5.1 - Tempos letais (em dias) estimados para conídios de *Beauveria bassiana* submetidos aos diferentes tratamentos (grupos) das formulações oleosas com diferentes emulsionantes em diferentes temperaturas considerando a secagem do tipo 1 (aa = 0,292)

Redução de viabilidade (%)	Temp.	Grupos/Tratamentos								
		G 1	G 2	G 3	G 4	G 5	G 6	T 10	T 16	T 4
20%	26°C	<15	<15	<15	<15	20	25	<15	<15	<15
50%		<15	<15	<15	27	37	47	<15	<15	<15
90%		<15	18	53	64	68	84	<15	<15	26
20%	30°C	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15
50%		<15	<15	<15	<15	21	34	<15	<15	<15
90%		<15	<15	30	54	61	66	<15	<15	<15

Tratamentos agrupados: G1: E13, E18; G2: E14, E17; G3: E19, E20; G4: E8, E11; G5: E1, E5; G6: E7, controle, e tratamentos não agrupados: E4, E10 e E16

Tabela 4.5.2 - Tempos letais (em dias) estimados para conídios de *Beauveria bassiana* submetidos aos diferentes tratamentos (grupos) das formulações oleosas com diferentes emulsionantes em diferentes temperaturas considerando a secagem do tipo 2 (aa = 0,187)

Redução de viabilidade (%)	Temp.	Grupos/Tratamentos								
		G 1	G 2	G 3	G 4	G 5	G 6	T 10	T 16	T 4
20%	26°C	<15	<15	<15	<15	<15	23	<15	<15	<15
50%		<15	<15	<15	25	34	46	<15	<15	<15
90%		<15	16	51	63	67	82	<15	<15	26
20%	30°C	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15
50%		<15	<15	<15	<15	19	31	<15	<15	<15
90%		<15	<15	29	52	60	66	<15	<15	<15

Tratamentos agrupados: G1: E13, E18; G2: E14, E17; G3: E19, E20; G4: E8, E11; G5: E1, E5; G6: E7, controle, e tratamentos não agrupados: E4, E10 e E16

Para *M. anisopliae* a análise preliminar demonstrou que os tratamentos E2, E6, E9, E10 e E14 não apresentaram variação na taxa de viabilidade (0%), sendo necessária à retirada dos mesmos da análise estatística. As estimativas dos parâmetros para os quinze tratamentos e para o controle são apresentados na Figura 4.5.3.

Figura 4.5.3 - Estimativas dos parâmetros do preditor linear da sobrevivência de conídios de *Metarhizium anisopliae* formulados em óleo com diferentes surfactantes

Devido à similaridade dos parâmetros foram formados os seguintes agrupamentos:

- **Grupo 1:** Tratamentos 16 e 12.
- **Grupo 2:** Tratamentos 4, 13 e 20.
- **Grupo 3:** Tratamentos 17 e 19.
- **Grupo 4:** Tratamentos 8 e 11.
- **Tratamentos não agrupados:** Tratamentos 1,3, 5, 7, 15, 18 e controle.

As estimativas dos parâmetros do preditor linear, do parâmetro de dispersão e o ajuste do modelo são apresentados no Anexo E.

Ao contrário do observado para *B. bassiana*, os diferentes períodos de secagens de *M. anisopliae* tiveram maior influência na longevidade dos conídios, e as amostras formuladas com conídios oriundo da secagem 1 (aa 0,281) apresentaram maior longevidade em comparação a secagem 2 (0,205) (Figura 4.5.4) Essa observação é comprovada pelas estimativas dos parâmetros de preditor linear para “Secagem (2)” que foi de -0,57 para *M. anisopliae* e de -0,13 para *B. bassiana*.

Figura 4.5.4 - Estimativas do modelo ajustado para as proporções de viabilidade de *Metarhizium anisopliae* para os tratamentos agrupados e não agrupados das formulações oleosas com diferentes surfactantes com: (a) Secagem 1 (aa 0,281) e temperatura 26°C, (b) Secagem 2 (aa 0,205) e temperatura 26°C, (c) Secagem 1 (aa 0,281) e temperatura 30°C e (d) Secagem 2 (aa 0,205) e temperatura 30°C. Tratamentos agrupados: G1: E16, E12; G2: E4, E13, E20; G3: E17, E19; G4: E8, E11. Tratamentos não agrupados: E1, E3, E5, E7, E15, E18 e controle. Viabilidade inicial secagem 1 de 85,8% e secagem 2 de 88,6%.

O tratamento controle, composto apenas por óleo, foi o que menos impactou a longevidade de conídios ($P < 0,001$) (Figura 4.5.4), e foi o único tratamento que apresentou TL_{50} superior a 15 dias quando armazenados a 30°C (Tabela 4.5.3) e apenas na secagem 1 (aa 0,281). Na secagem 2 (aa 0,205) todos os tratamentos apresentaram TL_{50} inferior a 15 dias nessa temperatura.

A maior compatibilidade foi alcançada com os emulsionantes E5 (KBRAdj), E7 (Tween 80) e G4 (E8= Silwet L77 e E11= Ultramona R150) que na secagem 1 apresentaram TL_{50} de 26, 29, e 21 dias, respectivamente a 26°C, nessas mesmas condições o controle apresentou 40 dias (Tabelas 4.5.3 e 4.5.4).

Tabela 4.5.3 - Tempos letais (em dias) estimados para conídios de *Metarhizium anisopliae* das formulações oleosas com diferentes emulsionantes (grupos) a 26°C e 30°C considerando a secagem do tipo 1 (aa 0,281)

Redução de viabilidade (%)	Temp.	Grupos e Tratamentos										Controle
		G 1	G 2	G 3	G 4	T 1	T 3	T 5	T 7	T 15	T 18	
20%	26°C	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15
50%		<15	<15	<15	21	<15	<15	26	29	<15	<15	40
90%		45	54	56	64	58	<15	67	72	<15	27	83
20%	30°C	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15
50%		<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15	21
90%		23	29	33	51	37	<15	56	59	<15	<15	64

Tratamentos agrupados: G1: E16, E12; G2: E4, E13, E20; G3: E17, E19; G4: E8, E11. Tratamentos não agrupados: E1, E3, E5, E7, E15, E18 e controle

Tabela 4.5.4 - Tempos letais (em dias) estimados para conídios de *Metarhizium anisopliae* das formulações oleosas com diferentes emulsionantes (grupos) a 26°C e 30°C considerando a secagem do tipo 2 (aa 0,205)

Redução de viabilidade (%)	Temp.	Grupos e Tratamentos										Controle
		G 1	G 2	G 3	G 4	T 1	T 3	T 5	T 7	T 15	T 18	
20%	26°C	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15
50%		<15	<15	<15	<15	<15	<15	15	19	<15	<15	28
90%		28	40	44	57	48	<15	61	64	<15	16	68
20%	30°C	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15
50%		<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15
90%		<15	19	23	36	25	<15	44	50	<15	<15	58

Tratamentos agrupados: G1: E16, E12; G2: E4, E13, E20; G3: E17, E19; G4: E8, E11. Tratamentos não agrupados: E1, E3, E5, E7, E15, E18 e controle

4.6 Efeito da adição de dessecantes no tempo de prateleira de conídios formulados em óleo vegetal:

Ensaio 1:

Todas as concentrações de glicerol causaram mortalidade total dos conídios de *B. bassiana*, para o primeiro nível (aa 0,292) de secagem já na primeira avaliação e dessa forma esses tratamentos foram retirados da análise e não foram incluídos na Figura 4.6.1.A. Entretanto, no segundo nível de secagem (aa 0,187), apesar de uma rápida redução da viabilidade nos tratamentos com glicerol, esses ainda apresentavam conídios viáveis após as primeiras avaliações (Figura 4.6.1.B) e foram incluídos na análise (Anexo F.1).

No primeiro nível de secagem (aa 0,292) todos os tratamentos diferiram significativamente entre si ($P < 0,001$), o controle foi o pior tratamento e o aumento da concentração de sílica resultou em maior tempo de prateleira (Figura 4.6.1.A). A adição de sílica gel a 5% do peso total da formulação resultou em um TL_{20} de 104 dias, valor 13% superior a concentração de 3% de sílica e 62,5% superior ao tempo obtido com a concentração de 1% de sílica, enquanto o TL_{20} do tratamento controle foi inferior a 15 dias. Todos os tratamentos contendo sílica apresentaram TL_{50} superior a 160 dias, enquanto no controle o TL_{50} foi de 81 dias (Tabela 4.6.1).

Tabela 4.6.1 - Tempos letais (em dias) estimados para conídios de *Beauveria bassiana* com o nível de secagem 1 (aa 0,292) formulados em óleo de girassol com a adição de sílica gel (Sil) na concentração de 1, 3 e 5%, além do tratamento controle. Armazenamento a 26°C

Redução de viabilidade (%)	Tempo (dias)			
	Sil 1%	Sil 3%	Sil 5%	Controle
20%	64	92	104	<15
50%	>160	>160	>160	81
90%	>160	>160	>160	>160

Figura 4.6.1 - Estimativas do modelo ajustado para viabilidade de conídios de *Beauveria bassiana* formulados em óleo de girassol contendo os dessecantes Sílica Gel (Sil) ou Glicerol (Gli) nas concentrações de 1, 3 e 5 %. A) conídios com o primeiro nível de secagem (aa 0,292) e viabilidade inicial de 95,3% ; B) conídios com o segundo nível de secagem (aa 0,187) e viabilidade inicial de 94,1%..

No segundo nível de secagem (aa 0,187) de conídios (Figura 4.6.1.B) as duas menores concentrações de sílica (1% e 3%) foram semelhantes ($P = 0,754$) e ambas foram significativamente inferiores a maior concentração. A formulação contendo 5% de sílica apresentou TL_{20} de 96 dias com 90, 79 e <15 dias para as concentrações de 3%, 1% e controle, respectivamente (Tabela 4.6.2)

As três concentrações de sílica proporcionaram TL_{50} superiores a 160 dias enquanto que no tratamento controle o período estimado foi de 112 dias e nos tratamentos contendo glicerol inferiores a 15 dias demonstrando a incompatibilidade

desse último composto aos conídios, apesar da diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,001$) (Tabela 4.6.2).

Tabela 4.6.2 - Tempos letais (em dias) estimados para conídios de *Beauveria bassiana* com o nível de secagem 2 (aa 0,187) formulados em óleo de girassol com a adição de sílica gel (Sil) ou glicerol (Gli) na concentração de 1, 3 e 5%, além do tratamento controle sem dessecante. Armazenamento a 26°C

Redução de viabilidade (%)	Tempo (dias)						
	Gli 1%	Gli 3%	Gli 5%	Sil 1%	Sil 3%	Sil 5%	Controle
20%	<15	<15	<15	79	80	96	<15
50%	<15	<15	<15	>160	>160	>160	112
90%	31	<15	<15	>160	>160	>160	>160

Semelhante ao ocorrido com *B. bassiana*, para *M. anisopliae* o glicerol foi o dessecante menos compatível e devido a redução total da viabilidade na primeira avaliação as concentrações de 3 e 5% foram retiradas da análise realizada com o nível 1 de secagem (Figura 4.6.1.A) (Anexo F.1.)

Para as formulações compostas pelos conídios do primeiro nível de secagem (aa 0,281), a maior concentração de sílica resultou no maior período de prateleira com TL_{50} de 107 dias, resultado superior ($P = 0,035$) ao obtido com a concentração de 3% que foi de 101 dias. A adição de 1% de sílica gel promoveu resultados muito superiores aos obtidos no tratamento controle, com TL_{50} de 91 e < 15 dias, respectivamente. O glicerol apresentou períodos inferiores a 15 dias para esse parâmetro (Tabela 4.6.3).

Tabela 4.6.3 - Tempos letais (em dias) estimados para conídios de *Metarhizium anisopliae* com o nível de secagem 1 (aa 0,281) formulados em óleo de girassol com a adição de sílica gel (Sil) ou glicerol (Gli) na concentração de 1, 3 e 5%, além do tratamento controle sem dessecante. Armazenamento a 26°C

Redução de viabilidade (%)	Dessecante e Concentração				
	Gli 1%	Sil 1%	Sil 3%	Sil 5%	Controle
20%	<15	<15	<15	<15	<15
50%	<15	91	101	107	31
90%	23	>160	>160	>160	>160

Figura 4.6.2 - Estimativas do modelo ajustado para viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae* formulados em óleo de girassol contendo os dessecantes Sílica Gel (Sil) ou Glicerol (Gli) nas concentrações de 1, 3 e 5 %. A) conídios com o primeiro nível de secagem (aa 0,281) e viabilidade inicial de 85,8%; B) conídios com o segundo nível de secagem (aa 0,205) e viabilidade inicial de 88,6%.

Considerando o segundo nível de secagem (Fig 4.6.2.B) de conídios (aa 0,205) a mesma tendência de redução de viabilidade foi obtida comparando ao primeiro nível, mas a perda de viabilidade foi mais acentuada o que repercutiu em menores tempos de prateleira para a maioria dos tratamentos. Entretanto, as maiores concentrações de glicerol (3% e 5%) não inviabilizaram totalmente os conídios já na primeira avaliação, e consequentemente foram incluídas na análise (Anexo F.1). Nessas condições as duas maiores concentrações de sílica apresentaram comportamento semelhante ($P = 0,111$) com TL_{50} próxima a 80 dias, período 2,3

vezes superior ao observado na concentração de 1% com TL₅₀ de 33 dias, enquanto o controle resultou em TL₅₀ de menos de 15 dias. (Tabela 4.6.4)

Tabela 4.6.4 - Tempos letais (em dias) estimados para conídios de *Metarhizium anisopliae* com o nível de secagem 2 (aa 0,205) formulados em óleo de girassol com a adição de sílica gel (Sil) ou glicerol (Gli) na concentração de 1, 3 e 5%, além do tratamento controle. Armazenamento a 26°C

Redução de viabilidade (%)	Dessecante e Concentração						
	Gli 1%	Gli 3%	Gli 5%	Sil 1%	Sil 3%	Sil 5%	Controle
20%	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15
50%	<15	<15	<15	33	85	80	<15
90%	35	<15	<15	>160	>160	>160	132

Apesar de o glicerol ser reconhecido por suas características toxicológicas favoráveis e inclusive ser utilizado para a preservação de microrganismos ($\leq 20\%$), a sua combinação com óleo de girassol se mostrou extremamente tóxica aos conídios de *B. bassiana* e *M. anisopliae*, mesmo nas menores concentrações. O glicerol tem como atributo uma alta capacidade de absorver umidade do ar e como uma substância polar tem baixa solubilidade em óleo. Em função da alta densidade e baixa solubilidade em óleo do glicerol, pode ter ocorrido a decantação do glicerol e dos conídios, fazendo com que estes ficassem em contato direto no fundo do frasco. Os efeitos deletérios do glicerol podem estar associados a sua alta capacidade de extração de água, resultando em extração da água metabólica dos conídios ou que o glicerol tenha retirado a água da fração óleo e esta tenha se concentrado na fração glicerol, ou mesmo da toxicidade do glicerol puro em contato com os conídios, que explicaria a sua rápida mortalidade nas combinações com esse dessecante.

A água é um fator crítico para metabolismo de fungos entomopatogênicos. A germinação de conídios e o crescimento hifal são ótimos entre 95 – 100% de umidade, e essas funções cessam abaixo de 93% (BURGUES, 1998). A vida de prateleira de fungos entomopatogênicos é muito afetada pela umidade. A sobrevivência de *M. anisopliae* var *acridum* foi ótima em altas umidades (86 – 98%), pela manutenção do estado metabólico, mas evitando a germinação (DAOUST; ROBERTS 1983) ou em umidades muito baixas (4 – 6%) pela redução do metabolismo dos conídios (MOORE; LANGEWALD; OBOGON 1997; HONG et al., 1998). Em umidades de 4 a 6%, a água livre é retirada e esse nível de secagem não

é suficiente para retirar a água metabolicamente ligada (CROWE; CROWE; CHAPMAN, 1984).

Biomoléculas, como as constituintes da membrana, são rodeadas por uma camada de moléculas de água que são importantes na sua estabilização por meio de ligações de hidrogênio. Em condições de extrema desidratação essa água ligada as biomoléculas é removida o que pode resultar da sua desestabilização e afetar a sobrevivência de conídios (CROWE et al., 1990).

De forma contrária, as combinações com sílica gel foram extremamente importantes para o incremento da sobrevivência dos dois fungos em óleo. Os dados corroboram com o observado por Moore et al. (1995), que avaliando fatores que influenciavam a sobrevivência de conídios de *M. flavoviridae* concluíram que a adição de 1 grama de sílica gel não indicadora em 5 mL de formulação do tipo suspensão oleosa, foi o fator mais significativo, resultando em viabilidades superiores a 60 e 80% após 127 semanas de armazenamento a 17 e 8°C, respectivamente. É importante ressaltar, que após 50 semanas de armazenamento a germinação dos conídios decresceu muito nas avaliações após 24 horas de incubação e os autores passaram a considerar a viabilidade após 48 horas de incubação.

Para o lote de conídios mais úmidos de *B. bassiana* (aa 0,292) foi observado aumentos significativos da sobrevivência em função do aumento de concentração de sílica. A maior concentração de sílica (5%) incrementou a sobrevivência em: 13% comparado a concentração de 3% de sílica, 60% comparado a concentração de 1% de sílica e mais de sete vezes comparado ao controle. Esses resultados demonstram que quanto maior a umidade inicial dos conídios maior é quantidade de sílica necessária para atingir os baixos níveis de umidade que resultem em maior vida de prateleira. Os resultados obtidos com a secagem 1 (aa 0,281) de *M. anisopliae* também confirmam essa afirmação, pois a tendência foi a mesma observada para *B. bassiana*, e para *M. anisopliae* a maior concentração de sílica proporcionou sobrevivência 3,5 vezes superior ao controle.

Para os conídios mais secos resultantes do segundo nível de secagem (*B. bassiana* aa: 0,187 e *M. anisopliae* aa: 0,205) as diferenças de sobrevivência em função das concentrações de sílica foram menores que as observadas com o primeiro nível de secagem. Não foram observadas diferenças significativas entre as duas menores concentrações de sílica (1 e 3%) para *B. bassiana*, enquanto que

para *M. anisopliae* não foi observada diferença entre as maiores concentrações de sílica (3 e 5%). Embora a necessidade de retirada de umidade nas formulações com conídios mais secos seja menor, a adição de sílica nestas formulações é ainda extremamente vantajosa, já que os tratamentos controle resultaram em tempos de prateleira 5,6 e 6,4 vezes inferiores aos melhores tratamentos de *M. anisopliae* e *B. bassiana* com sílica, respectivamente.

Considerando os resultados promissores obtidos com a sílica, um segundo experimento, descrito a seguir, foi realizado para determinar o efeito desse aditivo em função da temperatura de armazenamento.

Ensaio 2:

Para *B. bassiana* (aa 0,152) as concentrações de sílica gel de 3% e 5% apresentaram parâmetros muito próximos e foram agrupadas (G1), restando os tratamentos testemunha (C 0%) e a concentração de sílica a gel a 1% (Figura 4.6.3)

Figura 4.6.3 - Estimativas dos parâmetros do preditor linear para cada tratamento de *Beauveria bassiana*

As estimativas dos parâmetros do preditor linear, do parâmetro de dispersão e o gráfico de envelope simulado demonstrando o ajuste do modelo são apresentados no Anexo F.2.

Independente da temperatura de armazenamento foi observado um incremento significativo na sobrevivência de conídios de acordo com o aumento da concentração de sílica ($P < 0,001$). O TL_{20} do grupo 1 (3 e 5% de sílica) a 26°C foi 21% superior a concentração de 1% de sílica e 2,6 vezes superior ao tratamento

controle. O TL_{20} dos tratamentos com 3 e 5% de sílica (grupo 1) foi de 104 dias e TL_{50} de 199 dias. Mesmo a concentração de 1% resultou em tempo de prateleira 2,15 vezes maior que o tratamento sem sílica gel. (Figura 4.6.4.A).

Na maior temperatura de armazenamento as tendências dos tratamentos foram as mesmas da temperatura menor, entretanto houve redução no tempo de prateleira em todos os tratamentos avaliados. Enquanto os tratamentos com 3% e 5% (grupo 1) apresentaram TL_{20} de 104 dias a 26°C na maior temperatura esse período foi reduzido para 64 dias.

A 30°C também foi observada resposta significativa ao aumento de concentração de sílica e com incrementos de até 2,83 vezes quando comparados o grupo 1 com o controle ($P < 0,001$). (Figura 4.6.4.B. Tabela 4.6.5).

Tabela 4.6.5 - Tempos letais (em dias) estimados para conídios de *Beauveria bassiana* (aa 0,152) formulados em óleo de girassol contendo 0, 1, 3 e 5% de sílica gel

Redução de viabilidade (%)	Temperatura					
	26°C			30°C		
	Concentração			Concentração		
	Controle (0%)	1%	3 e 5%	Controle (0%)	1%	3 e 5%
20%	40	86	104	<24	44	64
50%	138	181	199	56	139	159
90%	>257	>257	>257	214	>257	>257

Figura 4.6.4 - Estimativas do modelo ajustado para conídios de *Beauveria bassiana* (aa 0,152) formulados em óleo de girassol considerando os tratamentos agrupados: G1: sílica gel a 3 e 5% e não agrupados: C0% = Controle e C1% = sílica gel a 1%. A) Armazenamento a 26°C; B) Armazenamento a 30°C. Viabilidade inicial de conídios de 94,9%.

Para *M. anisopliae* (aa 0,160), apesar da similaridade entre os efeitos da concentração 5% e 3% ao realizar o teste de agrupamento o resultado apontou diferença significativa entre as concentrações, dessa forma observa-se nos resultados todas as concentrações de sílica gel isoladas e o controle. (Figura 4.6.5)

Figura 4.6.5 - Estimativas dos parâmetros do preditor linear para cada tratamento de *Metarhizium anisopliae*

As estimativas dos parâmetros do preditor linear, do parâmetro de dispersão e o gráfico de envelope simulado demonstrando o ajuste do modelo são apresentados no Anexo F.2.

Considerando as duas temperaturas avaliadas os únicos tratamentos que não apresentaram diferenças significativas foram as concentração de 1% e 3% quando armazenadas a 26°C ($P = 0,087$).

Da mesma forma como foi observado para *B. bassiana*, nas duas temperaturas, o tempo de prateleira de conídios de *M. anisopliae* foi maior com o aumento da concentração de sílica, que com 5% de sílica apresentou os maiores tempos de prateleira. Entretanto, as diferenças entre os três tratamentos de *M. anisopliae* contendo sílica foram inferiores ao observado com *B. bassiana*, sendo a diferença entre os tratamentos de no máximo 29% na comparação de TL_{50} a 30°C das concentrações 5 e 1%.

O TL_{50} do tratamento com 5% de sílica foi 2,85 vezes superior ao controle a 26°C e a 30°C foi maior que 3,47 vezes já que esse tratamento apresentou TL_{50} de 80 dias e no controle esse parâmetro foi inferior a 24 dias.

Figura 4.6.6 - Estimativas do modelo ajustado para conídios de *Metarhizium anisopliae* (aa 0,160) formulados em óleo de girassol contendo ou não sílica gel. C0% = Controle e C1% C3% e C5% = sílica gel a 1, 3 e 5%. A) Armazenamento a 26°C; B) Armazenamento a 30°C. Viabilidade inicial de conídios de 86,94%.

Tabela 4.6.6 - Tempos letais (em dias) estimados para conídios de *Metarhizium anisopliae* (aa 0,160) formulados em óleo de girassol contendo 0, 1, 3 e 5% de sílica gel e armazenados a 26 e 30°C

Redução de viabilidade (%)	Temperatura							
	26°C				30°C			
	Concentração				Concentração			
	Controle 0%	1%	3%	5%	Controle 0%	1%	3%	5%
20%	<24	<24	<24	<24	<24	<24	<24	<24
50%	40	100	107	114	<24	62	71	80
90%	191	250	256	>257	156	211	223	229

Como já discutido no item anterior a adição de sílica gel resulta em aumentos significativos no tempo de prateleira independente da umidade inicial dos conídios, mesmo não sendo possível quantificar a magnitude da secagem após a mistura no óleo, a mudança de coloração da sílica após o armazenamento é um indicativo da adsorção de umidade.

Hedgecock et al. (1995) descreveram que além do efeito benéfico na secagem dos conídios no óleo, uma outra vantagem da sílica gel seria a absorção/adsorção de metabólitos que os conídios liberam durante o armazenamento e que prejudicariam sua sobrevivência a longo prazo. Estes autores determinaram que a tolerância a temperatura depende da umidade inicial dos conídios de *M. flavoviridae*, sendo que conídios com umidades iniciais de 19, 15 e 9% formulados em óleo + sílica (1g em 5mL) tiveram drástica redução na viabilidade a 38°C enquanto conídios com 5% de umidade apresentaram temperatura crítica superior.

Nesse ensaio, para *B. bassiana* não houve diferença entre as duas maiores concentrações de sílica gel (3 e 5%) e a sobrevivência nestas concentração foi 21% superior a menor concentração de sílica (1%) a 26°C e 45% superior a 30°C. Independente da temperatura o incremento da sobrevivência nas maiores concentrações de sílica (3 e 5%) foi de 2,6 vezes em relação ao controle.

Para *M. anisopliae* a tendência de aumento da sobrevivência em função da concentração de sílica e temperatura foi a mesma observada para *B. bassiana*, entretanto todas as concentrações diferiram estatisticamente entre si. O aumento da temperatura incrementou a diferença na sobrevivência entre os tratamentos com sílica e o controle, sendo que na formulação com 5% de sílica a diferença para o controle sem sílica foi de 2,85 vezes a 26°C e de 3,3 vezes a 30°C.

A determinação da concentração ideal de sílica em relação ao volume de óleo é importante já que a presença de sílica dentro da embalagem de uma formulação comercial pode ser desvantajosa para manipulação e incrementar o custo do produto final. Os resultados semelhantes de sobrevivência obtidos com as duas maiores concentrações de sílica para *B. bassiana* e os resultados muito próximos nessas duas concentrações para *M. anisopliae* indicam que a quantidade de sílica ideal estaria próxima a 5%, não sendo necessárias maiores quantidades de sílica. Nos únicos estudos sobre o assunto (MOORE et al., 1993, 1995; HEDGECKOCK et al., 1995) foi utilizado uma concentração de 20% (1g/5mL) muito superior a concentração com melhores resultados descritos no presente trabalho.

Burgues (1998) e Moore et al. (1995) relataram que a utilização de sílica gel não indicadora seria vantajosa quando comparada a sílica gel indicadora em função de uma possível toxicidade ao fungo do cloreto de cobalto que é o indicador de umidade utilizado. No presente trabalho, foi utilizada sílica gel indicadora com bons resultados e não foram encontrados dados na literatura em que os dois tipos de sílica tenham sido comparados. Mediante essas indicações seria necessário realizar experimentos voltados apenas para entender o potencial de diferentes marcas e tipos de sílica gel, especialmente incluindo sílicas mais modernas onde se utiliza corantes indicadores de origem orgânica e atóxicos.

Considerando os resultados obtidos nessa etapa e na anterior fez-se necessário entender o comportamento da sílica em formulações contendo emulsionantes (experimento descrito a seguir), e principalmente avaliar se o incremento de tempo de prateleira resultante da adição de sílica estava relacionado a secagem dos conídios, secagem do óleo, ou secagem de ambos (experimento descrito no item 4.8).

4.7 Efeito da adição de dessecantes no tempo de prateleira de conídios formulados em óleo vegetal + emulsionantes

As estimativas e desvios dos parâmetros do preditor linear e o ajuste do modelo beta binomial proposto para *B. bassiana* são apresentados no Anexo G.

Para *B. bassiana* (aa 0,152) a 26°C, a formulação oleosa contendo sílica gel (5%) e isenta de emulsionantes foi a que apresentou maior tempo de prateleira com TL₂₀ de 151 e TL₅₀ de 217 dias ($P < 0,001$) (Figura 4.7.1.A e Tabela 4.7.1). Além desse tratamento, apenas a formulação oleosa contendo sílica e o emulsionante E5 (KBRAdj) (TL₂₀ de 136 dias) foi superior ao tratamento contendo conídios puros armazenados sem óleo (TL₂₀ de 123 dias) ($P < 0,001$). Dentre os quatro emulsionantes testados os mais seletivos foram E5 e E7 (Tween 80) e os menos seletivos E11 (Ultramona R150) e E8 (Silwet L77), que apresentaram TL₂₀ nas combinações com sílica de 136, 113, 64 e < 22 dias, respectivamente (Tabela 4.7.1)

Independente da formulação avaliada a adição da sílica proporcionou tempo de prateleira muito superior quando comparado à mesma combinação de óleo e emulsionante sem sílica ($P < 0,001$), sendo a maior diferença observada para o

emulsionante E11 apresentando TL_{50} pelo menos 5,9 vezes superior na presença da sílica (Tabela 4.7.1).

No armazenamento a 30°C os dois melhores tratamentos foram os mesmos observados na menor temperatura (Ep+O+Sil e Ep+O+E5+Sil), entretanto a formulação oleosa contendo sílica e emulsionante E7 também foi superior aos conídios puros a 30°C ($P < 0,001$) (Figura 4.7.1.B). A adição da sílica melhorou o tempo de prateleira de todas as combinações, os emulsionantes mais compatíveis foram E5 e E7, os menos compatíveis E11 e E8, mesma tendência observada a 26°C ($P < 0,001$). Uma tendência observada com todos os tratamentos é a redução no tempo de prateleira dos conídios armazenamento a 30°C em comparação a menor temperatura, considerando os dois melhores tratamentos essa redução foi de aproximadamente 3 vezes comparando o TL_{20} . (Tabela 4.7.1)

Figura 4.7.1 - Estimativas do modelo ajustado para viabilidade de conídios de *Beauveria bassiana* (aa 0,152) formulados em óleo de girassol contendo emulsionantes e/ou agentes dessecantes e armazenados a 26°C (A) e 30°C (B) EP = conídio; O = Óleo; Si = Sílica gel; E5; E6; E8 e E11 = emulsionantes adicionados a formulação. Viabilidade inicial de conídios de 94,9%.

Tabela 4.7.1 - Tempos letais (em dias) estimados para conídios de *Beauveria bassiana* (aa 0,152) mantidos na forma de conídios puros ou formulados em óleo com a adição de sílica e/ou emulsionantes e armazenados a 26 e 30°C

Tratamentos	26°C			30°C		
	Redução da viabilidade			Redução da viabilidade		
	20%	50%	90%	20%	50%	90%
Ep	123	188	>257	<22	69	178
Ep+O	36	103	210	<22	<22	123
Ep+O+Si	151	217	>257	55	121	230
Ep+O+E11	<22	<22	121	<22	<22	<22
Ep+O+E11+Si	64	130	238	<22	53	162
Ep+O+E5	<22	77	185	<22	<22	91
Ep+O+E5+Si	136	201	>257	41	106	213
Ep+O+E7	54	120	229	<22	<22	124
Ep+O+E7+Si	113	178	>257	<22	79	187
Ep+O+E8	<22	39	146	<22	<22	36
Ep+O+E8+Si	<22	85	193	<22	<22	105

EP = conídio; O = Óleo; Si = Sílica gel; E5; E6; E8 e E11 = emulsionantes adicionados a formulação

Para *M. anisopliae* (aa 0,160) a 26°C, a formulação oleosa contendo sílica e o emulsionante E5 foi a que apresentou maior tempo de prateleira com TL₂₀ de 46 e TL₅₀ de 110 dias ($P < 0,001$) (Figura 4.7.2.A, Tabela 4.7.2). Além desse tratamento, apenas as formulações oleosas contendo sílica e sem emulsionante (TL₅₀ 104 dias) e com o emulsionante E7 (TL₅₀ 86 dias) foram superiores ao tratamento contendo conídios puros armazenados sem óleo (TL₅₀ 82 dias) ($P < 0,001$). O tratamento formulado em óleo mais sílica e emulsionante E11 foi semelhante aos conídios puros ($P = 0,115$). A seletividade dos emulsionantes em ordem decrescente foi E5, E7, E11 e E8 com TL₅₀ nas combinações com sílica de 110, 86, 78 e <22 dias, respectivamente. (Tabela 4.7.2). Sem a adição de sílica os emulsionantes E11 e E8 foram os piores tratamentos resultando em TL₅₀ inferiores a 22 dias.

A adição de sílica proporcionou maior tempo de prateleira, independente da combinação avaliada aumentando em até 3,8 vezes a TL₅₀ como observado para a combinação de conídios puros com óleo sem a adição de emulsionantes (Tabela 4.7.2).

Quando armazenados a 30°C os dois melhores tratamentos foram os mesmos observados na menor temperatura (Ep+O+Si+E5 e Ep+O+Si), e as formulações oleosas contendo sílica e os emulsionantes E7 e E11 também foram superiores aos conídios puros a 30°C ($P < 0,001$) (Figura 4.7.2.B). A adição da sílica melhorou

consideravelmente o tempo de prateleira de todas as combinações, os emulsionantes mais compatíveis foram E5 e E7, os menos compatíveis E11 e E8, mesma tendência observada a 26°C ($P < 0,001$). Uma tendência observada com todos os tratamentos é a redução no tempo de prateleira dos conídios armazenamento a 30°C em comparação a menor temperatura, considerando os dois melhores tratamentos essa redução foi de aproximadamente 3 vezes fixando o TL₂₀ (Tabela 4.7.2).

Figura 4.7.2 - Estimativas do modelo ajustado para viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae* (aa 0,160) formulados em óleo de girassol contendo emulsionantes e/ou agentes dessecantes e armazenados a 26°C (A) e 30°C (B); EP = conídio; O = Óleo; Si = Sílica gel; E5; E6; E8 e E11 = emulsionantes adicionados a formulação. Viabilidade inicial de conídios de 86,94%.

Tabela 4.7.2 - Tempos letais (em dias) estimados para conídios de *Metarhizium anisopliae* (aa 0,160) mantidos na forma de conídios puros ou formulados em óleo com a adição de sílica e/ou emulsificantes e armazenados a 26 e 30°C

Tratamento	26°C			30°C		
	Redução da viabilidade			Redução da viabilidade		
	20%	50%	90%	20%	50%	90%
Ep	<22	82	186	<22	34	138
Ep+O	<22	27	132	<22	<22	71
Ep+O+Si	39	104	208	<22	55	158
Ep+O+E11	<22	<22	103	<22	<22	<22
Ep+O+E11+Si	<22	78	185	<22	45	150
Ep+O+E5	<22	40	146	<22	<22	66
Ep+O+E5+Si	46	110	215	<22	65	169
Ep+O+E7	<22	23	130	<22	<22	24
Ep+O+E7+Si	22	86	191	<22	42	147
Ep+O+E8	<22	<22	71	<22	<22	<22
Ep+O+E8+Si	<22	45	148	<22	<22	78

EP = conídio; O = Óleo; Si = Sílica gel; E5; E6; E8 e E11 = emulsificantes adicionados a formulação

Os dados obtidos para *B. bassiana* sugerem que a secagem de conídios a baixos níveis de umidade (aa 0,152) resulta em longos períodos de armazenamento, principalmente se a comparação for feita com o armazenamento em óleo sem a presença de sílica, pois a sobrevivência nessas condições resultou em períodos de sobrevivência 3,4 vezes menores. Nesse caso, o TL₂₀ dos conídios puros a 26°C foi de 123 dias o que pode ser considerado um período razoável, enquanto que na combinação apenas com óleo foi de 36 dias.

Os únicos dois tratamentos com períodos de sobrevivências superiores aos conídios puros não formulados foram a formulação oleosa com sílica (o melhor tratamento) e a formulação oleosa com sílica mais o emulsificante E5, nas duas temperaturas avaliadas. Na maior temperatura a combinação de óleo, sílica e o emulsificante E7 (Ep+O+E7) também superou os conídios puros.

Nas duas temperaturas observa-se efeito deletério dos emulsificantes quando não se utiliza a sílica já que todas as combinações com emulsificantes representaram sobrevivências inferiores a obtida com o tratamento apenas com óleo (Ep + O), com exceção do emulsificante E7 (Tween 80) a 26°C. O emulsificante E7 mostrou maior toxicidade na maior temperatura em comparação a 26°C, provavelmente pela maior solubilidade em temperaturas mais elevadas.

Para *M. anisopliae* os períodos de sobrevivência foram inferiores a *B. bassiana* e a importância da seleção correta do emulsificante bem como a presença da sílica

ficaram mais evidentes, considerando que a sobrevivência de conídios puros, mesmo que bem secos (aa 0,160) não foi satisfatória (TL₅₀ de 82 dias a 26°C). O emulsionante E5 incrementou o tempo de prateleira quando combinado a sílica gel e o efeito desses componentes foi aditivo, pois a sua combinação resultou no melhor tratamento.

Como discutido no item 4.4 (compatibilidade de emulsionantes puros diretamente misturados aos conídios) poucos trabalhos avaliaram o armazenamento de longo prazo de formulações oleosas de fungos entomopatogênicos dificultando a comparação dos dados. A importância da sílica gel mais uma vez foi comprovada e como observado nos itens anteriores os emulsionantes E5 e E7 podem ser considerados na composição de formulações oleosas de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, pois independente de melhorar ou piorar a sobrevivência o emulsionante é um componente essencial para esse tipo de formulação. Considerando a natureza particulada de formulações de conídios o experimento descrito a seguir, além de investigar se a sílica gel retira a umidade do óleo ou do conídio, avaliou também a compatibilidade da sílica pirogênica como agente espessante da formulação para evitar a floculação (decantação) dos conídios e o efeito da sílica gel no armazenamento de conídios puros.

4.8 Efeito da pré-secagem do óleo no tempo de prateleira de conídios

Os parâmetros de viabilidade para os diferentes tratamentos de *Beauveria bassiana* estão apresentados na Figura 4.8.1:

Figura 4.8.1 - Estimativas dos parâmetros do preditor linear para os tratamentos compostos por conídios de *Beauveria bassiana* Ep: conídios puros; EP Ose Esse SP: conídios em óleo pré-seco emulsificante pré-seco e com a adição de sílica pirogênica; EP Ose SP: conídios em óleo pré-seco e com adição de sílica pirogênica; EP Oum: conídios em óleo não seco; EP Oum Sil: conídios em óleo não seco e com a adição da sílica gel na formulação; EP Sil: conídios puros armazenados com sílica gel; EP Ose: conídios em óleo pré-seco; Ep Ose Sil: conídios em óleo pré-seco e com a adição de sílica gel na formulação; Ep Ose Ese: conídios em óleo pré-seco e emulsificante pré-seco; EP Ose Eum: conídios em óleo pré seco e emulsificante não seco

Devido à similaridade dos parâmetros dos tratamentos verificados pelo teste de razão de verossimilhança foram formados os seguintes agrupamentos:

- **Grupo g1:** Ep Ose Esse, Ep Ose Eum, Ep Ose SP, Ep Oum Sil, Ep Sil
- **Tratamentos não agrupados:** Ep, Ep Ose, Ep Ose Esse SP, Ep Ose Sil, EP Oum

As estimativas dos parâmetros do preditor linear e do parâmetro de dispersão oriundos do modelo ajustado aos grupos e tratamentos não agrupados e o ajuste do modelo mediante gráfico de envelope simulado são apresentados no Anexo H.

Conídios de *B. bassiana* (aa 0,034) armazenados a 26°C apresentaram o melhor tempo de prateleira quando formulados em óleo previamente seco e com a adição de sílica durante armazenamento (EP Ose Sil) ($P = 0,009$) com TL_{20} superior a 139 dias (Tabela 4.8.1). A manutenção de conídios puros teve comportamento semelhante a formulação de conídios em óleo que passou pela secagem prévia ($P = 0,193$) e esses dois tratamentos foram superiores aos demais, inclusive a combinação de conídios puros com sílica (EP Sil) ($P < 0,001$) (Figura 4.8.2.A). A ausência de sílica em todos os processos de secagem (Ep Oum) resultou no pior período de prateleira de conídios com TL_{20} de 68 dias ($P < 0,001$) esse período foi 73% inferior ao obtido com a segunda pior combinação (Ep Ose Ese SP). A sílica pirogênica diminuiu o período de prateleira dos conídios nas duas temperaturas de

armazenamento ($P < 0,001$) o que pode ser observado nas comparações dos tratamentos Ose e Ose SP (G1) e dos tratamentos Ose Ese (G1) com Ose Ese SP.

Tabela 4.8.1 - Estimativas de tempos letais em dias estimados para conídios de *Beauveria bassiana* (aa 0,034) em diferentes formulações e armazenados a 26 e 30°C

Tratamento	26°C			30°C		
	Redução da viabilidade			Redução da viabilidade		
	20%	50%	90%	20%	50%	90%
EP	>139	>139	>139	79	>139	>139
EP Ose	>139	>139	>139	74	>139	>139
EP Ose Ese SP	118	>139	>139	46	136	>139
EP Ose Sil	>139	>139	>139	88	>139	>139
EP Oum	68	>139	>139	<14	85	>139
G1	129	>139	>139	56	>139	>139

Ep: conídios puros; EP Ose: conídios em óleo pré-seco; EP Ose Ese SP: conídios em óleo pré-seco emulsionante pré-seco e com a adição de sílica pirogênica; Ep Ose Sil: conídios em óleo pré-seco e com a adição de sílica gel na formulação; EP Oum: conídios em óleo não seco; G1:(EP Ose SP = conídios em óleo pré-seco e com adição de sílica pirogênica; EP Oum Sil: conídios em óleo não seco e com a adição da sílica gel na formulação; EP Sil: conídios puros armazenados com sílica gel; Ep Ose Ese: conídios em óleo pré-seco e emulsionante pré-seco; EP Ose Eum: conídios em óleo pré seco e emulsionante não seco)

O benefício dos processos de secagem com sílica na sobrevivência dos conídios ficou ainda mais evidente na maior temperatura de armazenamento (30°C) em que o tratamento combinado ao óleo sem secagem prévia (Ep Oum) apresentou TL_{20} inferior a 14 dias, período no mínimo 3,3 vezes menor que o observado com o segundo pior tratamento (Figura 4.8.2.B). Adicionalmente, o melhor período de prateleira foi o da combinação que passou pelos dois processos de secagem com sílica (Ep Ose Sil) com TL_{20} de 88 dias ($P < 0,001$) (Tabela 4.8.1). Mesmo a secagem somente pela adição de sílica gel no momento da formulação aumentou significativamente o período de prateleira.

Figura 4.8.2 - Estimativas do modelo ajustado para viabilidade de conídios de *Beauveria bassiana* (aa 0,034) sob diferentes preparações de conídios. Ep: conídios puros; EP Ose: conídios em óleo pré-seco; EP Ose Ese SP: conídios em óleo pré-seco emulsionante pré-seco e com a adição de sílica pirogênica; Ep Ose Sil: conídios em óleo pré-seco e com a adição de sílica gel na formulação; EP Oum: conídios em óleo não seco; G1:(EP Ose SP = conídios em óleo pré-seco e com adição de sílica pirogênica; EP Oum Sil: conídios em óleo não seco e com a adição da sílica gel na formulação; EP Sil: conídios puros armazenados com sílica gel; Ep Ose Ese: conídios em óleo pré-seco e emulsionante pré-seco; EP Ose Eum: conídios em óleo pré seco e emulsionante não seco) considerando temperatura de 26°C (A) e 30 °C (B). Viabilidade inicial de conídios de 95,6%.

Os parâmetros de viabilidade para os diferentes tratamentos de *M. anisopliae* estão apresentados na Figura 4.8.3:

Figura 4.8.3 - Estimativas dos parâmetros do preditor linear para cada tratamento de *Metarhizium anisopliae* Ep = conídios puros; EP Ose Esse SP = conídios em óleo pré-seco emulsionante pré-seco e com a adição de sílica pirogênica; EP Ose SP = conídios em óleo pré-seco e com adição de sílica pirogênica; EP Oum: conídios em óleo não seco; EP Oum Sil: conídios em óleo não seco e com a adição da sílica gel na formulação; EP Sil: conídios puros armazenados com sílica gel; EP Ose: conídios em óleo pré-seco; EP Ose Sil: conídios em óleo pré-seco e com a adição de sílica gel na formulação; Ep Ose Ese: conídios em óleo pré-seco e emulsionante pré-seco; EP Ose Eum: conídios em óleo pré seco e emulsionante não seco

Devido à similaridade dos parâmetros dos tratamentos verificados via teste de razão de verossimilhança foram formados os seguintes agrupamentos:

- **Grupo 1:** EP Ose e Ep Ose Sil
- **Grupo 2 :** Ep Ose Ese e Ep Ose Eum.
- **Tratamentos não agrupados:** Ep, Ep Ose Esse Sp, Ep Oum, Ep Sil, Ep Oum Sil, Ep Ose SP

As estimativas dos parâmetros do preditor linear e do parâmetro de dispersão oriundos do modelo ajustado aos grupos e tratamentos não agrupados e o ajuste do modelo mediante gráfico de envelope simulado são apresentados no Anexo H.

Para *M. anisopliae* (aa 0,092) independente da temperatura de armazenamento as formulações em que não foi adicionado óleo apresentaram período de prateleira muito superior as demais combinações com óleo (Figura 4.8.4 A e B). A formação do agrupamento 1 contendo os dois tratamentos em que o óleo passou pela pré-secagem em sílica (Ep Ose e Ep Ose Sil) demonstra que a adição de sílica após a pré-secagem não resulta em aumento significativo na viabilidade dos conídios.

No Grupo 2 estão 2 tratamentos com óleo seco (pré-secagem), sendo um com o emulsionante sem secagem (Ep Ose Eum) e outro com emulsionante seco (Ep Ose Esse), o que indica que o processo de secagem prévia do emulsionante não influenciou no tempo de prateleira dos conídios, mas estes foram inferiores aos respectivos tratamentos sem emulsionante ($P < 0,001$).

Na temperatura de 26°C, os conídios puros com sílica sobreviveram significativamente mais tempo que os conídios puros sem sílica ($P < 0,001$) com TL₂₀ de mais de 139 dias e 104 dias, respectivamente. Os demais tratamentos com presença de óleo independente da utilização da sílica apresentaram TL₂₀ inferiores a 14 dias. Entretanto, a importância da adição de sílica fica evidente na comparação dos tempos letais médios, em que o tratamento com conídios formulados em óleo sem secagem apresentou 14 dias e essa mesma combinação com a adição de sílica apresentou 135 dias, um incremento de 9,64 vezes (Tabela 4.8.2).

A 30°C, o melhor tratamento, e único com TL₂₀ superior a 14 dias foi o de conídios puros armazenados com sílica com 60 dias ($P < 0,001$), entretanto apesar de ter apresentado TL₂₀ inferior a 14 dias o tratamento composto apenas pelos conídios puros foi muito superior aos demais formulados em óleo ($P < 0,001$). Semelhante ao observado para *B. bassiana* a formulação contendo sílica pirogênica apresentou uma redução significativa na viabilidade quando comparado ao mesmo tratamento sem sílica pirogênica ($P < 0,001$).

Tabela 4.8.2 - Tempos letais (dias) estimados para conídios de *Metarhizium anisopliae* (aa 0,092) em diferentes formulações e armazenados a 26 e 30°C

Tratamento	26°C			30°C		
	Redução da viabilidade			Redução da viabilidade		
	20%	50%	90%	20%	50%	90%
Ep	104	>139	>139	<14	>139	>139
Ep Ose Ese SP	<14	80	>139	<14	<14	>139
Ep Ose SP	<14	>139	>139	<14	62	>139
EP Oum	<14	14	>139	<14	<14	>139
EP Oum Sil	<14	135	>139	<14	25	>139
EP Sil	>139	>139	>139	60	>139	>139
G1	<14	>139	>139	<14	76	>139
G2	<14	121	>139	<14	<14	>139

Ep = conídios puros; EP Ose Esse SP = conídios em óleo pré-seco emulsionante pré-seco e com a adição de sílica pirogênica; EP Ose SP = conídios em óleo pré-seco e com adição de sílica pirogênica; EP Oum: conídios em óleo não seco; EP Oum Sil: conídios em óleo não seco e com a adição da sílica gel na formulação; EP Sil: conídios puros armazenados com sílica gel; G1: (EP Ose: conídios em óleo pré-seco - Ep Ose Sil: conídios em óleo pré-seco e com a adição de sílica gel na formulação); G2: (Ep Ose Ese: conídios em óleo pré-seco e emulsionante pré-seco - EP Ose Eum: conídios em óleo pré seco e emulsionante não seco)

Figura 4.8.4 - Estimativas do modelo ajustado para viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae* (aa 0,092) sob diferentes preparações. Ep = conídios puros; EP Ose Esse SP = conídios em óleo pré-seco emulsionante pré-seco e com a adição de sílica pirogênica; EP Ose SP = conídios em óleo pré-seco e com adição de sílica pirogênica; EP Oum: conídios em óleo não seco; EP Oum Sil: conídios em óleo não seco e com a adição da sílica gel na formulação; EP Sil: conídios puros armazenados com sílica gel; G1: (EP Ose: conídios em óleo pré-seco - Ep Ose Sil: conídios em óleo pré-seco e com a adição de sílica gel na formulação); G2: (Ep Ose Ese: conídios em óleo pré-seco e emulsionante pré-seco - EP Ose Eum: conídios em óleo pré seco e emulsionante não seco) considerando temperatura de 26° C (A) e 30°C (B). Viabilidade inicial de conídios de 91,6%.

A adição de sílica gel aos conídios puros resultou em efeitos opostos nos dois fungos. Para *B. bassiana*, a sílica gel piorou a sobrevivência dos conídios quando comparada ao tratamento apenas com conídios, e apesar da diminuição não ter sido numericamente alta foi significativa. Entretanto, para *M. anisopliae* a adição da sílica melhorou consideravelmente o tempo de prateleira de conídios puros chegando a ser ao menos quatro vezes superior no armazenamento a 30°C. Essa contradição de efeitos pode estar relacionada à atividade de água inicial dos conídios utilizados, que

para *B. bassiana* foi de 0,034 e de *M. anisopliae* de 0,092. Como os conídios de *B. bassiana* já estavam muito secos antes da formulação, a adição de sílica durante o armazenamento pode ter causado níveis de desidratação deletérios a uma parte dos conídios.

Para *B. bassiana* o melhor tratamento foi a combinação da secagem prévia do óleo aliada a manutenção da sílica gel durante o armazenamento (Ep Ose Sil), esse resultado indica que a sílica atua na secagem dos dois componentes (óleo e conídios), ademais a secagem prévia do óleo foi eficiente, pois os conídios nessa combinação (Ep Ose) tiveram sobrevivência muito superior aos conídios combinados ao óleo sem secagem (Ep Oum), esse último também foi muito inferior ao tratamento em que a sílica foi adicionada apenas no momento da formulação (Ep Oum Sil).

Para *M. anisopliae* a pré-secagem do óleo foi suficiente, e não houve diferença significativa quando a sílica foi adicionada e armazenada junto com a formulação (Ep Ose Sil foi semelhante a Ep Ose), entretanto com o óleo sem secagem prévia a adição da sílica incrementou significativamente a sobrevivência dos conídios.

Moore et al. (1996) observaram diferenças significativas na pré-secagem do óleo no tempo de prateleira de *M. flavoviridae* com 80% de viabilidade após 108 dias comparado a 0% no óleo não seco, entretanto diferente do observado no presente estudo, a manutenção da sílica gel mesmo após a secagem prévia do óleo apresentou melhoria na viabilidade. Os autores justificam esse efeito pelo contínuo processo de secagem pela sílica ao longo do tempo removendo toda a água residual do óleo e a que ocasionalmente entre no sistema ou pela absorção/adsorção de produtos do metabolismo fúngico, incluindo água.

Para as duas espécies fúngicas a sílica pirogênica (SP) apresentou efeito deletério no tempo de prateleira. O efeito da concentração de sílica pirogênica como espessante, e sua capacidade de adsorção de água, além da utilização de outros agentes espessantes devem ser estudados com maiores detalhes, pois esse componente é essencial para uma suspensão oleosa de conídios.

Considerando o tempo de prateleira obtido nas primeiras etapas desse trabalho, fica evidente que o melhor entendimento do processo de secagem e a seleção assertiva de componentes da formulação (emulsionante/espessante) são fatores críticos para se atingir períodos de prateleira aceitáveis para um produto comercial. Os níveis de sobrevivência alcançados nessa etapa com TL₂₀ superiores a 139 dias obtidos para alguns tratamentos de *B. bassiana* e *M. anisopliae* são úteis

para subsidiar mudanças que melhorem ainda mais a estabilidade e tempo de prateleira de micopesticidas.

Entretanto, apenas as etapas que ocorrem antes da aplicação não são suficientes para garantir a eficácia do produto, dessa forma foram realizados os experimentos descritos a seguir, com o objetivo de avaliar o efeito da formulação de conídios em suspensão oleosa na proteção a radiação UV e posteriormente na eficácia de controle.

4.9 Efeito da formulação dispersão oleosa na proteção de conídios expostos a radiação UV

A sobrevivência de conídios foi significativamente maior ($P < 0,001$) para as formulações em óleo quando comparadas aos conídios puros para os dois fungos (Figura 4.9.1). O Tempo letal médio obtido para conídios puros de *B. bassiana* foi de 2 horas e para a formulação oleosa > 4 horas. *M. anisopliae* mostrou-se mais susceptível a ação deletéria da radiação UV quando comparado a *B. bassiana*. O TL_{20} para *M. anisopliae* foi aproximadamente 10 vezes menor do que o observado para *B. bassiana* na forma de conídios puros e 23 vezes inferior considerando as dispersões oleosas. Os tempos letais médios para *M. anisopliae* foram de 0,6 e 1 hora para conídios puros e formulados, respectivamente.

Tabela 4.9.1 - Tempos letais (horas) estimados para conídios de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* exposto à radiação UV e aplicados na forma de conídios puros (EP) e formulações oleosas (SC)

Redução de viabilidade (%)	Tempos letais (horas)			
	<i>Beauveria bassiana</i>		<i>Metarhizium anisopliae</i>	
	Formulação		Formulação	
	EP	SC	EP	SC
20%	0,5	3,5	0,06	0,15
50%	2	>4	0,6	1
90%	>4	>4	1,85	3,37

EP = conídios Puros; SC = Dispersão Oleosa

Figura 4.9.1 - Ajuste dos modelos para redução de viabilidade de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* na forma de conídios puros (EP) e conídios formulados em óleo (SC) e expostos à radiação UV

A radiação ultravioleta causa danos diretos na estrutura do DNA e danos indiretos causados pela formação de moléculas de oxigênio reativo (IGNOFFO; GARCIA, 1978, IGNOFFO, 1992). A meia vida da maioria dos conídios de fungos entomopatogênicos varia de 1 a 4 horas sobre radiação simulada e de 4 a 400 horas sobre radiação solar nas folhas de plantas; as diferenças parecem ser provocadas pela proteção conferida pela planta ou pelo tempo de amostragem em trabalhos de campo (IGNOFFO, 1992).

No presente estudo, *B. bassiana* foi 10 vezes mais tolerante a radiação solar simulada em relação a *M. anisopliae* quando aplicados na forma de conídios puros, e 23 vezes mais tolerante quando os conídios foram aplicados em suspensão oleosa.

Fargues et al. (1996) compararam a suscetibilidade de conídios aéreos de diferentes gêneros de fungos entomopatogênicos e concluíram que o mais tolerante a radiação solar simulada foi *M. flavoviridae* seguido por *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *I. fumosorosea* foi o menos tolerante. A sobrevivência dos conídios de *M. anisopliae* (var *acridum*) foi de 46, 23, 8 e 5% após 1, 2, 4 e 8 horas de exposição a UVB, respectivamente.

B. bassiana apresentou incremento na sobrevivência de no mínimo duas vezes quando os conídios foram formulados em óleo, já que os esporos puros atingiram

50% de viabilidade após duas horas de exposição a radiação e o tratamento com a formulação oleosa não decresceu a esse nível de viabilidade até o final do experimento, em que apresentava viabilidade média de 70%.

A formulação oleosa utilizada nesse estudo proporcionou sobrevivência 66% superior aos conídios puros de *M. anisopliae* comparando o TL_{50} e 1,8 vezes superior comparando o TL_{90} . Alves et al. (1998) avaliaram a sobrevivência de *M. anisopliae* após 6 horas de exposição à radiação solar simulada e obtiveram viabilidades de 73, 50 e 0,5% em óleo puro, dispersão oleosa e suspensão aquosa, respectivamente.

Suspensões oleosas tem demonstrado aumento significativo na tolerância de conídios à radiação ultravioleta em experimentos de laboratório, principalmente pela reflexão e refração da radiação pelo óleo em que os conídios ficam encapsulados (BURGES, 1998)

Além da proteção significativa aos raios UVB promovida apenas pelo óleo, muitos estudos têm sido conduzidos para aumentar esta proteção pela incorporação de protetores solares nas formulações, com resultados satisfatórios. Esses protetores solares podem ser solúveis em água ou em óleo, e dependendo dessa característica podem proteger o conídio de distintas formas após a aplicação em condições de campo.

4.10 Efeito da formulação dispersão oleosa de *M. anisopliae* e *B. bassiana* na eficiência de controle de *Tenebrio molitor*

Ensaio 1: Independente da formulação, foi observado tempo letal médio significativamente menor para os insetos tratados com *B. bassiana* (5 dias) do que com *M. anisopliae* (10 dias) ($P < 0,001$), o que demonstra maior virulência de *B. bassiana* a *T. molitor*. Analisando-se o efeito da formulação, independente do patógeno aplicado, verifica-se que os tempos letais dos insetos tratados com as dispersões oleosas (TL_{50} de 6 dias) foram significativamente menores do que os tratados com conídios puros (TL_{50} de 10 dias) ($P < 0,001$).

Como o principal objetivo do trabalho foi verificar a diferença na sobrevivência de insetos considerando conjuntamente a espécie de entomopatógeno e os tipos de formulação, foram construídas as estimativas conjuntas apresentadas na Figura 4.10.1. Observou-se que o tempo letal médio estimado para os tratamentos que

consistiram em conídios puros de *B. bassiana* (BB EP), *B. bassiana* dispersão oleosa (BB SC), *M. anisopliae* conídios puros MA EP e *M. anisopliae* dispersão oleosa (MA SC) foram respectivamente de 6, 5, >11 e 8 dias (Tabela 4.10.1), com diferenças significativas entre todos os tratamentos ($P < 0,001$). As diferenças também foram significativas ($P < 0,001$) para o TL_{90} , sendo de 8, 6, >11 e 10 dias para BB EP, BB SC, MA EP e MA SC, respectivamente (Tabela 4.10.1).

Figura 4.10.1 - Estimativas das curvas de sobrevivência de larvas de terceiro instar de *Tenebrio molitor* inoculadas com *Beauveria bassiana* (BB) e *Metarhizium anisopliae* (MA) na forma de conídios puros (EP) ou dispersões oleosas (SC).

O tratamento de *B. bassiana* em formulação oleosa apresentou a maior mortalidade para *T. molitor*, enquanto o tratamento de *M. anisopliae* na forma de conídios puros a menor mortalidade. A pulverização de *B. bassiana* e *M. anisopliae* em formulação oleosa aumentou significativamente a mortalidade dos insetos bem como diminuiu o tempo letal médio ($P < 0,001$).

Tabela 4.10.1 - Estimativas do tempo necessário (dias) para causar a morte de 20, 50 e 90% de larvas de *Tenebrio molitor* pulverizadas com diferentes formulações de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*

% de mortalidade	Tempos letais (dias)			
	<i>Beauveria bassiana</i>		<i>Metarhizium anisopliae</i>	
	Conídios puros	Suspensão oleosa	Conídios puros	Suspensão oleosa
20%	5	5	10	7
50%	6	5	>11	8
90%	8	6	>11	10

Beauveria bassiana demonstrou maior virulência para *T. molitor* considerando apenas o efeito do patógeno, e independente da formulação, o tempo letal médio foi metade do observado para *M. anisopliae*. Considerando o efeito isolado da formulação, observa-se uma redução de 67% no tempo letal médio quando os patógenos foram aplicados na forma de dispersão oleosa comparada as aplicações de conídios não formulados.

Avaliando o efeito da formulação vinculado a espécie fúngica, para *B. bassiana* a suspensão oleosa reduziu o tempo letal necessário para matar 90% da população de insetos em 33%. Para *M. anisopliae* a TL_{90} para a suspensão oleosa foi de 10 dias, enquanto que o tratamento com conídios puros não resultou em 90% de mortalidade dos insetos até o final do experimento.

O efeito do óleo na melhoria da eficiência de controle deve estar principalmente relacionado ao processo de adesão de conídios a cutícula do inseto que ocorre de forma mais eficiente quando conídios são formulados em óleo (BOUCIAS; PENDLAND; LATGE, 1988; BURGUES, 1998).

O efeito do óleo na melhoria de desempenho de fungos entomopatogênicos foi comprovado por outros autores (BUTT et al., 1995; BALL et al., 1994; RAMOSKA, 1984; BATEMAN et al., 1993). O óleo, ao contrário da água, se espalha facilmente pela superfície hidrofóbica de insetos e plantas antes de ser absorvido, resultando em melhor distribuição. Conídios formulados em óleo apresentam uma melhor cobertura após a aplicação e o óleo acaba carreando muitos conídios dos espaços mais esclerotizados da cutícula para as regiões intersegmentares. Essas regiões são mais apropriadas para germinação dos conídios e penetração do tubo germinativo e constituem microambiente mais favorável pela maior umidade (BURGUES, 1998, FARGUES; VEY, 1974).

O efeito do óleo potencializou significativamente o controle proporcionado por *M. anisopliae* e *B. bassiana*, entretanto o emulsionante utilizado nessa etapa do trabalho foi apenas o E5, dessa forma, uma comparação dos emulsionantes E5 e E7 foi realizada e está descrita no ensaio a seguir.

Ensaio 2- Comparação dos emulsionantes E5 e E7: Analisando apenas a covariável espécie de patógeno, independente da formulação, foi observada sobrevivência significativamente maior dos insetos tratados com *M. anisopliae* (Ma)

em relação a *B. bassiana* (Bb) ($P < 0,001$), sendo *B. bassiana* mais eficiente que *M. anisopliae*, com TL_{50} de 7 dias e 14 dias, respectivamente.

Considerando apenas o tipo de formulação (independente da espécie fúngica utilizada) as duas formulações oleosas não diferiram entre si ($P = 0,026 \rightarrow \alpha = 1,66\%$) e ambas diferiram do tratamento com conídios puros ($P < 0,001$). O tempo letal médio para a dispersão oleosa com Tween, dispersão oleosa com KBRAdj e conídios puros foi de 9, 12,5 e > 14 dias, respectivamente.

Analisando as combinações de tratamentos (formulações) e fungos observa-se o maior efeito para *B. bassiana* em formulação oleosa com Tween com TL_{50} de 6 dias, essa combinação diferiu de todos os demais tratamentos ($P < 0,001$). (Figura 4.10.2). A segunda combinação mais virulenta foi *B. bassiana* em formulação oleosa contendo KBRAdj, com TL_{50} de 7 dias diferindo das combinações de todos os tratamentos com *M. anisopliae* e do tratamento de *B. bassiana* em conídios puros ($TL_{50} > 14$ dias) ($P < 0,001$) (Tabela 4.10.2).

Figura 4.10.2 - Estimativas das curvas de sobrevivência de larvas de terceiro instar de *Tenebrio molitor* pulverizadas com *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* na forma de conídios puros ou formulações oleosas confeccionadas com dois diferentes emulsionantes

Para *M. anisopliae* a formulação oleosa com Tween (TL 20% de 12 dias) não diferiu da formulação com KBRAdj (TL 20% de 13,5 dias), entretanto foi superior aos conídios puros (TL 20% > 14 dias). Não foi observada diferença significativa entre a formulação com KBRAdj e conídios puros ($P=0,0091 \rightarrow \alpha=0,0033$) apesar da diferença numérica.

Tabela 4.10.2 - Estimativas do tempo necessário (dias) para causar a morte de 20, 50 e 90% de larvas de *Tenebrio molitor* pulverizadas com diferentes formulações de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*

Mortalidade (%)	Espécie Fúngica					
	<i>Beauveria bassiana</i>			<i>Metarhizium anisopliae</i>		
	Formulações			Formulações		
	EP	SC Sol	SC Tw	EP	SC Sol	SC Tw
20	8	6	5	>14	13,5	12
50	>14	7	6	>14	>14	>14
90	>14	>14	9	>14	>14	>14

EP: conídios puros; SC Sol: dispersão oleosa com KBRAdj (5%); SC Tw: dispersão oleosa com Tween 80 (5%)

Nesse ensaio *M. anisopliae* causou baixos níveis de mortalidade e corroborando com os dados obtidos no ensaio anterior, foi menos virulento que *B. bassiana*. As formulações em óleo foram superiores a conídios puros e a aplicação das formulações sem conídios não resultou em mortalidade de insetos, demonstrando que o óleo e os emulsionantes, isoladamente não apresentam atividade inseticida.

Como já discutido anteriormente, poucos trabalhos são encontrados, em que se objetivou comparar a ação de diferentes adjuvantes com a função de emulsionantes em formulações oleosas, o que prejudica a comparação dos dados do presente experimento.

Para *B. bassiana* a formulação composta pelo emulsionante E7 foi significativamente superior a formulação oleosa com o E5 e ambas superiores ao controle. Para *M. anisopliae* as duas formulações oleosas com E5 e E7 não apresentaram diferença significativa, apesar de uma superioridade numérica para a formulação com o emulsionante E7. Devido a baixa mortalidade observada para esse patógeno, a formulação com E5 não diferiu do tratamento com conídios puros.

A composição química e propriedades do emulsionante E5 não foi disponibilizada pelo fabricante, o que impossibilita análises sobre os fatores

associados a sua menor eficácia na formulação em relação ao emulsionante E7 no controle deste inseto. Entretanto, ficou evidente através de observações visuais da calda após a diluição das formulações em água, um menor potencial emulsificante do E5 em comparação ao E7. Isto provavelmente deve resultar em maiores tamanhos das gotas de óleo na fração aquosa, entretanto, a contribuição desta propriedade na eficácia das aplicações do fungo e mortalidade dos insetos.

As relações entre o tipo e concentração do emulsionante, o tamanho das gotas de óleo, a quantidade de conídios por gota e a estabilidade da emulsão devem ser investigadas, pois apesar da tendência observada nesse ensaio, em condições de campo, um produto comercial que não forme uma emulsão estável quando misturado em água tem sua aplicabilidade muito prejudicada.

5 CONCLUSÕES

Conídios mais secos de *B. bassiana* e *M. anisopliae* sobreviveram por mais tempo em comparação a conídios com maior umidade.

A extração de conídios pela lavagem em óleo apresentou os maiores tempos de prateleira para *M. anisopliae* e *B. bassiana*;

A extração em água foi eficiente para *B. bassiana*, mas altamente deletéria para *M. anisopliae*;

A Zeolita clinoptololita foi a argila mais eficiente na manutenção da viabilidade de blastosporos de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, entretanto esses propágulos apresentaram tempo de prateleira reduzido quando armazenados em temperatura ambiente

Dos vinte surfactantes avaliados apenas o E5 = KBRAdj e E7= Tween 80 apresentam potencial para serem utilizados como agentes emulsionantes de dispersões oleosas à base de conídios de *M. anisopliae* e *B. bassiana*;

A adição de um agente dessecante, complementando a secagem de conídios e do óleo tem influência significativa na sobrevivência de conídios; A sílica gel pode ser utilizada para essa finalidade, enquanto o glicerol foi extremamente tóxico;

As vantagens da presença da sílica ficaram evidentes também em combinações de óleo de girassol na presença de emulsionantes;

A secagem prévia do óleo incrementou a sobrevivência de conídios, podendo ser uma alternativa para incrementar a sobrevivência de conídios;

As dispersões oleosas proporcionaram sobrevivência muito superior para conídios expostos à radiação UV em relação a conídios não formulados

Formulações oleosas foram mais eficientes na infecção de *T. molitor*, com reduções de até 2,3 vezes no tempo de sobrevivência.

REFERÊNCIAS

- ABREU, O.; VALARINI, P.J.; CRUZ, B.P.B.; OLIVEIRA, D.A.; GABRIEL, D. Viabilidade e patogenicidade do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., em função do período e condições de armazenamento. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 50, p. 57-63, 1983.
- ADAMEK, L. Submerge cultivation of the fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.). **Folia Microbiologica**, Praha, v. 10, p. 255-257, 1963.
- AKBAR, W.; LORD, J.C.; NECHOLS, J.R.; LOUGHIN, T.M. Efficacy of *Beauveria bassiana* for red flour beetle when applied with plant essential oils or in mineral oil and organosilicone carriers. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 98, p. 683–688, 2005.
- ALMEIDA, J.E.M.; BATISTA FILHO, A.; ALVES, S.B.; LEITE, L.G.; NEVES, P.M.J. O. Formulação de entomopatógenos na América Latina. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. (Ed.). **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba: FEALQ, 2008. cap. 10, p. 257-277.
- ALVES, R.T.; BATEMAN, R.P. Development of mycopesticides formulations and application techniques. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY, 21., 2000, Foz do Iguaçu. **Abstracts...** Londrina: Embrapa Soja, 2000. v. 1, p. 509.
- ALVES, R.T.; BATEMAN, R.P.; PRIOR, C.; LEATHER, S.R. Effects of simulated solar radiation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* in different formulations. **Crop Protection**, Guildford, v. 17, p. 675-679, 1998.
- ALVES, S.B.; PEREIRA, R.M. Produção de fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**, Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 27, p. 845-870.
- ALVES, S.B.; SILVEIRA NETO, S.; PEREIRA, R.M.; MACEDO, N. Estudo de formulações de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. em diferentes condições de armazenamento. **Ecosystema**, Espírito Santo do Pinhal, v. 12, p. 78-87, 1987.
- ANDERSEN, M.; MAGAN, N.; CHANDLER, D. A possible strategy to improve the infection of entomopathogenic fungi. In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR INVERTEBRATE PATHOLOGY, 32., 1999, Irvine. **Abstract...** Irvine: SIP, 1999. v. 1, p. 305.
- BALL, B.V.; PYE, B.J.; CARRECK, N.L.; MOORE, D.; BATEMAN, R.P. Laboratory testing of a mycopesticide on non-target organisms: the effects of an oil formulation of *Metarhizium flavoviride* applied to *Apis mellifera*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 4, p. 289–296, 1994.
- BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 53, p. 495-508, 2000.

BATEMAN, R.P.; CAREY, M.; MOORE, D.; PRIOR, C. The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations at low humidities. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 122, p. 145-152, 1993.

BATEMAN, R.P.; DOURO-KPINDOU, O.K.; KOOYMAN, C.; LOMER, C.; OUAMBAMA, Z. Some observations on the dose transfer of mycoinsecticide sprays to desert locusts. **Crop Protection**, Guildford, v. 17, p. 151-158, 1998.

BATTA, Y.A. Production and testing of novel formulations of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschinkoff) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **Crop Protection**, Guildford, v. 22, p. 415-422, 2003.

BEKER, M.J.; BLUMBERGS, J.E.; VENTINA, E.J.; RAPOPORT, A.I. Characteristics of cellular membranes at rehydration of dehydrated yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.19, p. 347-352, 1984.

BERNY, J.F.; HENNERBERT, G.L. Viability and stability of yeast cells and filamentous fungus spores during freeze-drying: effects of protectants and cooling rates. **Mycologia**, New York, v. 83, n. 6, p. 805-815, 1991.

BOUCIAS, D.G.; PENDLAND, J.C.; LATGE, J.P. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticle. **Applied Environmental Microbiology**, Lanham, v. 54, n. 7, p. 1795-1805, 1988.

BROWN, A.D. Microbial water stress. **Bacterial Review**, Oxford, v. 40, p. 803-846, 1976.

BURGES, H.D. **Formulation of microbial biopesticides**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1998. 412 p.

BURGES, H.D.; JONES, K.A. Introduction. In: BURGES, H.D. (Ed.). **Formulation of microbial biopesticides**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1998. chap. 1, p. 1-5.

BUTT, T.M.; IBRAHIM, L.; CLARK, S.J.; BECKETT, A. The germination behaviour of *Metarhizium anisopliae* on the surface of aphid and flea beetle cuticles. **Mycological Research**, Cambridge, v. 99, n. 8, p. 945-950, 1995.

CARPENTER, J. F.; CROWE, J. H. The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. **Cryobiology**, San Diego, v. 25, p. 244-255, 1988a.

_____. Modes of stabilization of proteins by organic solutes during desiccation. **Cryobiology**, San Diego, v. 25, p. 485-492, 1988b.

COLACO, C.; SEN, S.; THANGAVELU, M.; PINDER, S.; ROSER, B. Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology. **Biotechnology**, Frankfurt, v. 10, p. 1007-1001, 1992.

CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; CHAPMAN, D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. **Science**, Washington, v. 223, p. 701-703, 1984.

CROWE, J. H.; CARPENTER, J. F.; CROWE, L. M.; ANCHORDOGUY, T.L. Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. **Cryobiology**, San Diego, v. 27, p. 219-231, 1990.

CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; CARPENTER, J.F.; RUDOLPH, A.S.; WISTOM, C.A.; SPARGO, B.J.; ANCHORDOGUY, T.J. Interactions of sugars with membranes. **Biochemica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 947, p. 367-384, 1988.

DAOUST, R.A.; PEREIRA, R.M. Survival of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes: Moniliales) conidia on cadavers of cowpea pests stored outdoors and in laboratory in Brazil. **Environmental Entomology**, College Park, v. 15, p. 642-647, 1986.

DAOUST, R.A.; ROBERTS, D.W. Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia: effect of growth substrate on conidial survival and virulence against mosquitoes. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 41, p. 161-170, 1983.

DE JONGHE, K.; HERMANS, D.; HOFTE, M. Efficacy of alcohol alkoxylate surfactants differing in the molecular structure of the hydrophilic portion to control *Phytophthora nicotinae* in tomato substrate culture. **Crop Protection**, Guildford, v. 26, p. 1524-1531, 2007.

DEMEULENAERE, N.; HOFTE, M. Influence of several surfactants on various asexual stages in the life cycle of two *Phytophthora* species. In: THE BCPC CONFERENCE PROCEEDINGS – PESTS AND DISEASES, 37, 2000, Brighton. **Proceedings...** Brighton: British Crop Protection Council, 2000. v. 1, p. 257-260.

DINIZ-MENDES, L.; BERNARDES, E.; ARAUJO, P.S.; PANEK, A.D.; PASCHALIN, V.M.F. Preservation of frozen yeast cells by trehalose. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 65, n. 5, p. 572-578, 1999.

FARGUES, J.; GOETTEL, M.S.; SMITS, N.; OUEDRAOGO, A.; VIDAL, C.; LACY, L.A.; LOMER, C.J.; ROUGIER, M. Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic Hyphomycetes. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 135, p. 171-181, 1996.

FARGUES, J.; VEY, A. Modalités d'infection des larves de *Leptinotarsa decemlineata* para *Beuaveria bassiana* au cours de la mue. **Entomophaga**, Paris, v. 19, n. 3, p. 311-323, 1974.

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

FARIA, M.; HAJEK, A.E.; WRAIGHT, S.P. Imbibitional damage in conidia of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium acridum* and *Metarhizium anisopliae*. **Biological Control**, Orlando, v. 51, p. 346-354, 2009.

GARETH, T. **Medicinal chemistry**: an introduction. West Sussex: Wiley, 2000. 200 p.

HALLSWORTH, J.E.; MAGAN, N. Effect of carbohydrate type and concentration on polyhydroxy alcohol and trehalose content of conidia of three entomopathogenic fungi. **Microbiology**, Reading, v. 140, p. 2705-2713, 1994.

HALLSWORTH, J.E.; MAGAN, N. Manipulation of intracellular glycerol and erythritol enhances germination of conidia at low water availability. **Microbiology**, Reading, v. 141, p. 1109-1115, 1995.

HEDGECOCK, S.; MOORE, D.; HIGGINS, P.M.; PRIOR, C. Influence of moisture content on temperature tolerance and storage of *Metarhizium flavoviride* conidia in an oil formulation. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 5, p. 371-377, 1995.

HEDIMBI, M.; KAAYA, G.P.; SINGH, S.; CHIMWAMUROMBE, P.M.; GINDIN, G.; GLAZER, I.; SAMISH, M. Protection of *Metarhizium anisopliae* conidia from ultra-violet radiation and their pathogenicity to *Rhipicephalus evertsi evertsi* ticks. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 46, p. 149-156, 2008.

HONG, T.D.; ELLIS, R.H.; MOORE, D. Development of a model to predict the effect of temperature and moisture on fungal spore longevity. **Annals of Botany**, London, v.79, p. 121-128, 1997.

HONG, T.D.; JENKINS, N.E.; ELLIS, R.H. The effects of duration of development and drying regime on the longevity of conidia of *Metarhizium flavoviride*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, n. 6, p. 662-665, 2000.

HONG, T.D.; JENKINS, N.E.; ELLIS, R.H.; MOORE, D. Limits to the negative logarithmic relationship between moisture content and longevity in conidia of *Metarhizium flavoviride*. **Annals of Botany**, London, v. 81, p. 625-630, 1998.

HUNT, T.R.; MOORE, D.; HIGGINS, P.M.; PRIOR, C. Effect of sunscreens, irradiance and resting periods on the germination of *Metarhizium flavoviride* conidia. **Entomophaga**, Paris, v. 39, n.3, p. 313-322, 1994.

IGNOFFO, C.M. Environmental factors affecting persistence of entomopathogens. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 75, n. 4, p. 516-524, 1992.

IGNOFFO, C.M.; GARCIA, C. UV-photoinactivation of cells and spores of *Bacillus thuringiensis* and effects of peroxidase on inactivation. **Environmental Entomology**, College Park, v. 7, n. 2, p. 270-272, 1978.

INGLIS, G.D.; GOETTEL, M.S.; JOHNSON, D.L. Influence of ultraviolet light protectants on persistence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. **Biological Control**, Orlando, v. 5, p. 581-590, 1995.

INGLIS, G.D.; IVIE, T.J.; DUKE, G.M.; GOETTEL, M.S. Influence of rain and conidial formulation on persistence of *Beauveria bassiana* on potato leaves and Colorado potato beetle larvae. **Biological Control**, Orlando, v. 18, p. 55–64, 2000.

INYANG, E.N.; MCCARTNEY, A.; OYEJOLA, B.; IBRAHIM, L.; PYE, B.J.; ARCHER, S.A.; BUTT, T.M. Effect of formulation, application and rain on the persistence of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* on oilseed rape. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, p. 653-661, 2000.

JACKSON, M.A. **Method for producing desiccation tolerant *Paecilomyces fumosoroseus* spores**. U.S. Patent #5,968,808. Oct. 19, 1999.

JACKSON, M.A.; DUNLAP, C.A.; JARONSKI, S.T. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. **Biocontrol**, Dordrecht, v. 55, p. 129-145, 2010.

JACKSON, M.A.; MCGUIRE, M.R.; LACEY, L.A.; WRAIGHT, S.P. Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 101, p. 35-41, 1997.

JENKINS, N.E.; THOMAS, M.B. Effect of formulation and application method on the efficacy of aerial and submerged conidia of *Metarhizium flavoviride* for locust and grasshopper control. **Pesticide Science**, Oxford, v. 46, p. 229-306, 1996.

JIN, X.; GRIGAS, K.E.; JOHNSON, C.A.; PERRY, P.; MILLER, D.W. **Method for storing fungal conidia**. US Patent 5,989,898, 1999.

JONES, K.A.; BURGESS, H.D. Technology of formulation and application. In: BURGESS, H.D. (Ed). **Formulation of microbial biopesticides**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1998. chap. 2, p. 7-30.

KAPLAN, E.L.; MEIER, P. Nonparametric estimation from incomplete observations. **Journal of the American Statistical Association**, New York, v. 53, p. 457–481, 1958.

KIM, J.S.; JE, Y.H.; WOO, E.O.; PARK, J.S. Persistence of *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) SFP-198 conidia in corn oil-based suspension. **Mycopathology**, London, v. 171, p. 67–75, 2011.

KLEESPIES, R.G.; ZIMMERMAN, G. Effect of additives on the production, viability and virulence of blastospores of *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 4, p. 309-319, 1994.

KROGH, K. A.; HALLING-SORENSEN, B.; MOGENSEN, B.B.; VEJRUP, K.V. Environmental properties and effects of nonionic surfactant adjuvants in pesticides: a review. **Chemosphere**, Oxford, v. 50, p. 871-901, 2003.

KRUEGER, S.R.; VILLANI, M.G.; MARTINS, A.S.; ROBERTS, D.W. Efficacy of soil applications of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin conidia, and standard and lyophilized mycelial particles against scarab grubs. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 59, p. 54-60, 1992.

LACEY, L.A.; FRUTOS, R.; KAYA, H.K.; VAIL, P. Insect pathogens as biological control agents: do they have a future? **Biological Control**, Orlando, v. 21, p. 230-248, 2001.

LESLIE, S.B.; ISRAELI, E.; LIGHTHART, B.; CROWE, J.H.; CROWE, L.M. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. **Applied Environment Microbiology**, Lanham, v. 61, n. 10, p. 3592-3597, 1995.

LEVITZ, P.E. Non-ionic surfactants adsorption: structure and thermodynamics. **Geoscience**, Washington, v. 334, p. 665-673, 2002.

LI, Z.; ALVES, S.B.; ROBERTS, D.W.; FAN, M.; DELALIBERA JR., I.; TANG, J.; LOPES, R.B.; FARIA, M.; RANGEL, D.E.N. Biological control of insects in Brazil and China: history, current programs and reasons for their success using entomopathogenic fungi. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 20, p. 117–136, 2010.

LODATO, P.; HUERGO, M.S.; BUERA, M.P. Viability and thermal stability of a strain of *Saccharomyces cerevisiae* freeze-dried in different sugar and polymer matrices. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 52, p. 215-220, 1999.

LOPES, R.B.; PAULI, G.; MASCARIN, G.M.; FARIA, M. Protection of entomopathogenic conidia against chemical fungicides afforded by an oil-based formulation. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 21, p. 125–137, 2011.

MAGALHÃES, B.P.; FRAZÃO, H.S. Effects of temperature, water content and substrate on conidial production of *Metarhizium flavoviride*. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 27, p. 242-246, 1996.

MALINA, A.; SHAI, Y. Conjugation of fatty acids with different lengths modulates the antimicrobial and antifungal activity of a cationic biologically inactive peptide. **Biochemistry Journal**, London, v. 390, p. 695-702, 2005.

MALSAM, O.; KILIAN, M.; OERKE, E.C.; DEHNE, H.W. Oils for increased efficacy of *Metarhizium anisopliae* to control whiteflies. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 12, p. 337-348. 2002.

MARQUES, E.J. **Efeitos de formulações na preservação de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. sob diferentes condições de armazenamento.** 1993. 146 p. Tese (Doutorado em Entomologia)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1993.

MASCARIN, G.M.; PAULI, G. Bioprodutos à base de fungos entomopatogênicos. In: VENZON, M.; JUNIOR, T.J.P.; PALLINI, A. (Ed.). **Controle alternativo de pragas e doenças na agricultura orgânica.** Viçosa: EPAMIG-ZM, 2010. v. 1, cap. 9, p. 169-196.

MASCARIN, G.M.; KOBORI, N.N.; QUINTELA, E.D.; ARTHURS, S.P.; DELALIBERA JR., I. Toxicity of non-ionic surfactants and interactions with fungal entomopathogens toward *Bemisia tabaci* biotype B. **BioControl**, Dordrecht, v. 59, p. 111-123, 2014.

McCLATCHIE, G.; MOORE, D.; BATEMAN, R.P.; PRIOR, C. Effects of temperature on the viability of the conidia of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations. **Mycological Research**, Cambridge, v. 98, p. 749-756, 1994.

MICHEREFF FILHO, M.; FARIA, M.; WRAIGHT, S.P.; SILVA, K.F.A.S. Micoínseticidas e micoacaricidas no Brasil: como estamos após 4 décadas? **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, p. 769–779, 2009.

MOORE, D.; LANGEWALD, J.; OBOGON, F. Effects of rehydration on the conidial viability of *Metarhizium flavoviride* mycopesticide formulations. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 7, p. 87-94, 1997.

MOORE, D.; BATEMAN, R.P.; CAREY, M.; PRIOR, C. Long term storage of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations for the control of locusts and grasshoppers. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 5, p. 193-199, 1995.

MOORE, D.; DOURO-KPINDOU, O.K.; JENKINS, N.E.; LOMER, C.J. Effect of the moisture content and temperature on storage of *Metarhizium flavoviridae* conidia. **Biocontrol Science and Techonology**, Oxford, v. 6, p. 51-661, 1996.

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

OLIVEIRA, D.G.P. **Proposta de um protocolo para avaliação da viabilidade de conídios de fungos entomopatogênicos e determinação da proteção ao calor conferida a *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* pela formulação em óleo emulsionável.** 2009. 89 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

OROS, G.; CSERHATI, T.; VRBANOVÁ, A. Relationship between the physicochemical parameters and biological activity of sulfosuccinic acid Ester surfactants. **Biochemistry Molecular Biology International**, Marrickville, v. 47, p. 79-88, 1999.

POLAR, P.; KAIRO, M.T.K.; MOORE, D.; PEGRAM, R.; JOHN, S.A. Comparison of water, oils and emulsifiable adjuvant oils as formulating agents for *Metarhizium anisopliae* for use in control of *Boophilus microplus*. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 160, p. 151-157, 2005.

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

R DEVELOPMENT CORE TEAM: versão 3.0.3. Vienna, 2005. Disponível em: <<http://www.r-project.org>>. Acesso em: 05 jan. 2014.

RAMOSKA, W.A. The influence of relative humidity on *Beauveria bassiana* infectivity and replication in the chinch bug, *Blissus leucopterus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 43, p. 389-394, 1984.

SANDHU, S.S.; RAJAK, R.C.; AGARWAL, G.P. Studies on prolonged storage of *Beauveria bassiana* conidia: effects of temperature and relative humidity on conidia viability and virulence against chickpea borer, *Helicoverpa armigera*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 3, p. 47-53, 1993.

SANDOVAL-CORONADO, C.F.; LUNA-OLIVERA, H.A.; AREVALO-NIÑO, K.; JACKSON, M.A.; POPRAWSKI, T.J.; GALÁN-WONG, L.J. Drying and formulation of blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* (Hyphomycetes) produced in two different liquid media. **World Journal of Microbiology e Biotechnology**, Oxford, v. 17, p. 423-428, 2001.

SANTOS, P.S.; SILVA, M.A.Q.; MONTEIRO, A.C.; GAVA, C.A.T. Selection of surfactant compounds to enhance the dispersion of *Beauveria bassiana*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 22, n. 3, p. 281-292, 2012.

SAWYER, A.J.; RAMOS, M.E.; POPRAWSKI, T.J.; SOPER, R.S.; CARRUTHERS, R.I. Seasonal patterns of cadaver persistence and sporulation by the fungal pathogen *Entomophaga grylli* (Fresenius) Batko (Entomophthorales: Entomophthoraceae) infecting *Camnula pellucida* (Scudder) (Orthoptera: Acrididae). **Memoirs of the Entomological Society of Canada**, Ottawa, v. 171, p. 355-374, 1997.

SCHMIDT, F.G.V.; SILVA, J.B.T.; FARIA, M.R.; MAGALHÃES, B.P.; ALVES, R.T.; LECOQ, M. Metodologia de aplicação do fungo *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* para o controle do gafanhoto *Rhammatocerus schistocercoides* em campo. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília, v. 1616, n. 208, p. 1-11, dez. 2007.

SHAH, P.A.; DOURO-KPINDOU, O.K.; SIDIBE, A.; DAFPE, C.O.; VAN DER PAUW, H.; LOMER, C.J. Effects of the sunscreen oxybenzone on field efficacy and persistence of *Metarhizium flavoviride* conidia against *Kraussella amabile* (Orthoptera: Acrididae) in Mali, West Africa. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 8, p. 357-364, 1998.

SHANLEY, R.P.; KEENA, M.; WHEELER, M.M.; LELAND, J.; HAJEK, A.E. Evaluating the virulence and longevity of non-woven fiber bands impregnated with *Metarhizium anisopliae* against the Asian longhorned beetle, *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae). **Biological Control**, Orlando, v. 50, p. 94-102, 2009.

SPRENKEL, R.K.; BROOKS, W.M. Winter survival of the entomogenous fungus *Nomuraea rileyi* in North Carolina. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 29, p. 262-266, 1977.

STANGHELINI, M.E.; KIM, D.H.; RASMUSSEN, S.L.; RORABAUGH, P.A. Efficacy of nonionic surfactants in the control of zoospore spread of *Pythium aphanidermatum* in a recirculating system hydroponic system. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 80, p. 422-428, 1996a.

_____. Control of root rot of peppers caused by *Phytophthora capsici* with a nonionic surfactant. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 80, p. 1113-1116, 1996b.

STANGHELINI, M.E.; NIELSEN, C.J.; KIM, D.H.; RASMUSSEN, S.L.; RORABAUGH, P.A. Influence of sub- versus top-irrigation and surfactants in a recirculating system on disease incidence caused by *Phytophthora spp* in potted pepper plants. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, p. 1147-1150, 2000.

TAN, C.S.; VAN INGEN, C.W.; TALSMA, H.; VAN MILTERNBURG, J.C.; STEFFENSEN, C.L.; VLUG, I.J.A.; STALPERS, J.A. Freeze-drying fungi: influence of composition and glass transition temperature of the protectant. **Cryobiology**, San Diego, v. 32, p. 60-67, 1995.

THOMAS, M.B.; GBONGBOUI, C.; LOMER, C.J. Between-season survival of the grasshopper pathogen *Metarhizium anisopliae* in the Sahel. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 6, p. 569-573, 1996.

VAN VALKENBURG, J.W. Terminology, classification and chemistry. In: HODGON, H.H. **Adjuvants for herbicides**. Illinois: The Weed Science Society of America, 1982, p. 1-9.

WRIGHT, S.P.; RAMOS, M.E. Application parameters affecting field efficacy of *Beauveria bassiana* foliar treatments against Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*. **Biological Control**, Orlando, v. 23, p. 164-178, 2002.

WRIGHT, S.P.; JACKSON, M.A.; KOCK, S.L. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. In: BUTT, T.M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. (Ed.). **Fungi as biocontrol agents**. Wallingford: CAB International, 2001. chap. 10, p. 253-287.

ANEXOS

Anexo A – Estabilidade de blastosporos de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* formulados em diferentes inertes sólidos

Para *B. bassiana* o tratamento controle causou mortalidade total dos blastosporos já na primeira avaliação e como não houve variância na taxa de viabilidade, não foi possível incluir esse tratamento na análise estatística (Figura A.1). As estimativas dos parâmetros do preditor linear estão apresentadas na Tabela A.1.

Tabela A.1 - Estimativas e desvios dos parâmetros do preditor linear do modelo beta binomial proposto para formulações de blastosporos de *Beauveria bassiana*

Coeficientes	Estimativa	Desvio padrão
CAULIM	2,2910000	0,0000383
TALCO	2,7850000	0,0000460
ZEOL4A	0,9289000	0,0000563
ZEOLITA	3,1000000	0,0000464
Temperatura	- 0,0429000	0,0000013
Tempo	- 0,0240700	0,0000004

Figura A.1 - Dispersão das proporções de viabilidade dos tratamentos com blastosporos de *Beauveria bassiana* formulados em diferentes argilas ou mantidos em suspensão líquida (controle)

Figura A.2 – Dispersão dos dados dos tratamentos com blastosporos de *Beauveria bassiana* formulados em diferentes argilas ou mantidos em suspensão líquida (controle) e ajuste do modelo (azul) quando armazenados a 4 e 26°C.

Tabela A.2 - Teste da razão de verossimilhança para verificar a diferença entre os tratamentos de *Beauveria bassiana* em diferentes argilas

Testes	Valor-p
Caulim x Zeol4A	<0,001
Caulim x Talco	<0,001
Talco x Zeolita	<0,001

Para *M. anisopliae* os tratamentos com as argilas Zeolita 4 A e Talco (Figura A.3) causaram mortalidade total dos conídios já na primeira avaliação e como não houve variância na taxa de viabilidade, não foi possível incluir esses tratamentos na análise estatística. As estimativas e desvios dos parâmetros do preditor linear são apresentados na Tabela A.2.

Figura A.3 - Dispersão das proporções de viabilidade dos tratamentos com blastosporos de *Metarhizium anisopliae* em formulados em diferentes argilas ou mantidos em suspensão líquida (controle)

Tabela A.3 - Estimativas e desvios dos parâmetros do preditor linear do modelo beta binomial proposto para formulações de blastosporos de *Metarhizium anisopliae*

Coefficientes	Estimativa	Desvio padrão
CAULIM	2,605	0,0004710
Controle	3,089	0,0004061
ZEOLITA	3,278	0,0006235
Temperatura	-0,105	0,0000142
Tempo	-0,053	0,0000075

Figura A.4 - Dispersão dos dados dos tratamentos com blastosporos de *Metarhizium anisopliae* formulados em diferentes argilas ou mantidos em suspensão líquida (controle) e ajuste do modelo (azul) quando armazenados a 4 e 26°C

Tabela A.4 - Teste da razão de verossimilhança para verificar a diferença entre os tratamentos de *Metarhizium anisopliae* em diferentes argilas

Testes	Valor-p
Zeolita x Controle	<0,001
Controle x Caulim	<0,001

Anexo B - Comparação de metodologias para a extração de conídios

Para *B. bassiana* o preditor linear resultante foi:

$$\text{logit}(p) = \beta_0 + \beta_1 \text{AF} + \beta_2 \text{EP} + \beta_3 \text{Óleo(N)} + \beta_4 \text{Tempo} + \beta_5 \text{AF:Óleo(N)} + \beta_6 \text{EP:Óleo(N)}$$

As estimativas dos parâmetros do modelo são apresentadas pela Tabela B.1.

Tabela B.1- Estimativas e desvios dos parâmetros do modelo beta binomial proposto para a viabilidade de *Beauveria bassiana*

Coeficientes	Estimativa	Desvio padrão
β_0	2,66	0,33
AF	0,02	0,32
EP	0,18	0,32
Óleo ausente (N)	-0,42	0,33
Tempo(dias)	-0,04	0,003
AF:óleo ausente (N)	-0,20	0,47
EP:óleo ausente (N)	-1,11	0,46
ϕ	0,33	0,03

Figura B.1 – Dispersão dos dados dos tratamentos de *Beauveria bassiana* submetidos a diferentes processos de extração e armazenados na forma de conídios puros, arroz mais fungo e dispersões em óleo de girassol

Tabela B.2- Teste da razão de verossimilhança para verificar a diferença entre os tratamentos com *Beauveria bassiana* para cada nível de óleo

Teste	valor-p
AF com óleo x Af sem óleo	0,062
EP com óleo x EP sem óleo	0,018
Lav com óleo x Lav sem óleo	<0,001
AF com óleo x Ep com óleo x Lav com óleo	0,808
AF sem óleo x Ep sem óleo x Lav sem óleo	0,013
Ep sem óleo x Lav sem óleo	0,006
AF sem óleo x Lav sem óleo	0,602
AF sem óleo x Ep sem óleo	0,029

Para *M. anisopliae* o preditor linear resultante foi:

$$\text{logit}(p) = \beta_0 + \beta_1 \text{AF} + \beta_2 \text{EP} + \beta_3 \text{Óleo(N)} + \beta_4 \text{Tempo}$$

As estimativas dos parâmetros do modelo são apresentadas pela Tabela B.3.

Tabela B.3 - Estimativas e desvios dos parâmetros do modelo beta binomial proposto para viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae*

Coeficientes	Estimativa	Desvio padrão
β_0	-0,07	0,24
AF	3,12	0,23
EP	2,31	0,22
Óleo ausente (N)	-0,68	0,16
Tempo(dias)	-0,04	0,003
φ	0,17	0,01

Tabela B4 - Teste da razão de verossimilhança para verificar a diferença entre os tratamentos de *Metarhizium anisopliae* para cada nível de óleo

Teste	valor-p
AF com óleo x Af sem óleo	0,009
EP com óleo x EP sem óleo	0,459
Lav com óleo x Lav sem óleo	<0,001
AF com óleo x Ep com óleo x Lav com óleo	<0,001
Ep sem óleo x Lav sem óleo	<0,001
AF sem óleo x Lav sem óleo	<0,001
AF sem óleo x Ep sem óleo	0,045
AF sem óleo x Ep sem óleo x Lav sem óleo	<0,001
Ep sem óleo x Lav sem óleo	<0,001
AF sem óleo x Lav sem óleo	<0,001
AF sem óleo x Ep sem óleo	<0,001

Figura B.2 – Dispersão dos dados dos tratamentos de *Metarhizium anisopliae* submetidos a diferentes processos de extração e armazenados na forma de conídios puros, arroz mais fungo e dispersões em óleo de girassol

Anexo C - Ensaio de Atividade de água e escola do óleo vegetal

C.1. *Beauveria bassiana*

Figura C.1.1 - Estimativas dos parâmetros das covariáveis óleo e tempo do preditor linear do modelo para *Beauveria bassiana*

Tabela C.1.1 - Estimativas dos parâmetros do preditor linear e dispersão do modelo beta binomial estimado para *Beauveria bassiana*

Coeficientes	Preditor Linear		Parâmetro de dispersão	
	Estimativa	Desvio Padrão	Estimativa	Desvio Padrão
Tempo	-0,038	0,0001	0,018	0,0001
Secagem 0	5,585	0,6152	1,396	0,9714
Secagem 1	5,073	0,6171	2,005	0,9719
Secagem 2	6,017	0,6112	0,392	0,9718
Secagem g1	6,478	0,6112	-0,913	0,9703
temperatura	-0,135	0,0213	-0,093	0,0344
Óleo S	0,877	0,8443	-2,276	1,3601
Óleo T	-14,86	1,0195	21,856	1,4679
Temperatura*óleo S	-0,030	0,0298	0,0793	0,0486
Temperatura*óleo T	0,5311	0,0349	-0,7785	0,0521

Figura C.1.2 – Dispersão dos dados de viabilidade de conídios de *Beauveria bassiana* dos tratamentos com óleo de girassol e ajuste do modelo (azul) armazenados a 26 e 30°C

Figura C.1.3 – Dispersão dos dados de viabilidade de conídios de *Beauveria bassiana* dos tratamentos com conídios puros e ajuste do modelo (azul) armazenados a 26 e 30°C

Figura C.1.4 – Dispersão dos dados de viabilidade de conídios de *Beauveria bassiana* dos tratamentos com óleo de soja e ajuste do modelo (azul) armazenados a 26 e 30°C

Tabela C.1.2 - Testes da razão de verossimilhança para verificar a diferença das curvas considerando a temperatura igual 26°C

Teste	valor-p
secagem=1 óleo=T x secagem=0 óleo=T	<0,001
secagem=2 óleo=S x secagem=2 óleo=G	0,156
secagem=g1 óleo=G x secagem=2 óleo=G	<0,001
secagem=g1 óleo=G x secagem=g1 óleo=S	0,031

Tabela C.1.3 - Testes da razão de verossimilhança para verificar a diferença das curvas considerando a temperatura igual 30°C.

Teste	valor-p
secagem=1 óleo=S x secagem=1 óleo=G	0,372
secagem=0 óleo=T x secagem=2 óleo=T	0,73
secagem=0 óleo=T x secagem=g1 óleo=T	0,271

C.2. *Metarhizium anisopliae*

Os coeficientes dos parâmetros relacionados à covariável óleo e temperatura são apresentados na Figura C.2.1.

Figura C.2.1 - Estimativas dos parâmetros das covariável óleo e tempo do preditor linear do modelo escolhido para *Metarhizium anisopliae*

É possível observar que o efeito causado pela covariável óleo foi muito pequeno (Figura C.2.1), e o teste apontou que a covariável “óleo” não deveria fazer parte do modelo, como apresentado na Tabela C.2.1.

Tabela C.2.1 - Teste da razão de verossimilhança para verificar a inclusão da covariável “óleo” no modelo

Teste	valor-p
Modelo nulo x Modelo com fator óleo	0,106

As estimativas dos parâmetros para o preditor linear e para o parâmetro de dispersão são apresentadas na Tabela C.2.1.

Tabela C.2.2 - Estimativas dos parâmetros do preditor linear e dispersão do modelo beta binomial estimado para *Metarhizium anisopliae*

Coeficientes	Preditor linear		Parâmetro de dispersão	
	Estimativa	Desvio Padrão	Estimativa	Desvio Padrão
Tempo	-0,044	0,0001	0,009	0,001
Secagem 4	6,799	0,3520	1,555	0,650
Grupo 1	5,207	0,3516	4,725	0,643
Grupo 2	6,355	0,3503	2,303	0,646
temperatura	-0,135	0,0119	-0,191	0,022

Figura C.2.2 – Dispersão dos dados de *Metarhizium anisopliae* nos tratamentos com conídios puros e ajuste do modelo (azul) armazenados a 26 e 30°C

Figura C.2.3 – Dispersão dos dados de *Metarhizium anisopliae* nos tratamentos com óleo de girassol e ajuste do modelo (azul) armazenados a 26 e 30°C

Figura C.2.4 – Dispersão dos dados de *Metarhizium anisopliae* nos tratamentos com óleo de soja e ajuste do modelo (azul) armazenados a 26 e 30°C

Tabela C.2.3 - Testes da razão de verossimilhança para verificar a diferença das curvas considerando a temperatura igual 26°C.

Teste	valor-p
g1 x g2	<0,001
g2 x secagem 4	<0,001

Tabela C.2.4 - Testes da razão de verossimilhança para verificar a diferença das curvas considerando a temperatura igual 30°C.

Teste	valor-p
g1 x g2	<0,001
g2 x secagem 4	0,056

Anexo D - Compatibilidade de emulsionantes puros diretamente misturados aos conídios

Em análise preliminar verificou-se que para *B. bassiana* os tratamentos 6 e 10 não causaram variação na taxa de viabilidade conforme apresentado na Figura D.1, e foram retirados da análise estatística

Figura D.1 – Análise preliminar da viabilidade de conídios de *Beauveria bassiana* em combinações com 20 emulsionantes e armazenados a 26°C

Com os grupos formados para *B. bassiana*, foi necessária a construção de outro modelo beta binomial (Figura D.2) com função de ligação “logit”. As estimativas dos parâmetros do preditor linear e do parâmetro de dispersão são apresentadas na Tabela D.1.

Tabela D.1 - Estimativas e desvios dos parâmetros do preditor linear e dispersão do modelo beta binomial proposto para conídios de *Beauveria bassiana*

Coeficientes	Preditor linear		Parâmetro de dispersão	
	Estimativa	Desvio padrão	Estimativa	Desvio padrão
g1	-0,51	0,15	-1,52	0,22
g2	-0,24	0,15	-1,92	0,25
g3	0,15	0,14	-0,34	0,16
g4	0,61	0,12	-1,09	0,16
g5	1,40	0,13	-1,57	0,21
t5	4,35	0,18	-2,02	0,30
t7	2,92	0,14	-2,53	0,29
t8	1,79	0,08	-4,66	0,54
t9	0,90	0,19	-1,57	0,29
Tempo	-0,04	0,001	-0,0004	0,002

Figura D.2 - Dispersão dos dados dos tratamentos com conídios de *Beauveria bassiana* em combinações com 20 emulsionantes e armazenados a 26°C

Tabela D.2 - Teste da razão de verossimilhança para as diferenças de tratamentos e grupos do modelo para *Beauveria bassiana*

Teste	valor-p	Teste	valor-p
g1 x g2	0,896	g4 x g5	0,001
g1 x g3	0,500	t9 x g5	0,704
g1 x g4	<0,001	t9 x t8	0,040
g2 x g3	0,987	g5 x t8	0,596
g2 x g4	0,067	g5 x t7	<0,001
g2 x t9	0,037	t8 x t7	0,291
g3 x g4	0,030	t8 x t5	<0,001
g4 x t9	0,909	t7 x t5	0,074

Em uma análise preliminar verificou-se que para *M. anisopliae* os tratamentos 2, 3, 6, 7, 10, 12, 15 e 20 não causaram variação na taxa de viabilidade conforme apresentado na Figura D.3, e dessa forma foram retirados da análise estatística.

Figura D.3 - Análise preliminar da viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae* em combinações com 20 emulsionantes e armazenados a 26°C.

Com os grupos formados para *M. anisopliae*, foi necessária a construção de outro modelo beta binomial com função de ligação “logit”. As estimativas dos parâmetros do preditor linear e do parâmetro de dispersão são apresentadas na Tabela D.3.

Tabela D.3 - Estimativas e desvios dos parâmetros do preditor linear do modelo beta binomial proposto para viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae*

Coeficientes	Estimativa	Desvio padrão
β_0	0,39	0,20
t13	-1,84	0,37
t17	-0,13	0,26
t5	2,77	0,29
t8	1,28	0,25
g1	-0,86	0,22
g2	-1,44	0,25
Controle(t)	1,46	0,22
Tempo	-0,04	0,002

Figura D.4 - Dispersão dos dados dos tratamentos com conídios de *Metarhizium anisopliae* em combinações com 20 emulsionantes e armazenados a 26°C

Tabela D.4 - Teste da razão de verossimilhança para as diferenças de tratamentos e grupos do modelo

Teste	valor-p	Teste	valor-p
t13 x g2	0,94	t17 x t11	0,992
t13 x g1	0,114	t17 x t8	<0,001
t13 x t17	<0,001	t11 x t8	<0,001
g2 x g1	0,203	t8 x Controle	0,97
g2 x t17	<0,001	t8 x t5	<0,001
g1 x t17	0,13	Controle x t5	<0,001
g1 x t11	0,029		

Anexo E - Estabilidade de formulações oleosas contendo emulsionantes

Em análise preliminar verificou-se para *B. bassiana* que os tratamentos 2, 3, 6, 9, 12 e 15 não causaram variação na taxa de viabilidade conforme apresentado na Figura E.1, tornando-se necessário a retirada desses tratamentos da análise.

Figura E.1 - Análise preliminar da viabilidade de conídios de *Beauveria bassiana* em combinações com 20 emulsionantes em óleo de girassol.

Após o agrupamento dos tratamentos com *B. bassiana* as estimativas dos parâmetros do preditor linear e do parâmetro de dispersão são apresentadas na Tabela E.1.

Tabela E.1 - Estimativas e desvios dos parâmetros do preditor linear do modelo beta binomial proposto para viabilidade de conídios de *Beauveria bassiana*

Coeficientes	Preditor linear		Parâmetro de dispersão	
	Estimativa	Desvio padrão	Estimativa	Desvio padrão
g1	4,81	0,38	-4,14	0,91
g2	5,26	0,37	-4,13	0,81
g3	7,03	0,36	-3,62	0,80
g4	8,07	0,36	-4,00	0,81
g5	8,64	0,35	-5,08	0,81
g6	9,42	0,36	-6,35	0,83
t10	2,32	0,61	-5,42	1,14
t16	3,76	0,46	-4,71	0,91
t4	5,76	0,36	-4,70	0,82
Temperatura	-0,24	0,01	0,44	0,02
Secagem (2)	-0,13	0,04	0,02	0,10
Tempo	-0,06	0,002	0,04	0,003

Os ajustes dos modelos para o nível o primeiro nível de secagem de conídios estão representados na figura E.2 e para para o segundo nível de secagem de conídios na Figura E.3.

Figura E.2 – Dispersão dos dados dos tratamentos com conídios de *Beauveria bassiana* com o primeiro nível de secagem em combinações com 20 emulsionantes em óleo vegetal e armazenados a 26°C e 30°C

Figura E.3 – Dispersão dos dados dos tratamentos com conídios de *Beauveria bassiana* com o segundo nível de secagem em combinações com 20 emulsionantes em óleo vegetal e armazenados a 26°C e 30°C

Tabela E.2 - Teste da razão de verossimilhança para as diferenças de tratamentos e grupos do modelo de *Beauveria bassiana*. Secagem 1 a 26 e 30°C e Secagem 2 a 26 e 30°C

Secagem 1 26°C		Secagem 1 30°C		Secagem 2 26°C		Secagem 2 30°C	
Teste	Valor-p	Teste	Valor-p	Teste	Valor-p	Teste	Valor-p
t10 x t16	<0,001	t10 x t16	0,659	t10 x t16	0,031	t10 x t16	0,032
g1 x t16	0,529	t10 x g1	0,316	t16 x g1	0,018	t16 x g1	0,044
g2 x t16	0,064	t10 x g2	0,299	g1 x g2	0,111	g1 x g2	0,118
t4 x t16	<0,001	g1 x t16	0,025	g1 x t4	0,034	g1 x t4	0,001
g3 x g4	<0,001	g3 x g4	<0,001	g3 x g4	0,031	g3 x g4	<0,001
g4 x g5	<0,001	g4 x g5	0,001	g4 x g5	<0,001	g4 x g5	<0,001
g5 x g6	<0,001	g5 x g6	<0,001	g5 x g6	<0,001	g5 x g6	<0,001

Em análise preliminar verificou-se para *M. anisopliae* que os tratamentos 2, 6, 9, 10 e 14 não causaram variação na taxa de viabilidade conforme apresentado na Figura E.4, tornado-se necessário a retirada da análise estatística.

Figura E.4 - Análise preliminar da viabilidade de conídios de *Beauveria bassiana* em combinações com 20 emulsionantes em óleo de girassol

Após o agrupamento dos tratamentos com *M. anisopliae* as estimativas dos parâmetros do preditor linear e do parâmetro de dispersão são apresentadas na Tabela E.3.

Tabela E.3 - Estimativas e desvios dos parâmetros do preditor linear do modelo beta binomial proposto para viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae*

Coeficientes	Preditor Linear		Parâmetro de dispersão	
	Estimativa	Desvio padrão	Estimativa	Desvio padrão
g1	5,99	0,25	-7,48	0,76
g2	6,40	0,25	-7,56	0,76
g3	6,57	0,25	-6,99	0,76
g4	7,22	0,25	-8,08	0,77
t1	6,70	0,26	-7,26	0,78
t15	4,65	0,33	-7,08	0,81
t18	5,29	0,31	-6,78	0,79
t3	4,21	0,35	-7,27	0,83
t5	7,47	0,25	-9,13	0,79
t7	7,71	0,25	-10,66	0,84
Controle	8,18	0,25	-10,18	0,82
Temperatura	-0,23	0,008	0,16	0,026
Secagem (2)	-0,57	0,03	-0,12	0,10
Tempo	-0,05	0,001	0,02	0,002

Os ajustes dos modelos para o nível o primeiro nível de secagem de conídios estão representados na figura E.5 e para para o segundo nível de secagem de conídios na Figura E.6.

Figura E.5 – Dispersão dos dados dos tratamentos com conídios de *Metarhizium anisopliae* com o primeiro nível de secagem em combinações com 20 emulsionantes em óleo vegetal e armazenados a 26°C e 30°C

Figura E.6 – Dispersão dos dados dos tratamentos com conídios de *Metarhizium anisopliae* com o segundo nível de secagem em combinações com 20 emulsionantes em óleo vegetal e armazenados a 26°C e 30°C

Tabela E.4 - Teste da razão de verossimilhança para as diferenças de tratamentos e grupos do modelo de *Beauveria bassiana*. Secagem 1 a 26 e 30°C e Secagem 2 a 26 e 30°C

Secagem 1 26°C		Secagem 1 30°C		Secagem 2 26°C		Secagem 2 30°C	
Teste	valor-p	Teste	valor-p	Teste	valor-p	Teste	valor-p
t3 x t15	0,029	t3 x t15	0,999	t3 x t15	0,018	t3 x t15	<0,001
t15 x t18	<0,001	t3 x t18	<0,001	t15 x t18	0,427	t15 x t18	0,230
t18 x g1	0,002	t15 x t18	0,004	t15 x g1	0,02	t15 x g1	<0,001
g4 x t5	0,078	g2 x g1	<0,001	g4 x t5	0,0185	g4 x t5	0,002
g4 x t7	<0,001	g4 x t5	<0,001	t5 x t7	0,192	t5 x t7	0,072
t5 x t7	<0,001	t5 x t7	0,736	t5 x controle	<0,001	t5 x controle	0,1176
t7 x controle	0,046	t5 x controle	<0,001	t7 x controle	<0,001		
		t7 x controle	<0,001				

Anexo F - Efeito da adição de dessecantes no tempo de prateleira de conídios formulados em óleo vegetal

Anexo F.1. Ensaio 1

Para *B. bassiana* os tratamentos com conídios provenientes da secagem 1 e combinados as três concentrações de Glicerol (1, 3 e 5%) causaram mortalidade total dos conídios já na primeira avaliação e como não houve variância na taxa de viabilidade, não foi possível incluir esses tratamentos na análise estatística (Fig. F.1.1).

Figura F.1.1 - Análise preliminar das taxas de viabilidade por tratamento para *Beauveria bassiana*

O modelo escolhido para representar as proporções de viabilidade de *B. bassiana* foi o binomial com função de ligação “logit” para o preditor linear. Como o dessecante controle não possui os mesmos níveis de concentração que os dessecantes Sil e Gli optou-se não realizar a análise de agrupamento. As estimativas dos parâmetros do preditor linear para cada combinação de secagem, dessecante e concentração são apresentadas na Tabela F.1.1.

Tabela F.1.1 - Estimativas e desvios dos parâmetros do preditor linear do modelo binomial proposto para *Beauveria bassiana* considerando as combinações das covariáveis secagem, dessecante e concentração para a covariável tempo

Coeficientes	Estimativa	Desvio padrão
Sc1:SIL:1	1,3096	0,0259
Sc1:SIL:3	1,5055	0,0275
Sc1:SIL:5	1,6132	0,0285
Sc1:Controle	0,6060	0,0235
Sc2:GLI:1	-1,0559	0,0382
Sc2:GLI:3	-1,3654	0,0476
Sc2:GLI:5	-1,6042	0,0571
Sc2:SIL:1	1,4362	0,0270
Sc2:SIL:3	1,4458	0,0269
Sc2:SIL:5	1,5391	0,0281
Sc2:Controle	0,8334	0,0238
Tempo	-0,0074	0,0002

Para verificar o ajuste do modelo, é apresentada na Figura F.1.2 a dispersão das observações contra o ajuste do modelo para cada combinação de secagem, dessecante e concentração.

Figura F.1.2– Dispersão dos dados dos tratamentos com conídios de *Beauveria bassiana* formulados em óleo de girassol com os dessecantes sílica e glicerol e armazenados a 26°C

Para verificar se a diferença entre as curvas foi significativa, foram realizados os testes da razão de verossimilhança, os quais são apresentados pelas Tabelas F.1.2 para os dois níveis de secagem.

Tabela F.1.2- Teste da razão de verossimilhança para as diferenças entre os tratamentos de *Beauveria bassiana* para os dois níveis de secagem

Secagem 1		Secagem 2	
Teste	Valor-p	Teste	Valor-p
Controle x Sil conc=1	<0,001	Gli conc=3 x Gli conc=5	<0,001
Sil conc=1 x Sil conc=3	<0,001	Gli conc=3 x Gli conc=1	<0,001
Sil conc=3 x Sil conc=5	<0,001	Controle x Sil conc=1	<0,001
		Sil conc=1 x Sil conc=3	0,754
		Sil conc=1 x Sil conc=5	<0,001
		Sil conc=3 x Sil conc=5	0,003

Para *M. anisopliae* os tratamentos com conídios provenientes da secagem 1 e combinados as três concentrações de Glicerol a 3 e 5% causaram mortalidade total dos conídios já na primeira avaliação e como não houve variância na taxa de viabilidade, não foi possível incluir esses tratamentos na análise estatística. (Fig F.1.3)

Figura F.1.3 - Análise preliminar das taxas de viabilidade por tratamento para *Metarhizium anisopliae*

As estimativas dos parâmetros do preditor linear para cada combinação de secagem, dessecante e concentração são apresentadas na Tabela F.1.3.

Tabela F.1.3 - Estimativas e desvios dos parâmetros do preditor linear do modelo binomial proposto para *Metarhizium anisopliae* considerando as combinações das covariáveis secagem, dessecante e concentração para a covariável tempo

Coefficientes	Estimativa	Desvio padrão
Sc1:GLI:1	-1,0924	0,0412
Sc1:SIL:1	0,7840	0,0215
Sc1:SIL:3	0,8666	0,0222
Sc1:SIL:5	0,9204	0,0224
Sc1:Controle	0,2677	0,0229
Sc2:GLI:1	-1,0064	0,0385
Sc2:GLI:3	-1,7080	0,0675
Sc2:GLI:5	-2,0755	0,0998
Sc2:SIL:1	0,2891	0,0229
Sc2:SIL:3	0,7279	0,0216
Sc2:SIL:5	0,6878	0,0219
Sc2:Controle	-0,1582	0,0252
Tempo	-0,0087	0,0001

Para verificar o ajuste do modelo, é apresentada na Figura F.1.4 a dispersão das observações contra o ajuste do modelo para cada combinação de secagem, dessecante e concentração.

Figura F.1.4 – Dispersão dos dados dos tratamentos com conídios de *Metarhizium anisopliae* formulados em óleo de girassol com os dessecantes sílica e glicerol e armazenados a 26°C

Para verificar se a diferença entre as curvas foi significativa, foram realizados os testes da razão de verossimilhança, os quais são apresentados pelas Tabelas F.1.4 para os dois níveis de secagem.

Tabela F.1.4 - Teste da razão de verossimilhança para as diferenças entre os tratamentos de *Metarhizium anisopliae* para os dois níveis de secagem

Secagem 1		Secagem 2	
Teste	Valor-p	Teste	Valor-p
Gli conc=1 x Controle	<0,001	Gli conc=3 x Gli conc=5	0,001
Controle x Sil conc=1	<0,001	Gli conc=3 x Gli conc=1	<0,001
Sil conc=1 x Sil conc=3	<0,001	Controle x Sil conc=1	<0,001
Sil conc=3 x Sil conc=5	0,035	Sil conc=1 x Sil conc=5	<0,001
		Sil conc=3 x Sil conc=5	0,111

Anexo F.2. Ensaio 2.

O teste da razão de verossimilhança, apontou que a concentração 3% e 5% são estatisticamente iguais ao nível de 5% de significância.

Com os grupos formados, faz-se necessário a construção de outro modelo levando em consideração os grupos. O modelo final escolhido para representar a taxa de viabilidade de *B. bassiana* foi o beta binomial com função de ligação “logit”, utilizando os grupos formados no modelo anterior. As estimativas dos parâmetros do preditor linear e do parâmetro de dispersão são apresentadas nas Tabelas F.2.1.

Tabela F.2.1 - Estimativas e desvios dos parâmetros do preditor linear e dispersão do modelo beta binomial proposto para *Beauveria bassiana*

Coeficientes	Preditor linear		Parâmetro de dispersão	
	Estimativa	Desvio padrão	Estimativa	Desvio padrão
c0%	9,349	0,907	-20,802	1,998
c1%	6,395	0,462	-16,093	2,255
g1	6,695	0,297	-3,191	1,783
Temperatura	-0,284	0,033	0,592	0,068
Tempo	-0,014	0,0001	0,029	0,001
c1%:Temperatura	0,137	0,035	-0,269	0,100
g1:Temperatura	0,136	0,035	-0,777	0,094

Para verificar o ajuste do modelo, é apresentada na Figura F.2.1 a dispersão das observações contra o ajuste do modelo para cada combinação de temperatura, dessecante e concentração.

Figura F.2.1 - Dispersão dos dados dos tratamentos com conídios de *Beauveria bassiana* formulados em óleo de girassol com o dessecantes sílica e armazenados a 26 e 30°C

Para verificar se a diferença entre as curvas foi significativa, foi realizado o teste da razão de verossimilhança entre as curvas para cada temperatura e entre as melhores curvas de cada temperatura. Os resultados dos testes são apresentados na Tabela F.2.2.

Tabela F.2.2 - Teste da razão de verossimilhança para as diferenças de tratamentos e grupos do modelo para *Beauveria bassiana*

Teste	valor-p
Temperatura 26ºc g1 x Temperatura 26ºc c1%	<0,001
Temperatura 26ºc c1% x Temperatura 26ºc c0%	<0,001
Temperatura 30ºc g1 x Temperatura 30ºc c1%	<0,001
Temperatura 30ºc c1% x Temperatura 30ºc c0%	<0,001
Temperatura 26ºc c0% x Temperatura 30ºc c0%	<0,001

Apesar do efeito muito próximo entre e a concentração 5% e as concentrações de 3% e 1%, ao realizar o teste de agrupamento o resultado apontou haver diferença entre as concentrações considerando 5% de significância. As estimativas dos parâmetros do preditor linear e do parâmetro de dispersão são apresentadas na Tabela F.2.3.

Tabela F.2.3 - Estimativas e desvios dos parâmetros do preditor linear e dispersão do modelo beta binomial proposto para *Metarhizium anisopliae*

Coeficientes	Preditor linear		Parâmetro de dispersão	
	Estimativa	Desvio padrão	Estimativa	Desvio padrão
c0%	3,924	0,289	-13,950	1,062
c1%	4,744	0,279	-16,494	1,100
c3%	4,870	0,280	-17,501	1,123
c5%	4,988	0,280	-17,348	1,120
Temperatura	-0,127	0,010	0,423	0,036
Tempo	-0,014	0,0001	0,019	0,001

Para verificar o ajuste do modelo, é apresentada na Figura F.2.2 a dispersão das observações contra o ajuste do modelo para cada combinação de temperatura, dessecante e concentração.

Figura F.2.2 - Dispersão dos dados dos tratamentos com conídios de *Metarhizium anisopliae* formulados em óleo de girassol com o dessecantes sílica e armazenados a 26 e 30°C

Para verificar se a diferença entre as curvas foi significativa, foi realizado o teste da razão de verossimilhança entre as curvas para cada temperatura e entre as melhores curvas de cada temperatura. Os resultados dos testes são apresentados na Tabela F.2.4.

Tabela F.2.4 - Teste da razão de verossimilhança para as diferenças de tratamentos e grupos do modelo para *Metarhizium anisopliae*

Teste	valor-p
Temperatura 26°C c0% x Temperatura 26°C c1%	<0,001
Temperatura 26°C c1% x Temperatura 26°C c3%	0,087
Temperatura 26°C c1% x Temperatura 26°C c5%	<0,001
Temperatura 26°C c3% x Temperatura 26°C c5%	<0,012
Temperatura 30°C c0% x Temperatura 30°C c1%	<0,001
Temperatura 30°C c1% x Temperatura 30°C c3%	<0,001
Temperatura 30°C c3% x Temperatura 30°C c5%	<0,009
Temperatura 26°C c5% x Temperatura 30°C c5%	<0,001

Anexo G - Efeito da adição de dessecantes no tempo de prateleira de conídios formulados em óleo vegetal + emulsionantes

O modelo escolhido para representar as proporções de viabilidade de conídios de *B. bassiana* foi o binomial com função de ligação “logit” para o preditor linear. O modelo completo apontou haver interação entre os tratamentos e a temperatura, se tornando complexa a análise de agrupamento pelo fato da quantidade de parâmetros. As estimativas dos parâmetros do preditor linear do modelo proposto para *B. bassiana* estão representadas na Tabelas G.1.

Com o modelo ajustado, foi realizada a comparação das proporções de viabilidade ao longo dos 103 dias, entre os tratamentos.

Tabela G.1 - Estimativas e desvios dos parâmetros do preditor linear do modelo beta binomial proposto para *Beauveria bassiana*

Coeficientes	Preditor Linear	
	Estimativa	Desvio padrão
EP	20,0673	0,3094
EP+O	13,9139	0,3034
EP+O+E11	16,4937	0,6686
EP+O+E11+Si	13,1538	0,2763
EP+O+E5	14,2848	0,3458
EP+O+E5+Si	17,1819	0,3051
EP+O+E7	16,2280	0,2991
EP+O+E7+Si	16,9597	0,3040
EP+O+E8	15,5648	0,4710
EP+O+E8+Si	13,7892	0,3177
EP+O+Si	17,5016	0,3186
temperatura	-0,6214	0,0108
tempo	-0,0207	0,0001
EP+O:temperatura	0,1679	0,0151
EP+O+E11:temperatura	-0,0039	0,0275
EP+O+E11+Si:temperatura	0,2189	0,0143
EP+O+E5:temperatura	0,1326	0,0165
EP+O+E5+Si:temperatura	0,1211	0,0148
EP+O+E7:temperatura	0,0925	0,0149
EP+O+E7+Si:temperatura	0,1106	0,0148
EP+O+E8:temperatura	0,0525	0,0206
EP+O+E8+Si:temperatura	0,1598	0,0156
EP+O+Si:temperatura	0,1211	0,0151

Para verificar a qualidade do ajuste para cada tratamento, é apresentada na Figura G.1 a dispersão das observações e os pontos ajustados pelo modelo.

Figura G.1 – Dispersão dos dados dos tratamentos com conídios de *Beauveria bassiana* formulados em óleo de girassol contendo dessecante e emulsionantes e armazenados a 26 e 30°C

Para verificar se a diferença entre as curvas foi significativa, foi realizado o teste da razão de verossimilhança entre as curvas para cada temperatura e entre as melhores e piores para cada temperatura (Tab. G.2.)

Tabela G.2 - Teste da razão de verossimilhança para as diferenças de tratamentos e grupos do modelo para *Beauveria bassiana*

Temperatura 26°C			Temperatura 30°C		
Teste	Valor-p		Teste	Valor-p	
Ep+O+E11 x Ep+O+E8	0,001		Ep+O+E11 x Ep+O+E8	<0,001	
Ep+O+E7+Si x Ep	<0,001		Ep x Ep+O+E7+Si	<0,001	
Ep+O+E5+Si x Ep	<0,001		Ep+O+E7+Si x Ep+O+E5+Si	<0,001	
Ep+O+E5+Si x Ep+O+Si	<0,001		Ep+O+E5+Si x Ep+O+Si	<0,001	

O modelo escolhido para representar as proporções de viabilidade de *M. anisopliae* foi o binomial com função de ligação “logit” para o preditor linear. O modelo completo apontou haver interação entre os tratamentos e a temperatura, se tornando complexa a análise de agrupamento pelo fato da quantidade de parâmetros. As estimativas dos parâmetros do predito linear do modelo proposto para *M. anisopliae* são apresentadas na Tabela G.3.

Para verificar se a diferença entre as curvas foi significativa, foi realizado o teste da razão de verossimilhança entre as curvas para cada temperatura e entre as melhores e piores para cada temperatura (Tab. G.4.)

Tabela G.4 - Teste da razão de verossimilhança para as diferenças de tratamentos e grupos do modelo para *Metarhizium anisopliae*

Temperatura 26°C			Temperatura 30°C		
Teste		Valor-p	Teste		Valor-p
Ep+O+E11	x Ep+O+E8	<0,001	Ep+O+E11	x Ep+O+E8	<0,001
EP+O+E11+Si	x EP	0,115	Ep	x Ep+O+E7+Si	<0,001
EP+O+E11+Si	x Ep+O+E7+Si	<0,001	Ep+O+E7+Si	x Ep+O+E11+Si	0,152
Ep	x Ep+O+E7+Si	0,012	Ep+O+E7+Si	x Ep+O+Si	<0,001
Ep+O+E7+Si	x Ep+O+Si	<0,001	Ep+O+E11+Si	x Ep+O+Si	<0,001
Ep+O+Si	x Ep+O+E5+Si	<0,001	Ep+O+Si	x Ep+O+E5+Si	<0,001

Tabela G.3 - Estimativas e desvios dos parâmetros do preditor linear do modelo beta binomial proposto para *Metarhizium anisopliae*

Coeficientes	Preditor Linear	
	Estimativa	Desvio padrão
EP	8,369796	0,289276
EP+O	8,7148472	0,372487
EP+O+E11	15,779692	0,744245
EP+O+E11+Si	6,4309441	0,271461
EP+O+E5	11,709595	0,384867
EP+O+E5+Si	8,6229942	0,26406
EP+O+E7	14,796643	0,539289
EP+O+E7+Si	7,9905513	0,281054
EP+O+E8	15,049362	1,039815
EP+O+E8+Si	11,262072	0,367235
EP+O+Si	8,9903367	0,275003
temperatura	-0,254762	0,010327
tempo	-0,021423	0,000155
EP+O:temperatura	-0,058383	0,017073
EP+O+E11:temperatura	-0,353122	0,029976
EP+O+E11+Si:temperatura	0,072231	0,014098
EP+O+E5:temperatura	-0,163235	0,017484
EP+O+E5+Si:temperatura	0,0134291	0,013872
EP+O+E7:temperatura	-0,295619	0,022662
EP+O+E7+Si:temperatura	0,018357	0,014304
EP+O+E8:temperatura	-0,353097	0,040735
EP+O+E8+Si:temperatura	-0,142381	0,016927
EP+O+Si:temperatura	-0,005983	0,01413

Para verificar a qualidade do ajuste para cada tratamento, é apresentada na Figura G.2 a dispersão das observações e os pontos ajustados pelo modelo.

Figura G.2 - Dispersão dos dados dos tratamentos com conídios de *Metarhizium anisopliae* formulados em óleo de girassol contendo dessecante e emulsionantes e armazenados a 26 e 30°C

Anexo H - Efeito da pré-secagem do óleo e/ou emulsionante no tempo de prateleira de conídios

Para verificar quais tratamentos de *B. bassiana* foram semelhantes, foi realizada a análise de agrupamento, no qual os grupos foram formados pelos tratamentos que obtiveram suas estimativas dos parâmetros próximas com o modelo completo e a igualdade entre os tratamentos foi confirmada via teste da razão de verossimilhança. Com os grupos formados, o modelo final escolhido para representar a taxa de viabilidade das larvas Beauveira foi o binomial com função de ligação “logit”, no qual as estimativas dos parâmetros do preditor linear são apresentadas na Tabela H.1.

Tabela H.1 - Estimativas e desvios dos parâmetros do preditor linear do modelo beta binomial proposto para *Beauveria bassiana*

Coeficientes	Preditor linear	
	Estimativa	Desvio padrão
Ep	11,011	0,175
Ep Ose	10,940	0,175
Ep Ose Esse SP	10,492	0,173
Ep Ose Sil	11,158	0,176
Ep Oum	9,710	0,171
g1	10,652	0,171
Temperatura	-0,280	0,005
Tempo	-0,015	0,0002

Para verificar se a diferença entre as curvas foi significativa, foi realizado o teste da razão de verossimilhança entre as curvas. Os resultados dos testes são apresentados na Tabela H.2, e como o efeito de temperatura é aditivo e sem interação com os tratamentos, os resultados das comparações das curvas por níveis de temperatura são os mesmos.

Tabela H.2 - Teste da razão de verossimilhança para as diferenças de tratamentos e grupos de *Beauveria bassiana*

Teste	valor-p
Ep Oum x Ep Ose Esse SP	<0,001
Ep Ose Esse SP x g1	<0,001
g1 x Ep Ose	<0,001
Ep Ose x Ep	0,193
Ep Ose x Ep Ose Sil	<0,001
Ep x Ep Ose Sil	0,009

Para verificar a qualidade do ajuste para cada tratamento, é apresentada na Figura H.1 a dispersão das observações e os pontos ajustados pelo modelo.

Figura H.1 - Dispersão dos dados dos tratamentos com conídios de *Beauveria bassiana* em diferentes formulações e armazenados a 26 e 30°C

Para verificar quais tratamentos de *M. anisopliae* foram semelhantes, foi realizada a análise de agrupamento, no qual os grupos foram formados pelos tratamentos que obtiveram suas estimativas dos parâmetros próximas com o modelo completo e a igualdade entre os tratamentos foi confirmada via teste da razão de verossimilhança. Com os grupos formados, o modelo final escolhido para representar a taxa de viabilidade das larvas Beauveira foi o binomial com função de ligação “logit”, no qual as estimativas dos parâmetros do preditor linear são apresentadas na Tabela H.3.

Tabela H.3 - Estimativas e desvios dos parâmetros do preditor linear do modelo beta binomial proposto para *Metarhizium anisopliae*.

Coeficientes	Preditor Linear	
	Estimativa	Desvio padrão
Ep	6,125	0,117
Ep Ose Esse Sp	4,600	0,112
Ep Ose Sp	5,127	0,113
Ep Oum	4,203	0,112
Ep Oum Sil	4,906	0,113
Ep Sil	4,498	0,118
g1	5,204	0,113
g2	4,827	0,112
Temperatura	-0,159	0,003
Tempo	-0,005	0,0001

Para verificar se a diferença entre as curvas foi significativa, foi realizado o teste da razão de verossimilhança entre as curvas. Os resultados dos testes são apresentados na Tabela H.4, e como o efeito de temperatura é aditivo e sem interação com os tratamentos, os resultados das comparações das curvas por níveis de temperatura são os mesmos.

Tabela H.4 - Teste da razão de verossimilhança para as diferenças de tratamentos e grupos de *Metarhizium anisopliae*

Teste	valor-p
Ep Oum x Ep Ose Esse SP	<0,001
Ep Ose Esse SP x g2	<0,001
g2 x Ep Oum Sil	0,004
Ep Oum Sil x Ep Ose Sp	<0,001
Ep Ose Sp x g1	0,007
g1 x Ep	<0,001
Ep x Ep Sil	<0,001

Para verificar a qualidade do ajuste para cada tratamento, é apresentada na Figura H.2 a dispersão das observações e os pontos ajustados pelo modelo.

Figura H.2 - Dispersão dos dados dos tratamentos com conídios de *Metarhizium anisopliae* em diferentes formulações e armazenados a 26 e 30°C

Anexo I - Efeito da formulação SC na proteção de conídios expostos a radiação UV

As estimativas dos parâmetros, desvios padrões e valor-p do teste de significância para o modelo da função de ligação “*probit*” ($\pi = \Phi(X\beta)$), que explicam as proporções de viabilidade são apresentados nas Tabelas I.1 e I.2, respectivamente.

Tabela I.1 - Estimativas dos parâmetros, desvios e valor-p do teste para o modelo *probit* proposto para *Beauveria bassiana*

Coeficientes	Estimativa	Desvio padrão	Valor-p
β_0	1,84	0,12	<0,01
Teste	-0,43	0,14	<0,01
Óleo:T1	-0,31	0,16	0,05
Teste:T1	-0,92	0,11	<0,01
Óleo:T2	-0,74	0,15	<0,01
Teste:T2	-1,43	0,12	<0,01
Óleo:T3	-0,66	0,14	<0,01
Teste:T3	-1,60	0,10	<0,01
Óleo:T4	-1,27	0,14	<0,01
Teste:T4	-1,96	0,11	<0,01

O modelo *probit* estimado para a proporção de viabilidade de *B. bassiana* apresentou o desvio dos resíduos igual a 32,69 e graus de liberdade dos resíduos igual a 30 o que indica que o modelo ajustado de forma satisfatória, pois assintoticamente o desvio dos resíduos deve ser próximo ao número de graus de liberdade dos resíduos.

Tabela I.2 - Estimativas dos parâmetros, desvios e valor-p do teste para o modelo *probit* proposto para *Metarhizium anisopliae*

Coeficientes	Estimativa	Desvio padrão	Valor-p
β_0	1,01	0,06	<0,01
Teste	-0,04	0,10	0,63
Óleo:T1	-0,98	0,08	<0,01
Teste:T1	-1,51	0,09	<0,01
Óleo:T2	-1,49	0,09	<0,01
Teste:T2	-2,45	0,13	<0,01
Óleo:T3	-2,02	0,11	<0,01
Teste:T3	-2,93	0,18	<0,01
Óleo:T4	-7,41	682,00	0,99
Teste:T4	-7,36	682,00	0,99

O modelo *probit* estimado para a proporção de viabilidade de *M. anisopliae* apresentou o resíduo dos desvios igual a 27,01 e graus de liberdade dos resíduos igual a 30 o que indica que o modelo foi ajustado satisfatoriamente.