DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES DE

Baculovirus anticarsia

ANTONIO BATISTA FILHO

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. SÉRGIO BATISTA ALVES

Tese apresentada à Escola Superior
de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em
Ciências, Área de Concentração:
Entomologia

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Janeiro - 1997

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Batista Filho, Antonio

Desenvolvimento de formulações de *Baculovirus anticarsia* / Antonio Batista
Filho. -- Piracicaba, 1997.

86 p. : il.

Tese (doutorado) -- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1997.
Bibliografia.

1. Baculovirus 2. Inseticida biológico 3. Lagarta da soja 4. Manejo integrado 5.
Soja (praga) I. Título

CDD 632.951
633.34

DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES DE

Baculovirus anticarsia

ANTONIO BATISTA FILHO

Aprovada em 08.05.1997

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Sérgio Batista Alves

ESALQ/USP

Prof. Dr. Celso Omoto

ESALQ/USP

Dra. Zuleide Alves Ramiro

Instituto Biológico

Dra. Deise Maria Fontana Capalbo

EMBRAPA

Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos

FCAV/UNESP

Prof. Dr. Sérgio Batista Alves

Orientador

Aos meus pais, Antonio e Alzira

e à minha tia Leonor

DEDICO

À minha esposa Cidinha, pela
compreensão e estímulo, e aos meus
filhos Matheus e Caio.

OFEREÇO

HOMENAGEM

À memória do mestre e amigo Benedicto Pedro Bastos Cruz, Pesquisador Científico do Instituto Biológico, cujo exemplo de vida foi sua maior virtude.

“Continue andando, e é provável que você tropece em algo, talvez quando menos o espere. Jamais ouvi falar que, sentado, tropeçasse em algo.”

Charles Kettering

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e por tudo que me tem concedido.

Ao Instituto Biológico do Estado de São Paulo, pela oportunidade dada para frequentar o curso de Pós-Graduação e por ter cedido toda infra-estrutura necessária à realização deste trabalho.

Ao Dr. Sérgio Batista Alves, Professor Associado do Departamento de Entomologia da ESALQ /USP, pela orientação, amizade e confiança .

À Dra. Zuleide Alves Ramiro, Pesquisadora Científica do Instituto Biológico, pelo meu encaminhamento na vida profissional e, também, pelo estímulo e apoio sempre recebidos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de estudo durante o curso.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP, pelos ensinamentos transmitidos e apoio recebido.

Aos amigos Luís G. Leite, Laerte A. Machado, Edson Mancuci da Silva, Maria de Lourdes Dal'Ava Augusto, Paulo Camargo, Maria Stella S. Marcelino, Brasil R. Buzelli e Clovis Lamas pelo apoio e amizade de sempre.

Ao Químico Nilson Toschi Augusto, Pesquisador Científico do Instituto Biológico, pelo preparo das formulações.

Ao Biólogo Luís Francisco Angeli Alves pelas sugestões valiosas e, acima de tudo, pela amizade sincera e o apoio recebido durante o decorrer da pesquisa.

Aos colegas Adalton Raga, Magali D'Angelo, Márcia Maria Rebouças e Maria Amélia La Regina Rodrigues pela revisão do texto.

À Srta. Silvana D'Agostini, desenhista do Instituto Biológico, pela elaboração dos fluxogramas.

Aos Bibliotecários Eliana Maria Garcia Sabino da ESALQ e Walter Graeber do Instituto Biológico pela correção das referências bibliográficas.

À Seção de Climatologia Agrícola do Instituto Agrônomo de Campinas pelo fornecimento dos dados climatológicos.

Aos colegas e amigos do Curso de Pós-Graduação pelo convívio e oportunidade de intercâmbio de idéias.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMO.....	xiv
SUMMARY.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Obtenção de <i>Baculovirus anticarsia</i> semi-purificado.....	22
3.2 Preparo das formulações.....	23
3.3 Efeito do pH sobre o vírus.....	29
3.3.1 Efeito do pH sobre as suspensões semi-purificadas.....	29
3.3.2 Efeito do pH sobre a formulação OE.....	30
3.4 Estabilidade de formulações de <i>B. anticarsia</i> em condições ambiente de armazenamento.....	32
3.5 Efeito da temperatura no armazenamento de <i>B. anticarsia</i> PM.....	33
3.6 Sensibilidade das formulações à radiação ultravioleta em condições de laboratório.....	34
3.7 Persistência de três preparações de <i>B. anticarsia</i> em folhas de soja (cultivar IAC-8).....	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1 Testes físicos das formulações.....	40

4.2 Efeito do pH sobre a atividade do vírus.....	42
4.3 Estabilidade de formulações de <i>B. anticarsia</i> em condições ambiente de armazenamento.....	45
4.4 Efeito da temperatura no armazenamento de <i>B. anticarsia</i> PM.....	49
4.5 Sensibilidade das formulações à radiação ultravioleta em condições de laboratório.....	51
4.6 Persistência de três preparações de <i>B. anticarsia</i> em folhas de soja (cultivar IAC-8).....	54
5. CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela nº	Página
1.	Resultados médios obtidos nas determinações das características físicas da formulação <i>B. anticarsia</i> PM..... 40
2	Resultados médios obtidos nas determinações do pH e da estabilidade da formulação <i>B. anticarsia</i> OE..... 42
3	Porcentagem de mortalidade de <i>A. gemmatalis</i> submetidas às suspensões semi-purificadas de <i>B. anticarsia</i> com diferentes pH..... 43
4	Porcentagem de mortalidade de <i>A. gemmatalis</i> submetidas ao <i>B. anticarsia</i> formulado com diferentes pH..... 44
5	Efeito do período de armazenamento e do tipo de preparação sobre a viabilidade de <i>B. anticarsia</i> determinado pela porcentagem de mortalidade de lagartas de <i>A. gemmatalis</i> 46
6	Médias quadrimestrais de temperatura e umidade relativa observadas no interior do armário, durante o período de armazenamento das formulações (Maio/1991-Dezembro/92)..... 48
7	Porcentagem de mortalidade de lagartas de <i>A. gemmatalis</i> pela aplicação da formulação de <i>B. anticarsia</i> PM (caulim) armazenado em diferentes temperaturas..... 49
8	Porcentagem de mortalidade de lagartas de <i>A. gemmatalis</i>

	inoculadas com três preparações de <i>B. anticarsia</i> , submetidas à radiação UV de 253,7 nm.....	52
9	Porcentagem de mortalidade de lagartas de <i>A. gemmatalis</i> mortas por <i>B. anticarsia</i> em função da persistência de três preparações do patógeno sobre folhas de soja do cultivar IAC-8. Campinas, janeiro de 1993.....	55
10	Dados climáticos obtidos durante o período de observação da persistência da atividade de <i>B. anticarsia</i> sobre folhas de soja do cultivar IAC-8. Campinas, janeiro de 1993.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura nº		Página
1	Esquema simplificado do processo de formulação PM de <i>B. anticarsia</i>	24
2	Equipamentos utilizados no processo de formulação PM de <i>B. anticarsia</i>	25
3	Esquema simplificado do processo de formulação OE de <i>B. anticarsia</i>	26
4	Homogeneizador utilizado no processo de formulação OE de <i>B. anticarsia</i>	27
5	Câmara de pulverização contendo os folíolos fixados na placa de isopor.....	35
6	Câmara de germinação contendo os folíolos provenientes do campo.	38
7	Porcentagem de mortalidade de <i>A. gemmatilis</i> submetidas às suspensões semi-purificadas de <i>B. anticarsia</i> com diferentes pH.....	43
8	Porcentagem de mortalidade de <i>A. gemmatilis</i> submetidas ao <i>B. anticarsia</i> formulado com diferentes pH.....	45
9	Mortalidade de lagartas de <i>A. gemmatilis</i> nos diferentes tratamentos em 20 meses de armazenamento.	46
10	Mortalidade de lagartas de <i>A. gemmatilis</i> provocada por <i>B. anticarsia</i> PM (caulim) armazenado em diferentes temperaturas.....	50

11	Mortalidade de lagartas de <i>A. gemmatalis</i> inoculadas com três preparações de <i>B. anticarsia</i> , submetidas à radiação ultravioleta de 253,7 nm.....	53
12	Persistência de três preparações de <i>B. anticarsia</i> sobre folhas de soja do cultivar IAC-8. Campinas, janeiro de 1993.....	57

Desenvolvimento de formulações de *Baculovirus anticarsia*

Autor: Antonio Batista Filho

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Batista Alves

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito do pH, da temperatura, da radiação ultravioleta e da chuva sobre a eficiência, estabilidade e persistência de dois tipos de formulações de *Baculovirus anticarsia* desenvolvidas pelo Instituto Biológico do estado de São Paulo. A formulação pó molhável (PM) foi preparada mediante a impregnação direta das suspensões de vírus e adjuvantes sobre uma mistura de inertes de origem mineral, em que predominava o caulim. A formulação óleo emulsionável (OE) foi obtida a partir da incorporação do patógeno suspenso em água com óleo de milho e adjuvantes. Condições extremas de acidez ou alcalinidade reduziram a atividade do vírus (pH 1, 11 e 13). A formulação PM foi alterada por temperaturas de 40 e 50°C após 7 dias de armazenamento, apresentando redução na eficiência de 12 e 76%, respectivamente. Quanto à estabilidade no armazenamento, a formulação OE teve um melhor desempenho em 20 meses de observação, perdendo apenas 18,33% de sua atividade original, enquanto o PM já aos 12 meses teve sua eficiência reduzida para apenas 11,67%. Não foram constatadas diferenças entre as formulações com relação ao efeito protetor contra a radiação ultravioleta emanada de lâmpada germicida, pois ambas conferiram proteção ao vírus, se comparado com o patógeno semi-purificado. Em condições de campo, a formulação OE favoreceu a persistência do patógeno, mantendo mais de 60% da

atividade após quatorze dias da aplicação. A formulação PM foi consideravelmente removida das folhas pela chuva.

Development of Formulations of *Baculovirus anticarsia*

Author: Antonio Batista Filho

Adviser: Prof. Dr. Sérgio Batista Alves

Abstract

The purpose of this study was to examine the effect of pH, temperature, UV-radiation and rainfall on efficiency, stability and persistence of two types of formulation of *Baculovirus anticarsia* developed by the Biologic Institute of the State of São Paulo. The formulation of wettable powder (WP) was prepared through direct impregnation of the virus suspension and adjuvants on a mixture of inerts of mineral origin with predominance of kaolin. The formulation of Emulsifiable Oil (EO) was obtained through association of the suspension of pathogen with corn oil and adjuvants. Extreme acidity or alkaline conditions reduced the activity of the virus (pH 1, 11 and 13). The WP formulation was affected by temperatures of 40° and 50° C after 7 days of stocking, presenting efficiency reduction of 12% and 76% respectively. Regarding stocking stability, EO formulation showed a better performance during the 20 month of observation, losing only 18,33% of its original activity. On the other hand, wettable powder had its efficiency reduced down to 11% already after the 12th month. No differences were verified between the formulations regarding the protective effect against UV-radiation emanated from a germicide lamp. Both showed to protect the virus when compared with the semi-purified pathogen. In field conditions, the EO formulation favored the pathogen's persistency,

which maintained more than 60% of its activity after 14 days. The major part of wettable powder formulation was removed from the leaves by rainfall.

1 - INTRODUÇÃO

A expansão da cultura da soja no Brasil, durante a década de 70, foi causada pela participação das indústrias de óleos comestíveis interessadas no abastecimento de matéria prima, face à redução de oferta de proteína no mercado internacional. O rápido aumento da área cultivada com essa leguminosa não foi acompanhado, inicialmente, de uma tecnologia apropriada para a realidade brasileira. Essa situação levou à necessidade de se encontrar soluções, a curto prazo, para os problemas da cultura, fomentando assim a geração e transferência de novos conhecimentos, adaptados às nossas condições. Foi o caso dos inseticidas químicos que, utilizados intensivamente e de forma indiscriminada, não tardaram a apresentar efeitos colaterais e diretos sobre o homem e o ambiente.

Fatos como esse, colocavam em risco a sustentabilidade do processo agrícola e exigiam soluções que considerassem os aspectos sociais, econômicos e ecológicos. Estava lançado o embrião para o desenvolvimento do manejo integrado de pragas (MIP) da soja no Brasil.

Nos últimos 20 anos, as pesquisas sobre técnicas de MIP têm aperfeiçoado o programa através do avanço e incorporação de novas tecnologias. Considerando a área cultivada com soja no Brasil, a implementação do MIP resultou em uma economia anual

de US\$ 200 milhões, além dos benefícios sociais e ecológicos pela redução no emprego de inseticidas químicos na cultura (MOSCARDI, 1993).

Estudos conduzidos para comparar a situação existente antes da difusão massiva do MIP-Soja, evidenciaram que os agricultores brasileiros teriam sido beneficiados com uma redução de custos superior a US\$ 3 bilhões até 1994. O nível médio de adoção da tecnologia, em termos de porcentagem de área atingida, foi de 20% (GAZZONI, 1994).

Uma importante contribuição para o MIP-Soja foi a incorporação do vírus de poliedrose nuclear (VPN) entre as alternativas viáveis para o controle da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Lepidoptera, Noctuidae), considerada a principal praga desfolhadora dessa oleaginosa.

A implementação efetiva do programa, a campo, teve início no estado do Paraná a partir da safra 1982/83, sendo o vírus utilizado em aproximadamente 2.000 ha de área plantada com soja. Em 1989/90 a área tratada cresceu para 1.000.000 ha em todo o País. Inicialmente, o patógeno era utilizado na forma de preparações impuras (maceração de lagartas infectadas pelo vírus) e, a partir de 1986, o Centro Nacional de Pesquisa de Soja da EMBRAPA desenvolveu uma formulação pó molhável (PM) que foi posteriormente transferida a empresas privadas com vistas a exploração comercial (MOSCARDI e SOSA-GOMEZ, 1996).

A vantagem de se formular o microrganismo está em transformá-lo, através da adição de inertes e adjuvantes, em um produto com melhor desempenho no campo, de fácil manuseio e aplicação e, principalmente, com possibilidade de armazenamento em condições ambiente, com perda mínima das características iniciais do produto. O estudo

das formulações de entomopatógenos, de um modo geral, tem avançado pouco no mundo. No Brasil, estão disponíveis algumas informações sobre testes de produtos importados com novas formulações e estudos de formulações envolvendo, tanto a eficiência no controle de pragas e vetores de doenças (laboratório e campo), como na estabilidade do produto, quando armazenado em diferentes condições.

Especificamente com relação ao *Baculovirus anticarsia*, algumas formulações vêm sendo desenvolvidas e outras já são utilizadas em nossas condições (MOSCARDI, 1983; BATISTA FILHO *et al.*, 1986; BATISTA FILHO & AUGUSTO, 1987; GOMEZ *et al.*, 1987; GOMEZ & RUMIATTO, 1987; BATISTA FILHO *et al.*, 1988; MOSCARDI *et al.*, 1989; BATISTA FILHO, 1990; BATISTA FILHO & AUGUSTO, 1993; BATISTA FILHO, 1996).

Este trabalho teve por objetivo contribuir para o aperfeiçoamento de formulações de *B. anticarsia* através do estudo de alguns fatores que devem ser considerados para o desenvolvimento de um bioinseticida, entre os quais o efeito do pH, da temperatura e da radiação ultravioleta, pois raros são os estudos nessa linha de pesquisa em nossas condições. Dessa forma pretende-se gerar conhecimentos que sejam utilizados na industrialização desse entomopatógeno e na sua aplicação a campo.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

A formulação de um agrotóxico consiste em transformar um ingrediente ativo em um produto adequado que possa ser utilizado de forma eficiente, segura e econômica. Para isso, promove-se a mistura do produto biologicamente ativo com ingredientes inertes, através de processos que envolvem a moagem, a preparação de mistura, dissoluções e diluições.

A formulação de agentes de controle microbiológico tem, em geral, o mesmo objetivo dos inseticidas químicos, e se traduz em liberar o ingrediente ativo em uma forma apropriada de uso que propicie maior eficiência do produto a um menor custo.

Muitas características do processo utilizado para a elaboração de formulações de inseticidas microbianos são semelhantes aos químicos. Entretanto, os microrganismos entomopatogênicos apresentam problemas específicos, próprios de sua natureza biológica e que exigem maior atenção durante esta fase do trabalho. Exposição ao calor, compostos tóxicos, secagem não controlada e germinação prematura na presença de umidade podem inviabilizar o bioinseticida, sendo que os componentes presentes nas formulações devem contribuir para o incremento da sua estabilidade, virulência e

eficácia. Devem, também, aumentar a persistência do produto, a adesividade sobre a planta hospedeira e/ou inseto e a atratividade para a praga.

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

A escolha do tipo de formulação a ser utilizada dependerá da tecnologia de aplicação disponível, do microrganismo envolvido e da praga alvo. MARESCA (1990) relacionou algumas características que afetam a escolha de uma formulação (eficiência, simplicidade de produção e aplicação) e as vantagens e desvantagens dos diferentes tipos.

Os primeiros inseticidas microbianos eram formulados na forma seca e utilizados como pós secos ou molháveis. Esse tipo de formulação é adequado para fungos, por possibilitar que sejam estocados a seco até o momento da aplicação. Nesse caso, os inertes devem prevenir a aglomeração dos esporos durante a estocagem. Os dispersantes neutralizam a atração entre as partículas e os agentes molhantes reduzem a tensão superficial, permitindo maior difusão de ar em torno dos esporos (LUTHY *et al.*, 1982).

O fungo *Metarhizium anisopliae* tem sido utilizado para controle da broca-dos-citros, *Diploschema rotundicolle*, na forma de pó seco, obtido pela extração direta dos esporos que ficam retidos no inerte (fubá de milho). Essa formulação permite distribuir o patógeno nas galerias abertas pelo inseto controlando a praga (MACHADO *et al.*, 1995).

Pó seco (*Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*) também vem sendo pesquisado para controle de cupim de monte (FERNANDES, 1991).

A maioria dos bioinseticidas virais usados comercialmente tem sido formulada como pó molhável e a secagem constitui uma etapa importante no desenvolvimento do produto. MEDUGNO *et al.* (1989) compararam os efeitos de três métodos de secagem sobre a dispersibilidade dos poliedros de *B. anticroce*. Os autores testaram a secagem por “mini spray dryer”; ao ar, em estufa (27°C) e por liofilização, concluindo que a secagem ao ar produz aglomerados resistentes, com tamanho de até 27µ, difíceis de redispersarem.

Outro aspecto que merece atenção é a redução do tamanho das partículas durante as etapas de moagem. BATISTA FILHO *et al.* (1992a) avaliaram o efeito da moagem sobre a viabilidade dos fungos *Beauveria bassiana* e *M. anisopliae*. Os patógenos foram passados em moinho de martelo desprovido de peneira, com peneira grossa (malha 16) e com peneira fina (malha 40) e não tiveram a viabilidade afetada.

Entre as formulações sólidas convencionais de granulados, aquela denominada “spray on” ou impregnação é de confecção mais simples e o capital envolvido é baixo. Por outro lado, outras formulações como “stick on” ou “adesão”, peletizados e compactados exigem unidades mais específicas. Os métodos de preparação desses granulados são citados por POLON (1973).

Encapsulação em gel de alginato pode ser útil nas formulações de nematóides. Consiste basicamente na mistura de uma suspensão de nematóides em uma matriz gelatinosa (alginato). A mistura, após secagem, resulta em grânulos (cápsula) de alginato

de cálcio envolvendo os nematóides. O tamanho dos grânulos pode ser controlado no momento do preparo, regulando-se a abertura do gotejador ou então alterando-se a viscosidade da solução de alginato, de forma que com 1 a 2% de alginato obtém-se gotas; com concentrações inferiores ou superiores tende a formar fluxo contínuo (WOODRING & KAYA, 1988).

DUNKLE & SHASHA (1988) descreveram um novo sistema de encapsulação onde o material é digerido no intestino do inseto liberando o patógeno (*Bacillus thuringiensis*). O sistema pode também ser usado para encapsulação de vírus e microsporídeos (IGNOFFO *et al.*, 1991).

A formulação sólida mais moderna é a chamada grânulos dispersíveis em água (GRDA), semelhante aos pós molháveis, cujos grânulos são dispersíveis em água, e tem a vantagem de não produzir poeira (MARESCA, 1990). Nematóides têm sido formulados em grânulos dispersíveis, que além de permitirem maior concentração do patógeno por unidade de peso do formulado (vantajoso no armazenamento), também os mantêm inativos, permitindo armazenamento em temperaturas próximas a 20°C, dispensando o uso de refrigeração. Além disso, tem a vantagem em relação à formulação de alginato, por ser mais barata e prática pois está pronta para ser utilizada. Testes com formulações peletizadas também revelaram o potencial deste tipo de preparação para nematóides, no controle de insetos de solo (NICKLE *et al.*, 1994).

Segundo MARESCA (1990), com exceção das suspensões concentradas e dos microencapsulados, muitas das formulações convencionais são produzidas através da mistura de diferentes líquidos ou pela dissolução de sólidos em líquidos.

A formulação oleosa tem a vantagem de, em muitos casos, dispensar a incorporação de agentes molhantes ou adesivos. Em condições de laboratório, já foi constatado um aumento na eficiência de *B. bassiana* quando associado a óleos (PRIOR *et al.*, 1988) e melhor desempenho do fungo *M. flavoviride* em ambientes de baixa umidade (BATEMAN *et al.*, 1993). BATISTA FILHO *et al.* (1994b, 1995) reduziram o tempo letal e aumentaram a eficiência de *B. bassiana* quando incorporaram óleo mineral à pasta fúngica. Formulações oleosas de fungos têm sido desenvolvidas nos EUA para controle de gafanhotos, cigarras e moscas-brancas (WRIGHT & BRADLEY, 1996).

Para o sucesso no desenvolvimento de uma formulação, muitos fatores devem ser considerados, entre os quais o hábito da praga, o agente entomopatogênico, tipo de cultura/ambiente, seleção de inertes e adjuvantes, estabilidade no armazenamento, efeito do pH, umidade e temperatura, persistência no ambiente, tecnologia de aplicação e custos.

A seleção de veículos inertes adequados é de extrema importância para o sucesso de uma formulação. Os ingredientes inertes, também conhecidos como veículos diluentes, absorventes e atrativos, podem causar problemas nas formulações como a decomposição do microrganismo e desgaste de moinhos devido à abrasividade e empastamento do produto, proveniente da falta de absorção do veículo, pequena redutibilidade das partículas durante a moagem e pouca fluidez dos produtos, aspecto importante para os pós secos.

Os inertes também apresentam grande influência no período de armazenamento das formulações biológicas, podendo causar a decomposição do ingrediente ativo.

AUGUSTO & BATISTA FILHO (1994), estudando o efeito de três tipos de inertes pertencentes ao grupo do caulim sobre a atividade de *B. anticarsia* observaram que, após 20 dias de armazenamento a 45°C, os níveis de mortalidade de *Anticarsia gemmatalis* permaneceram inalterados, exceto para o tratamento caulim tipo 40, que teve sua eficiência reduzida para apenas 10%. Trabalho semelhante foi realizado por AUGUSTO *et al.* (1996) com inertes do grupo do talco. A influência de minerais de argila sobre microrganismos foi estudada por STOTZKY (1966a, b) e STOTZKY & REM (1966, 1967) que mostraram que bactérias são diferentemente estimuladas por minerais de argila.

Além do ingrediente ativo (entomopatógeno) e do inerte/veículo, as formulações podem conter adjuvantes, componentes que são utilizados para otimizar a atividade do ingrediente ativo e melhorar as características do produto formulado. Os adjuvantes podem estar incorporados às formulações ou serem utilizados na calda de pulverização, no momento da aplicação. Entre outras propriedades eles têm função fotoprotetora, fagoestimulante e antievaporante.

Os mais importantes adjuvantes são os surfactantes, compostos que facilitam a penetração e dispersão do organismo na calda de pulverização (RHODES, 1993). Segundo WARD (1984), a associação química dos surfactantes com a membrana do entomopatógeno pode causar incompatibilidade e perda de viabilidade. Observações de COUCH & IGNOFFO (1981) trazem informações sobre o comportamento de alguns componentes básicos testados em formulações de *B. thuringiensis*.

Estudos de compatibilidade de agentes tensoativos e de emulsificantes, em nossas condições, foram realizadas com *B. anticarsia* (AUGUSTO *et al.*, 1992, 1995). Também, ALVES¹ testou a compatibilidade entre adjuvantes usados em formulações em pó (dispersantes e umectantes) ou líquidos (emulsificante) e *B. thuringiensis*. Foi constatado que nas concentrações normalmente empregadas (1 a 3%) a grande maioria dos dispersantes e umectantes compostos aniônicos foi incompatível com a preservação (bactericidas ou bacteriostáticos) e que emulsificantes compostos não iônicos e catiônicos, nas mesmas concentrações citadas, foram compatíveis e passíveis de serem empregadas em futuras formulações oleosas de *B. thuringiensis*.

Também MARQUES (1993) realizou bioensaios de compatibilidade em meio de cultura, entre isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* com agentes molhantes e emulsificantes mais comuns em formulações de inseticidas químicos. Os testes conduzidos durante 48 horas de incubação revelaram o efeito negativo de molhantes e emulsificantes pertencentes ao grupo alquil sulfato de sódio e alquil sulfonosuccinato de sódio e álcool graxo poliglicol-éter, respectivamente.

Segundo COUCH & IGNOFFO (1981), poucas são as informações relativas à estabilidade, em armazenamento ambiente, dos entomopatógenos formulados e utilizados em larga escala na agricultura. Os autores advertem que um inseticida microbiano, armazenado naquelas condições, deve manter sua atividade por pelo menos 18 meses, tempo necessário para tornar a formulação economicamente viável. Em certos casos, admite-se o armazenamento e distribuição do produto sob refrigeração, geralmente

¹ ALVES, L.F.A. (doutorando do Depto. de Entomologia da ESALQ/USP, Piracicaba) Comunicação pessoal, 1996.

quando a situação justifica o aumento de custos, como é o exemplo de produtos à base de nematóides.

Em geral, os vírus entomopatogênicos são muito estáveis a baixas temperaturas. Os trabalhos mostram que os vírus, especialmente aqueles com os corpos de inclusão intactos, quando armazenados em cadáveres, pós secos ou em suspensões abrigadas da luz e mantidas entre 0 e 4°C, mantiveram sua atividade original elevada por vários anos (DAVID & GARDINER, 1967; DULMAGE & BURGERJON, 1977; JAQUES, 1985). Por outro lado, os vírus de partículas livres são menos estáveis mesmo a baixas temperaturas.

Os *Baculovirus* são menos estáveis a temperatura ambiente, embora possam permanecer ativos por longos períodos, dependendo do método de armazenamento. A atividade do vírus de poliedrose nuclear (VPN) de *Diprion hercyniae* decresceu consideravelmente após 2 anos de armazenamento (NEILSON & ELGEE, 1960) enquanto o VPN de *Lymantria dispar* manteve sua eficiência por igual período (LEWIS & ROLLINSON, 1978).

Os vírus entomopatogênicos sendo constituídos de nucleoproteínas são suscetíveis a desnaturação quando expostos a altas temperaturas. Entre 38 e 42°C foi observada perda de atividade significativa dentro de poucos meses ou mesmo semanas (DAVID & GARDINER, 1967; HUNTER *et al.*, 1973; LEWIS & ROLLINSON, 1978). Acima de 50°C, a atividade do patógeno é perdida em questão de horas ou minutos (JAQUES, 1977). Utilizando temperaturas de até 50°C, por duas horas, VALICENTE & CRUZ (1993) não observaram efeito sobre a virulência de *Baculovirus spodoptera*.

Quanto ao armazenamento de *Baculovirus* em ambiente, trabalhos realizados no Brasil apresentaram uma grande variação de resultados, consequência dos diferentes tipos de formulações e do período de tempo estudado. (MOSCARDI *et al.*, 1989; BATISTA FILHO *et al.*, 1991; CRUZ & VALICENTE, 1992; BATISTA FILHO *et al.*, 1994a).

Formulações líquidas (“flowable”) de *Baculovirus* têm apresentado dificuldades para a manutenção da viabilidade. Com exceção das formulações preparadas pelo processo de precipitação com acetona, as formulações secas têm demonstrado melhor desempenho quando comparadas ao tipo “flowable”, caso das formulações pós molháveis produzidas pela Sandoz, Inc. (YOUNG & YEARIAN, 1986).

Raros foram os trabalhos que avaliaram o efeito da umidade em formulações de *Baculovirus*. Em geral, a estabilidade das preparações virais aumenta à medida que decresce a umidade do produto (JAQUES, 1977; COUCH & IGNOFFO, 1981). Entretanto, existe relato de que o vírus de granulose de *Pieris rapae* foi mais estável quando armazenado úmido (DAVID, 1975). Temperaturas elevadas aceleraram os efeitos danosos da alta umidade.

TANADA & KAYA (1993) consideram que patógenos formulados como pós deveriam ser mantidos secos. Se esses produtos tornam-se úmidos durante o armazenamento haverá perda de virulência e também dificuldade na aplicação, devido à formação de grumos. Ao contrário, formulações contendo nematóides deverão ser mantidas em ambientes úmidos e, preferencialmente, refrigeradas.

Trabalhos com *B. thuringiensis* revelaram que a formulação pó seco ou pó molhável é mais estável que concentrados aquosos. Essa diferença é especialmente pronunciada em

altas temperaturas e elevada umidade. Em vários estudos ficou demonstrado que o nível de umidade é um fator crítico na estabilidade de pós molháveis. Temperaturas de 40°C ou menos, têm apresentado pouco efeito sobre a atividade se a umidade for mantida abaixo de 5% (COLLINS & COUCH²).

A concentração de íons hidrogênio é importante para a estabilidade das formulações de vírus durante o armazenamento. Alguns autores têm observado que *Baculovirus* é inativado por valores extremos de acidez ou alcalinidade e sugerem que o pH de uma formulação deveria ser próximo ao da neutralidade (IGNOFFO & GARCIA, 1966; GUDAUSKAS & CANERDAY, 1968; HARPAZ & RACCAH, 1978)

Os primeiros estudos mostraram que a atividade do VPN de *Heliothis* não foi afetada significativamente quando em suspensões com pH 4, 7 e 9 mas o vírus foi praticamente inativado quando exposto a pH 1,2 e 12,4 (IGNOFFO & GARCIA, 1966). GUDAUSKAS & CANERDAY (1968) observaram significativa perda de atividade para o mesmo patógeno mantido em suspensões com pH 2 e 12 enquanto considerável eficiência foi encontrada na faixa de pH variando de 5 a 9.

A interação entre temperatura e pH sobre vírus foi estudada por HAYASHI *et al.* (1970) quando concluíram que vírions extraídos do vírus de poliedrose citoplasmática (VPC) de *Bombyx mori* e conservados em suspensão com pH 11, não foram inativados na temperatura de 21°C mas o foram a 40°C.

As formulações podem aumentar ou inibir a alimentação da praga e provocam maior ou menor mortalidade em menor ou maior tempo. Devem possuir partículas de

² COLLINS & COUCH (informação pessoal, citada por COUCH & IGNOFFO, 1981).

tamanho adequado e fagoestimulantes, para assim garantir a ingestão das toxinas ou propágulos associados aos inertes pois, na maioria dos casos, há relação direta entre taxa de ingestão e eficiência do controle.

Em laboratório, ALLEN & PATE (1966) demonstraram que o vírus misturado com extrato de cabelo de milho aumentou a porcentagem de mortalidade de larvas de *Helicoverpa* quando comparado com a suspensão do patógeno em água. Significativa redução na população de *Heliothis zea* foi observada por McLAUGHLIN *et al.* (1971) em áreas tratadas com o VPN de *Helicoverpa*, formulado com iscas contendo óleo de semente de algodão.

BATISTA FILHO *et al.* (1992c) observaram que a área foliar consumida por lagartas de *A. gemmatilis* foi o dobro para os insetos que receberam folíolos tratados com *B. anticarsia* formulado em óleo de soja quando comparado com o vírus pó molhável.

Adjuvantes contendo componentes estimulantes de alimentação têm sido adicionados, em mistura de tanque, com *Baculovirus*, para utilização em campo, sendo mais estudados os açúcares e extratos de plantas (STACEY *et al.*, 1977; MONTOYA *et al.*, 1966, SMITH *et al.*, 1982, POTTER & WATSON, 1983). Os resultados dos testes foram variáveis e não conclusivos.

Observações de laboratório e campo mostraram que adjuvantes como sacarose e leite em pó, quando adicionados ao VPN de *Hyphantria cunea*, resultaram em maior aumento de mortalidade, enquanto a adição de melaço e farinha de semente de algodão não provocaram aumento da mortalidade (PRITCHETT *et al.*, 1980).

SMITH *et al.* (1982) estudaram o comportamento de diversos adjuvantes e concluíram que as formulações contendo mistura de farinha e óleo de milho e de farinha e óleo de soja foram superiores às formulações contendo somente óleo ou farinha.

BATISTA FILHO *et al.* (1985) observaram que preparações liofilizadas de *B. anticarsia* que continham leite em pó em sua composição, foram mais eficientes que as preparações liofilizadas sem este componente.

ALVES *et al.* (1992a) testaram o efeito fagoestimulante de um adjuvante baseado em óleo vegetal quando adicionado à suspensão aquosa de *B. anticarsia*. Os autores observaram que a diferença no consumo entre os folíolos de soja tratados com o vírus e adjuvante e vírus sem adjuvante foi pequena. Entretanto, essa diferença representou 0,27 cm² de área foliar, contendo $1,4 \times 10^4$ Corpos de Inclusão Poliédrica a mais do que foi ingerido pelos insetos. O maior consumo de partículas virais provocou a morte de 60% da população de insetos no 6º dia, enquanto no tratamento com o patógeno isolado, apenas 20% de indivíduos morreram nesse período.

Estudos desenvolvidos por IGNOFFO *et al.* (1976) e LUTRELL *et al.* (1983) com lagartas de *H. zea*, revelaram que os adjuvantes comerciais testados aumentaram significativamente o consumo de folíolos de soja tratados com *B. heliothis*, sem contudo provocar qualquer efeito sobre a mortalidade dos insetos.

Existem no mercado produtos fagoestimulantes para serem utilizados em mistura durante o preparo da calda, mas nem sempre os resultados têm aumentado a eficiência do bioinseticida.

A formulação deve distribuir o patógeno uniformemente e mantê-lo viável no ambiente pelo tempo necessário à sua ação, uma vez que a atividade do inseticida microbiano é influenciada pelos fatores ambientais (luz, temperatura, umidade e químicos) e pelo substrato (solo, planta, água).

Estudos em laboratório e em campo sugerem que a luz solar, em especial a porção ultravioleta do espectro, é provavelmente o fator que mais afeta a persistência de inseticidas microbianos, pois atua diretamente nos ácidos nucleicos, alterando-os ou mesmo destruindo-os, o que impede o crescimento e a multiplicação do microrganismo (CANTWELL, 1967; DAVID *et al.*, 1968; BULLOCK *et al.*, 1970; IGNOFFO & BATZER, 1971; MORRIS, 1971; ANGUS & LUTHY, 1971; SMIRNOFF, 1972; IGNOFFO *et al.*, 1977; JACQUES, 1985; POZSGAY *et al.*, 1987; KILLICK, 1990; IGNOFFO *et al.*, 1991; IGNOFFO & GARCIA, 1992; PAWAR *et al.*, 1995).

A tecnologia de aplicação tem dado especial atenção a esse aspecto e há um grande número de trabalhos sobre o assunto. Técnicas envolvendo microencapsulação e protetores contra a radiação ultravioleta para o VPN de *Heliothis* foram estudadas por IGNOFFO & BATZER (1971). Combinações não encapsuladas de vírus + carbono foram tão eficientes quanto combinações encapsuladas de vírus + carbono.

Por outro lado, BULL (1978) mostrou que formulações encapsuladas foram superiores às formulações comerciais do VPN de *Heliothis*, em relação à proteção contra a radiação ultravioleta; contudo, a produção de algodão com os dois tratamentos não foi estatisticamente diferente.

Além das formulações, têm havido tentativas para aumentar a fotoestabilidade de produtos à base de bactérias, fungos e vírus pela adição de compostos que absorvem ou refletem a luz ultravioleta.

Com esse objetivo vários materiais foram incorporados às formulações de entomovírus, entre os quais marcas registradas como Shade (Sandoz Inc.) e Tinopal DCS (CIBA-Geigy Corp.) (MARTIGNONI & IWAI, 1985).

COUCH & IGNOFFO (1981) revisaram uma ampla gama de adjuvantes com potencial para uso em inseticidas microbianos à base de vírus e outros entomopatógenos e observaram que, embora os aditivos tenham geralmente melhorado a persistência do vírus, houve pouca evidência de que a proteção da cultura no campo foi aumentada substancialmente.

SMITH *et al.* (1982) evidenciaram que preparações do vírus de *H. zea* incluindo polpa de citros, sementes de algodão e soja foram tão eficientes na proteção do patógeno à radiação ultravioleta quanto formulações dotadas de outros compostos protetores.

LEITE *et al.* (1993) observaram que o óleo mineral foi mais eficiente na proteção de conídios de *B. bassiana* expostos à radiação ultravioleta quando comparado ao óleo de soja e suspensões aquosas do patógeno.

ALVES *et al.* (1996) observaram que a melhor proteção à radiação foi alcançada usando 50% de óleo vegetal em formulações de *B. anticarsia*. Na menor concentração (10%) a redução de atividade do patógeno foi de 73%.

A utilização de óleos, algumas vezes, é limitada pela possibilidade de causar fitotoxicidade. Em alguns casos, o dano na folhagem pode ser tolerado, mas onde a folhagem é usada como alimento o resíduo de óleo não é conveniente.

Recentemente, foi ressaltado o papel de substâncias químicas utilizadas na fabricação de sabões, detergentes e amaciantes de roupas, como as do grupo dos “stilbenes”, em potencializar a virulência de *Baculovirus* (SHAPIRO & ROBERTSON, 1992).

A contribuição de outros fatores para inativação de viroses de insetos em condições de campo parece não ser tão significativa quando comparada à radiação solar. A umidade relativa do ar tem pouco efeito sobre o vírus (DAVID *et al.*, 1971). Contudo, a umidade proveniente do orvalho encontrado sobre a superfície das folhas pode reduzir a estabilidade do microrganismo. ANDREWS & SIKOROWSKI (1973) observaram que o orvalho depositado sobre as folhas de algodão possui pH alcalino (8,2 a 9,1) e que a exposição de *B. heliothis* ao orvalho das folhas resultou na perda de atividade do vírus. Estudos semelhantes foram desenvolvidos por YOUNG & YEARIAN (1974), YOUNG *et al.* (1977) e PODGWAITE *et al.* (1979).

A remoção de vírus das plantas pela ação da chuva e do vento tem sido pouco estudada. No caso de folhagens de couve, DAVID (1975) observou que pouco vírus são retirados das folhas pela simulação de chuva ou lavagem. Além das características físicas do vegetal, as formulações podem auxiliar na fixação do patógeno à planta.

ALVES *et al.* (1992b) sugerem que a incorporação de óleo de soja emulsionável (10%) a preparações impuras de *B. anticarsia* permitem maior aderência do vírus sobre os folíolos de soja.

Segundo BATISTA FILHO *et al.* (1992b), a presença de espalhante adesivo na concentração de 0,1% também proporcionou aumento na persistência de *B. anticarsia* formulado em pó molhável (Leucita), possivelmente, em razão da menor perda mecânica, já que espalhantes adesivos parecem prolongar o efeito residual (BULLOCK, 1967).

Os adesivos também podem ser utilizados na composição de formulações granuladas. Uma formulação contendo *B. thuringiensis* foi testada sobre plantas de algodão e mesmo após as chuvas, os grânulos permaneceram aderidos às plantas liberando, nas folhas, esporos e cristais do patógeno. Entretanto, deve-se ter cuidado ao se trabalhar com adesivos para formulações de fungos pois estes patógenos atuam por contato e a adesão demasiada dos conídios nas folhas reduz a eficiência do produto por impedir o contato entre o inseto e o patógeno. Em determinados casos, a preservação da umidade próxima do entomopatógeno é essencial após a sua aplicação no campo, principalmente no caso de aplicações foliares de nematóides, pois a perda de água pela evaporação reduz a viabilidade do agente (GLAZER *et al.*, 1992).

Baculovirus persistem por longos períodos no solo. Em geral, eles são inativados vagarosamente, ligam-se firmemente às partículas do solo e sofrem lenta lixiviação (HUKUHARA & NAMURA, 1971; HUKURARA & WADA, 1973). Quanto ao pH do solo, THOMAS *et al.* (1973) observaram que os solos de pH baixo inativaram mais

rapidamente o VPN de *Trichoplusia ni*, quando comparados a solos aproximadamente neutros.

Estudos sobre o recobrimento de poliedros de *B. anticarsia* com partículas coloidais (CaF_2 e atapulgita) através da heterocoagulação foram realizados por MEDUGNO *et al.* (1992). Tal revestimento, homogêneo e irreversível, pode prover uma proteção mais efetiva contra a radiação UV e o nível de proteção dependerá das propriedades de espalhamento de luz do mineral usado. Os autores argumentaram que uma possibilidade para explicar os resultados controversos sobre a eficácia de diferentes tipos de materiais protetores está no fato de que os depósitos podem ser redistribuídos pela chuva, separando o vírus do agente protetor. Ressaltam, ainda, que a maioria dos trabalhos refere-se à mistura do vírus com os mais diversos adjuvantes e que a integração físico-química entre as partículas não tem sido investigada.

Os processos de produção e formulação de entomopatógenos devem ser orientados também com base econômica. O preço do produto deve ser compatível com a realidade do mercado, em relação a inseticidas químicos e a demanda potencial, para que o bioinseticida possa tornar-se competitivo. Na implantação de unidades formuladoras de bioinseticidas, à semelhança dos agrotóxicos (BARRETO, 1977), deve ser considerada a localização, facilidade de transporte, fornecimento de energia elétrica e água. É necessária a edificação de prédio apropriado com a melhor distribuição possível das áreas de serviço, dotado de coletores e filtros para exaustão de pó ambiente e coletores de resíduos aquosos, além dos equipamentos necessários ao preparo dos diferentes tipos de formulações.

O controle de qualidade do material formulado deve incluir testes de atividade biológica e análises físicas. A análise biológica determina o teor de princípio ativo na formulação e sua viabilidade e os testes físicos garantem a estabilidade do produto quando das preparações da calda e aplicação a campo. No Brasil, os testes físicos são executados de acordo com a norma NBR-8511 da ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (1984).

Finalmente, a análise de risco (segurança ao homem) e avaliação do impacto ambiental dos entomopatógenos sobre organismos não-alvos, também são informações indispensáveis para fins de registros de produtos microbianos e têm sido objeto de atenção das autoridades federais (INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE, 1995).

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Obtenção de *Baculovirus anticarsia* semi-purificado

O processo de semi-purificação de *Baculovirus anticarsia* foi realizado nos laboratórios da Seção de Controle Biológico das Pragas do Instituto Biológico, pelo método de centrifugação diferencial.

O vírus foi obtido a partir de lagartas de *Anticarsia gemmatilis* produzidas e infectadas em laboratório, com inóculo inicial obtido junto ao Centro Nacional de Pesquisa de Soja da EMBRAPA em 1984 e mantido na coleção de microrganismos entomopatogênicos do Instituto Biológico sob a denominação CB-50.

Amostras dessas lagartas foram maceradas em água destilada e homogeneizadas em liquidificador. Em seguida, o material foi filtrado através de camadas de gaze pré-umedecida para a retirada do material mais grosseiro. O caldo obtido por esse processo foi então centrifugado durante 3 minutos a 3000 rpm. Posteriormente, o precipitado foi descartado e o sobrenadante, centrifugado a 8000 rpm, durante 20 minutos. O precipitado obtido à velocidade de 8000 rpm foi suspenso em água destilada e analisado

quanto à concentração dos poliedros. O número de corpos de inclusão foi calculado em câmara de Neubauer.

3.2 - Preparo das formulações

A partir das suspensões semi-purificadas, o *B. anticarsia* foi formulado nos laboratórios do Centro Piloto de Formulações de Defensivos Agrícolas do Instituto Biológico, sediado na Estação Experimental de Campinas, SP, sob as formas de pó molhável (PM) e óleo emulsionável (OE).

A formulação do tipo PM foi preparada mediante impregnação direta das suspensões de poliedros em caulim, inerte de origem mineral, associado a adjuvantes, entre os quais, agentes suspensor e molhante. Após a impregnação de todos os componentes, o material foi seco à temperatura ambiente e, em seguida, submetido à moagem em moinho a ar (micronizador). Nas Figuras 1 e 2 são apresentados, respectivamente, o fluxograma e os equipamentos utilizados para a produção da formulação PM.

A formulação OE foi preparada a partir da mistura da suspensão viral com óleo de milho refinado marca Mazola e, ainda emulsificante e composto gustativo. Após a mistura dos componentes, o material foi homogeneizado em um misturador/desintegrador. O esquema do processo e o equipamento utilizado estão nas Figuras 3 e 4, respectivamente.

Figura 1. Esquema simplificado do processo de formulação PM de *B. antiscarsia*.

Figura 2. Equipamentos utilizados no processo de formulação PM de *B. anticarsia*.

A - Misturador/Impregnador

B - Moinho de Martelos

C - Misturador

D - Moinho a Ar

Figura 3. Esquema simplificado do processo de formulação OE de *B. anticarsia*.

Figura 4. Homogeneizador utilizado no processo de formulação OE de *B. anticarsia*.

As formulações de *B. anticarsia* processadas apresentaram as seguintes composições e características:

Formulação PM - Caulim

Suspensão de corpos de inclusão poliédrica (CIP).....	200 g
Caulim	500 g
Outros inertes (sílica + talco)	100 g
Sacarose.....	150 g
Surfactante	25 g
Agente suspensor.....	25 g
Total.....	1000 g

Formulação OE - milho

Suspensão de corpos de inclusão poliédrica	200 g
Óleo de milho refinado	500 g
Emulsificante	50 g
Glicerina	50 g
Água destilada q.s.p.	1000 ml

Após elaboradas, as formulações foram analisadas fisicamente quanto granulometria, suspensibilidade, molhabilidade, umidade e pH (para o PM) e estabilidade da emulsão e pH (para o OE). Os testes foram executados de acordo com a norma NBR-8511 da ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (1984).

3.3 - Efeito do pH sobre a atividade do vírus

O trabalho foi realizado em duas etapas, utilizando-se, primeiramente, somente suspensões semi-purificadas do patógeno para se determinar a faixa de pH compatível com o vírus e, na segunda fase, empregou-se o patógeno formulado em OE.

3.3.1 - Efeito do pH sobre as suspensões semi-purificadas

Suspensões de *B. anticarsia* semi-purificadas através de centrifugação diferencial tiveram o pH ajustado para valores que variaram de 1 a 13. Para acidificação ou alcalinização das suspensões foram utilizados, respectivamente, HCl ou NaOH, ambos 0,5 e 1,0N, obtendo-se os seguintes valores: 1, 3, 5, 7, 9, 11 e 13. Como controle foi utilizada água destilada (pH 6,47), completando-se oito tratamentos. Cada tratamento foi repetido quatro vezes e em cada uma das repetições foram utilizadas 15 lagartas de *A. gemmatilis* com aproximadamente 1,3 cm de comprimento.

Após o ajuste das suspensões, amostras de 5 ml do material preparado foram acondicionadas em frascos de vidro transparente (capacidade 8 ml), lacrados com tampa plástica e armazenados em condições ambiente (temperatura = $27 \pm 1^\circ\text{C}$; UR = $65 \pm 2\%$ e fotofase de 14 horas). Imediatamente após o preparo das suspensões e 23 dias após o armazenamento, 4 frascos de cada tratamento foram retirados ao acaso e o conteúdo diluído em água destilada e aplicado com pipeta automática sobre a superfície de dieta artificial desprovida de formol e contida em tubo de vidro (2,5 cm de diâmetro x 8,5 cm

de altura). O patógeno foi aplicado na dose de $1,0 \times 10^4$ corpos de inclusão poliédrica/tubo de dieta. Decorrido o tempo necessário para secagem, as lagartas foram individualmente transferidas para os tubos e mantidas à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$; UR de 65% e fotofase de 14 horas.

O experimento foi realizado de forma inteiramente casualizada num delineamento fatorial, confrontando-se os diferentes valores de pH e a época de avaliação. Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas através do teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

3.3.2 - Efeito do pH sobre a formulação OE

Com o objetivo de avaliar o efeito do pH da formulação OE (OE-milho) sobre a atividade do vírus, foram considerados os seguintes tratamentos: a) *B. anticarsia* (OE-milho) pH 6,42; b) *B. anticarsia* (OE-milho) pH 8,00; c) *B. anticarsia* (OE-milho) pH 10,00; d) *B. anticarsia* semi - purificado pH 6,42; e) *B. anticarsia* semi-purificado pH 8,00; f) *B. anticarsia* semi-purificado pH 10,00; g) Testemunha (água destilada) pH 6,47.

Com exceção da Testemunha, de *B. anticarsia* (OE-milho) pH 8,00 e *B. anticarsia* semi-purificado pH 6,42, os demais tratamentos tiveram o pH ajustado pela adição de HCl e NaOH, 0,5 e 1,0N. Essas preparações, divididas em alíquotas de 5 ml, foram acondicionadas em frascos de vidro (capacidade 8,0 ml) lacrados com tampa plástica e armazenadas em estufa a 45°C . Essa temperatura é próxima da utilizada nos

estudos para se determinar a estabilidade de inseticidas químicos durante o armazenamento, segundo teste sugerido pela FAO (ROSENFELD, 1970).

As avaliações foram feitas quinzenalmente, durante 45 dias, através de bioensaios. Nessas ocasiões, eram retiradas da estufa, ao acaso, 4 amostras de cada tratamento, constituindo 4 repetições. Para cada repetição foram utilizadas 25 lagartas de *A. gemmatilis* com aproximadamente 1,3 cm de comprimento, totalizando 100 indivíduos por tratamento.

As formulações foram diluídas e inoculadas sobre a superfície de dieta artificial sem formol, contida em tubo de vidro (2,5 cm de diâmetro x 8,5 cm de altura) na concentração de $2,0 \times 10^5$ CIP/lagarta. Decorrido o tempo necessário para secagem, os insetos foram transferidos, individualmente, para os tubos e mantidos sob condições controladas de laboratório (temperatura = $26 \pm 1^\circ\text{C}$; UR = $65 \pm 5\%$ e fotofase = 14 horas).

O delineamento adotado foi inteiramente casualizado e os dados foram corrigidos pela fórmula de Abott e submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas através do teste de Tukey a 5% de probabilidade, de acordo com o delineamento fatorial, a fim de confrontar a proteção das formulações frente às condições do meio durante o tempo de armazenamento, comparando-se com a atividade do patógeno não formulado.

3.4 - Estabilidade de formulações de *B. anticarsia* em condições ambiente de armazenamento

O experimento consistiu de quatro tratamentos: a) *B. anticarsia* semi-purificado (obtido através de centrifugação diferencial); b) *B. anticarsia* (PM-Caulim); c) *B. anticarsia* (OE-Milho) e d) testemunha. As preparações líquidas foram acondicionadas em frascos de vidro e a formulação PM em sacos plásticos. Cada amostra continha 5 ml ou 5g de produto. O material foi armazenado em condições ambiente (armário de madeira), abrigado da luz e tendo no seu interior um termohigrógrafo para registro da temperatura e umidade relativa do ar.

Os testes de viabilidade foram realizados logo após a preparação e estocagem dos produtos e a cada 120 dias, até completar 20 meses. Nessas ocasiões, eram retiradas do armário, ao acaso, 3 amostras de cada tratamento, representando 3 repetições, cada uma das quais formadas por um grupo de 20 lagartas de *A. gemmatilis* no início do 4º instar (aproximadamente 1,5 cm de comprimento), totalizando 60 insetos por tratamento.

A técnica de inoculação do patógeno consistiu em aplicações, com o auxílio de pipeta automática de suspensões dos diferentes tratamentos sobre a superfície de dieta artificial (GREENE *et al.*, 1976) isenta de formol e acondicionada em tubos de vidro (2,5 cm de diâmetro x 8,5 cm de altura). Em cada tubo foram inoculados $2,0 \times 10^4$ corpos de inclusão poliédrica (CIP) e uma lagarta da soja. O ensaio foi conduzido sob condições controladas de laboratório (temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$; U.R. = $75 \pm 5\%$ e fotofase de 14 horas).

As avaliações das lagartas tratadas foram feitas diariamente até que atingissem a fase pupal. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, num esquema fatorial com a interação dos tratamentos x épocas. Os dados foram corrigidos pela fórmula de Abbott e submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas através do teste de Tukey a 5% de significância.

3.5 - Efeito da temperatura no armazenamento de *B. anticarsia* PM

Amostras da formulação PM de *B. anticarsia* foram mantidas em estufas para incubação em diferentes temperaturas durante 7 dias, acondicionadas em sacos de polietileno (5g/amostra) lacrados em seladora térmica e mantidos em câmaras incubadoras marca FANEM, reguladas para as temperaturas de 10, 20, 30, 40 e 50°C.

As avaliações do patógeno foram feitas imediatamente após o preparo das formulações e 7 dias depois de armazenadas. Nessas ocasiões, foram retirados ao acaso, 5 sacos provenientes de cada tratamento, e o conteúdo foi diluído em água destilada estéril. Com o auxílio de um pipetador automático, 0,05 ml de cada uma das suspensões foram distribuídas na superfície de dieta artificial mantida em tubo de vidro (8,5 cm de altura x 2,5 cm de diâmetro) na concentração de $2,3 \times 10^3$ CIP/tubo. A testemunha recebeu somente água destilada estéril à temperatura ambiente. Após a secagem, colocou-se no interior de cada tubo uma lagarta de *A. gemmatalis* com cerca de 1,5 cm de comprimento. Cada tratamento foi formado por um grupo de 100 insetos, subdivididos em 5 repetições de 20 indivíduos.

Os ensaios foram conduzidos sob temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$; UR = $65\% \pm 1$ e fotofase de 14 horas. Os insetos foram observados diariamente e os dados de mortalidade foram submetidos a análise de variância dos fatores temperatura, época e temperatura x época e as médias dos tratamentos comparadas através do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.6 - Sensibilidade das formulações à radiação ultravioleta em condições de laboratório

Este trabalho teve o objetivo de avaliar, preliminarmente, o grau de proteção conferido pelas formulações ao patógeno exposto à radiação UV de lâmpada germicida, portanto, livre de outros fatores que ocorrem concomitantemente em condições de campo (chuva, temperatura, etc.).

Foram coletados folíolos de soja, cultivar IAC-8, com aproximadamente 30 dias contados a partir do plantio e com área foliar média de 12 cm^2 . O material foi desinfestado com solução de hipoclorito de sódio 0,2% durante 5 minutos, lavado com água destilada e seco em papel toalha.

Após essas operações, lotes de 200 folíolos foram fixados com alfinetes em uma placa de isopor revestida com papel de filtro, ocupando uma área de 3000 cm^2 . A placa foi deixada, em posição vertical, no interior de uma câmara de pulverização (Figura 5), onde foram realizadas as aplicações dos tratamentos, diluídos em água destilada estéril

sob pressão constante (0,5 atm), no volume de 3 ml/aplicação ($1,0 \times 10^5$ CIP/ml) e concentração de $1,0 \times 10^2$ CIP/cm².

Figura 5. Câmara de pulverização contendo os folíolos fixados na placa de isopor.

Os tratamentos foram assim constituídos: *B. anticarsia* (PM-Caulim); *B. anticarsia* (OE-Milho); *B. anticarsia* semi-purificado e Testemunha (água destilada). Amostras contendo 100 folíolos de cada tratamento foram submetidas, após pulverização, à lâmpada germicida (radiação UV de 253,7 nm) durante 5 minutos, distante 25 cm da fonte de radiação. Os outros 100 folíolos foram somente pulverizados. Assim, cada tratamento e condição (irradiado ou não irradiado) foi repetido 4 vezes (25 folíolos/repetição).

Após os procedimentos anteriores, os folíolos foram colocados, individualmente, em tubos de vidro (8,5 cm de altura x 2,5 cm de diâmetro) contendo uma lagarta de *A. gemmatilis* no início do 4º instar (aproximadamente, 1,5 cm). Esse material foi então acondicionado em câmaras de germinação sob temperatura de 25°C e 14 horas de luz, durante 17 horas, tempo suficiente para que os insetos consumissem praticamente todo alimento. Após esse período, as lagartas foram transferidas para tubos de vidro contendo dieta artificial (GREENE *et al.*, 1976) e mantidas em condições de laboratório (temperatura = $27 \pm 1^\circ\text{C}$; U.R. = $68 \pm 2\%$ e fotofase = 14 horas).

Nas avaliações, foram consideradas a mortalidade de lagartas por vírus e por outras causas, pupas vivas e pupas mortas. Os valores de mortalidade provocada pelo patógeno foram submetidos à análise de variância num delineamento fatorial e as médias dos tratamentos comparadas através do teste de Tukey a 5% de probabilidade, visando-se comparar o efeito da radiação dentro e entre tratamentos.

3.7 - Persistência de três preparações de *B. anticarsia* em folhas de soja (cultivar IAC-8)

A proteção conferida ao patógeno pelas formulações contra a radiação solar e a lavagem provocada pelas chuvas foi avaliada em condições de campo. O ensaio foi instalado na Estação Experimental de Campinas do Instituto Biológico e constou de quatro tratamentos: *B. anticarsia* (PM-Caulim); *B. anticarsia* (OE-Milho); *B. anticarsia* impuro (macerado de lagartas infectadas e mortas) e testemunha (água). Foi adotado o delineamento estatístico de blocos ao acaso com quatro tratamentos e quatro repetições, sendo as parcelas formadas por 25 m² de cultura de soja do cultivar IAC-8. Entre as parcelas foram deixadas três linhas de bordadura e, entre blocos, uma faixa de separação de 4 metros.

As pulverizações tiveram início às 8:00 horas do dia 4 de janeiro de 1993 e foram realizadas com o auxílio de um pulverizador costal manual marca BRUDDEN P5. A concentração do patógeno e o volume da calda utilizada foram, respectivamente, 1,0 x 10¹¹ CIP e 200 litros de água por hectare. Decorridas duas horas após o início da pulverização, 25 folíolos situados no terço superior das plantas foram coletados em cada parcela e encaminhados ao laboratório de Patologia de Insetos da Seção de Controle Biológico das Pragas. O material foi individualizado em tubos de vidro (2,5 cm de diâmetro x 8,5 cm de altura), cada um contendo uma lagarta de *A. gemmatilis* no início do 4º instar. Para cada tratamento foram utilizados 100 indivíduos, distribuídos em 4 repetições de 25 insetos, mantidos no interior de uma câmara de germinação a 25°C,

U.R. próxima de 70% e fotofase de 14 horas (Figura 6). Após consumirem o alimento, as lagartas foram transferidas para tubos de vidro contendo dieta artificial e mantidas sob novas condições (temperatura = $27\pm 1^{\circ}\text{C}$; U.R. = $70\pm 5\%$ e fotofase = 14 horas). Passados 1, 3, 7 e 14 dias da instalação do ensaio, repetiram-se as operações de campo e laboratório com novas coletas de folíolos e fornecimento às lagartas criadas em laboratório, com procedimentos e condições idênticas ao do teste inicial.

Figura 6. Câmara de germinação contendo os folíolos provenientes do campo.

Os dados climatológicos, referentes às temperaturas máxima, mínima e média, número de horas de insolação e umidade relativa média, foram fornecidos pela Seção de Climatologia Agrícola do Instituto Agrônômico (IAC) e Estação Experimental de Campinas do Instituto Biológico (EEC/IB).

Para a avaliação, foi considerado o número de lagartas mortas pelo vírus, e os dados, corrigidos pela fórmula de Abott, foram submetidos à análise estatística segundo o delineamento experimental de parcelas subdivididas, utilizando o teste de Tukey com 5% de probabilidade, visando-se comparar as médias de interesse e a interação tratamento x época.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Testes físicos das formulações

A formulação PM apresentou índice de retenção de 0,55% na malha 200 (via úmida), o que significou que 99,45% das partículas passaram pela peneira de 200 malhas. Os materiais em que, no mínimo, 98% de partículas passem pela peneira de 200 malhas são considerados aprovados no teste pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados médios obtidos nas determinações das características físicas da formulação *Baculovirus anticarsia* pó molhável (PM).

Formulação	Granulometria	Suspensibilidade	Molhabilidade	Umidade	pH	
	malha - %	(%)	(segundos)	(%)	inicial	20
						meses
PM	200-99,45	53,25	20	1,02	9,41	7,73

A suspensibilidade do material foi de 53,25% e está adequada para formulações de produtos fitossanitários, pois os inseticidas devem possuir suspensibilidade mínima de 50%, conforme exigência para registro e renovação (BRASIL, 1985). Essa característica

é desejável para que haja rápida formação da suspensão e lenta deposição das partículas sólidas.

Pós molháveis de boa qualidade devem apresentar boa molhabilidade, ou seja, o tempo para que o material fique completamente molhado não deve exceder a 1 minuto. Assim, o bioinseticida ficou bem abaixo do limite permitido (20 segundos).

A umidade presente na formulação foi de 1,02%. Segundo JAQUES (1977) e COUCH & IGNOFFO (1981), as raras pesquisas sobre o efeito da umidade na inativação de *Baculovirus* sugerem que a estabilidade da preparação viral geralmente aumenta quando a umidade decresce. Foi observado que se a umidade for mantida abaixo de 5%, formulações pós molháveis de *Bacillus thuringiensis* são pouco afetadas, mesmo expostas a temperaturas de até 40°C (COLLINS & COUCH¹).

O pH, medido após o preparo das formulações, e 20 meses depois de armazenadas, variou de 9,41 a 7,73 respectivamente. Constatou-se leve acidificação com o decorrer do tempo, a qual pode ser explicada pela liberação de substâncias produzidas pelo metabolismo de outros microrganismos presentes na formulação.

Quanto à formulação oleosa, o pH manteve-se numa faixa próxima a neutralidade (7,65 - 6,72), considerada a mais adequada para o grupo dos *Baculovirus* por diversos autores (IGNOFFO & GARCIA, 1966; GUDAUSKAS & CANERDAY, 1968; HARPAZ & RACCAH, 1978). A estabilidade da emulsão foi completa e isenta de óleo após 1 e 2 horas conforme preconiza a legislação vigente (BRASIL, 1985) (Tabela 2).

¹ COLLINS & COUCH (informação pessoal, citada por COUCH & IGNOFFO, 1981).

Tabela 2. Resultados médios obtidos nas determinações do pH e da estabilidade da emulsão da formulação *B. anticarsia* óleo emulsionável (OE).

Formulação	pH		Estabilidade da emulsão			
	inicial	20 meses	inicial	1 hora	2 horas	20 meses
OE	7,65	6,72	completa	isenta de óleo	isenta de óleo	completa e isenta de óleo

4.2 - Efeito do pH sobre a atividade do vírus

As condições extremamente ácidas ou alcalinas provocaram uma drástica redução da atividade do patógeno (Tabela 3 e Figura 7), principalmente considerando-se que o efeito destrutivo ocorreu logo após o preparo dos materiais, quando a eficiência foi reduzida para apenas 10% de mortalidade de lagartas de *A. gemmatalis* (pH 1) e 5% (pH 13). Resultado similar foi obtido por NEISESS (1980), ao estudar o comportamento de preparações comerciais de *B. thuringiensis* na mesma faixa de pH. Para a suspensão com pH 11 observou-se uma redução significativa de 25% na mortalidade dos insetos após 23 dias. Os pHs 3, 5, 7 e 9 não afetaram a patogenicidade do vírus de poliedrose nuclear. Observações semelhantes foram apresentadas por IGNOFFO & GARCIA (1966) e GUDAUSKAS & CANERDAY (1968), indicando redução significativa de atividade para o VPN de *Helicoverpa zea* exposto a pH 1,2; 2,0; 12,0 e 12,4. Os autores também não observaram diferenças significativas de atividade para os valores de pH situados entre 4,0 e 9,0. Contudo, HARPAZ & RACCAH (1978) não detectaram efeito negativo sobre o

VPN de *S. littoralis* na faixa de pH 2,0 a 10,0 mas somente no pH 12,0 com perda de 75% de infectividade.

Tabela 3. Porcentagem de mortalidade de *Anticarsia gemmatalis* submetidas às suspensões de *Baculovirus anticarsia* com diferentes pH.

Tratamento	Tempo de armazenamento (dias)	
	0	23
S - pH 1	10,00 B a	1,66 C a
S - pH 3	100,00 A a	95,00 A a
S - pH 5	100,00 A a	98,33 A a
S - pH 7	100,00 A a	96,66 A a
S - pH 9	100,00 A a	91,66 A a
S - pH 11	100,00 A a	75,00 B b
S - pH 13	5,00 B a	6,66 C a
Testemunha (água pH 6,47)	0,00 C a	0,00 C a
CV (%)	8,147	

Médias seguidas pela letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

S = suspensão de vírus com $2,0 \times 10^5$ CIP/ml.

Figura 7. Porcentagem de mortalidade de *Anticarsia gemmatalis* submetidas às suspensões semi-purificadas de *Baculovirus anticarsia* com diferentes pH.

Segundo GUDAUSKAS & CANNERDAY (1968) e BULL *et al.* (1976), o VPN de *Heliothis* pode ser inativado, lentamente, entre pH 9 - 10, dependendo do tempo de exposição, o que provavelmente pode explicar a redução de 25% na atividade do patógeno (pH 11) após 23 dias de armazenamento. Outras pesquisas têm indicado que a remoção do vírus da superfície de plantas de algodão pela lavagem com água, resultou em dissolução dos poliedros devido às condições alcalinas da suspensão formada (pH 9,8) (YOUNG & YEARIAN, 1974, 1977). Estudos preliminares em nossas condições têm demonstrado a influência negativa dos pH 3 e 11, após 12 horas, com a diminuição do número de poliedros (BATISTA *et al.*, 1996).

Para *B. anticarsia* formulado em OE, na faixa de pH estudada (6,42 - 10,00), constatou-se diferença significativa na mortalidade de lagartas, aos 30 dias, apenas para o tratamento semi-purificado pH 10,00 que foi inferior aos demais (Tabela 4 e Figura 8).

Tabela 4. Porcentagem de mortalidade de *Anticarsia gemmatilis* submetidas ao *Baculovirus anticarsia* formulado com diferentes pH.

Tratamentos	Tempo de armazenamento (dias)			
	0	15	30	45
OE 6,42	100,00 A a	98,00 A a	31,66 A b	21,30 A b
OE 8,00	100,00 A a	88,00 A a	21,22 AB b	6,26 AB b
OE 10,00	100,00 A a	87,00 A a	37,01 A b	12,30 AB c
Semi-purif. 6,42	93,00 A a	93,00 A a	31,65 A b	15,77 AB c
Semi-purif. 8,00	98,00 A a	83,00 A a	20,22 AB b	6,09 AB b
Semi-purif. 10,00	100,00 A a	95,00 A a	13,78 BC b	11,43 AB b
Testemunha (água 6,42)	0,00 B a	0,00 B a	0,00 C a	0,00 Ba
CV (%)	17,14			

Dados corrigidos pela fórmula de Abott

Médias seguidas pela letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

Figura 8. Porcentagem de mortalidade de *Anticarsia gemmatilis* submetidas ao *Baculovirus anticarsia* formulado com diferentes pH.

Decorridos 30 dias de armazenamento a formulação oleosa possibilitou melhor preservação do vírus quando comparada à preparação semi-purificada, ambas no pH 10. Este valor de pH foi considerado crítico por BULL *et al.* (1976) para diferentes formulações do VPN de *Heliothis*.

4.3 - Estabilidade de formulações de *B. anticarsia* em condições ambiente de armazenamento

Aos 16 meses de armazenamento, as preparações líquidas não sofreram decréscimo significativo de atividade. O patógeno formulado em OE (milho), após os 20 meses de armazenamento, perdeu apenas 18,33% de eficiência, menos que a metade da

redução da atividade observada para o vírus suspenso em água (Semi-purificado) (Tabela 5 e Figura 9). Esse desempenho foi superior ao obtido por BATISTA FILHO *et al.* (1991) quando comparado à formulação OE (soja) que não alcançou 40% de atividade, após 12 meses de armazenamento em meio ambiente.

Tabela 5. Efeito do período de armazenamento e do tipo de preparação sobre a viabilidade de *Baculovirus anticarsia* determinado pela porcentagem de mortalidade de lagartas de *Anticarsia gemmatilis*.

Formulação	Período de armazenamento (meses)					
	0	4	8	12	16	20
Testemunha	0,00 B a	0,00 B a	0,00 C a	0,00 C a	0,00 C a	0,00 C c
Semi-purificado	98,33 A a	100,00 A a	98,33 A a	98,33 A a	95,00 A a	58,33 B c
PM	98,33 A a	100,00 A a	58,33 B b	11,67 B c	10,00 B c	5,00 C c
OE	98,33 A a	100,00 A a	98,33 A a	98,33 A a	93,33 A a	80,00 A b
CV (%)	9,278					

Dados corrigidos pela fórmula de Abott.

Médias seguidas pela letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

Figura 9. Mortalidade de lagartas de *Anticarsia gemmatilis* nos diferentes tratamentos em 20 meses de armazenamento.

A formulação PM apresentou comportamento bem diferente. A partir do oitavo mês, a atividade desta formulação foi reduzida consideravelmente, diferindo significativamente da suspensão concentrada e do OE. Para o PM, essa tendência de queda persistiu por 20 meses, quando então atingiu o menor valor (5%). Nesse caso, esse tipo de inerte mostrou-se incompatível com o patógeno, desativando-o, quase por completo já no primeiro ano, resultado muito inferior ao observado por BATISTA FILHO *et al.* (1991) que, no mesmo período de tempo (12 meses), obtiveram 71,2% de eficiência trabalhando com o vírus impregnado em talco. A leucita, outro mineral de argila, testado por BATISTA FILHO *et al.* (1994a) foi ainda mais eficiente na manutenção da atividade do microrganismo, que mesmo após 24 meses de armazenamento ainda permaneceu com 73,3% de sua capacidade infectiva original. Um dos fatores que pode ser considerado para essa baixa estabilidade é o pH da formulação, haja vista o caso do inerte leucita onde o valor ficou próximo de 6,0 enquanto para a formulação em caulim o pH foi de 9,4. Segundo GUDAUSKAS & CANNERDAY (1968), os entomovírus podem ser inativados lentamente, entre pH 9 e 10, dependendo do tempo de exposição, o que pode explicar o rápido decréscimo da atividade. MOSCARDI *et al.* (1989) trabalhando com *B. anticarsia* impregnado em lactose, chegaram ao final de 11 meses de armazenamento com apenas 6% de atividade.

Para o patógeno semi-purificado, a estabilidade foi significativamente afetada no vigésimo mês, verificando-se uma redução de 40% na mortalidade das lagartas. Esses resultados concordam com BATISTA FILHO *et al.* (1991), os quais obtiveram redução similar para o vírus armazenado, em condições semelhantes, por 12 meses. Entretanto, os

autores utilizaram doses menores do vírus/lagarta, o que pode explicar o decréscimo mais rápido da viabilidade. Por outro lado, MOSCARDI *et al.* (1989) verificaram, decorridos apenas 7 meses, redução de aproximadamente 50% na mortalidade de *A. gemmatalis*.

A atividade remanescente da formulação em OE (milho), representada pela capacidade de matar 80% das lagartas, após 20 meses de armazenamento em condições ambiente, enquadra-se dentro das exigências técnicas para viabilizar economicamente um produto microbiano, segundo COUCH & IGNOFFO (1981).

Quanto às condições de armazenamento, houve pouca variação da temperatura e da umidade relativa ao longo do período de experimentação (Tabela 6) registrando-se, ao final de 20 meses, as médias de 24,5 °C e 64,2 % respectivamente.

Tabela 6. Médias quadrimestrais de temperatura e umidade relativa observadas no interior do armário, durante o período de armazenamento das formulações (Maio/1991 - Dezembro/1992).

Quadrimestre	Temperatura (°C)	UR (%)
1°	23,7	62,5
2°	25,3	59,3
3°	26,0	66,5
4°	23,5	64,0
5°	25,0	69,0
Média	24,7	64,2

4.4 - Efeito da temperatura no armazenamento de *B. anticarsia* PM

O efeito adverso deste fator ficou evidenciado nos resultados dos materiais armazenados a 40 e 50°C, principalmente na maior temperatura, onde se constatou 76% de redução da mortalidade das lagartas submetidas ao patógeno mantido por apenas 7 dias nessas condições (Tabela 7 e Figura 10). DAVID & GARDINER (1967) também observaram que o NPV de *Pieris brassicae* não foi inteiramente inativado quando submetido à temperatura de 50°C por 5 dias, porém, após 10 dias nenhuma atividade foi encontrada. Os autores observaram ainda que o vírus foi completamente destruído à temperatura de 70°C por 10 minutos. Houve indícios de que o patógeno apresentou maior estabilidade às baixas temperaturas. Embora em menor intensidade, a temperatura de 40°C também provocou decréscimo significativo na capacidade infectiva de *B. anticarsia* a exemplo do observado por DAVID & GARDINER (1967).

Tabela 7. Porcentagem de mortalidade de lagartas de *Anticarsia gemmatilis* obtida pela aplicação da formulação de *Baculovirus anticarsia* PM (caulim) armazenada em diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Tempo de armazenamento (dias)	
	0	7
10	92,00 A a	96,00 A a
20	95,00 A a	100,00 A a
30	97,00 A a	99,00 A a
40	92,00 A a	80,00 B b
50	98,00 A a	22,00 C b
Testemunha ¹	0,00 B a	0,00 D a
CV (%)	9,502	

Médias seguidas pela letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

¹água destilada estéril, mantida em temperatura ambiente (25 ± 1°C)

Figura 10. Mortalidade de lagartas de *A. gemmatilis* provocada por *B. anticarsia* PM (caulim) armazenado em diferentes temperaturas.

HARPAZ & RACCAH (1978) realizaram um estudo, expondo o VPN de *Spodoptera littoralis* a essa mesma temperatura de 50°C durante 10 minutos e verificaram que o microrganismo reteve 80% da atividade original. Temperaturas acima de 90°C inativaram completamente o patógeno. Resultados semelhantes foram obtidos por GUDAUSKAS & CANERDAY (1968), porém, utilizando temperaturas de até 50°C, por duas horas, VALICENTE & CRUZ (1993) não observaram efeito sobre a virulência de *B. spodoptera*.

Considerando que nas três temperaturas mais baixas (10, 20 e 30°C) não foram constatadas alterações no desempenho do patógeno, é possível afirmar que o armazenamento da formulação, nessas condições e até 7 dias, permite o transporte seguro do bioinseticida até os locais de sua aplicação. Ressalta-se que pode haver a

necessidade de que o veículo transportador seja dotado de um sistema de isolamento térmico ou refrigeração para evitar que a temperatura ultrapasse a faixa próxima à 30°C. Considerando apenas esse fator, o vírus poderia apresentar boa estabilidade no campo, haja vista que as temperaturas médias registradas em algumas regiões são inferiores a 30°C. Contudo, é necessário frisar que, em condições de campo, a temperatura tem pouca influência na inativação do vírus, ao contrário da radiação ultravioleta, considerada por diversos autores como o principal fator responsável pela perda de atividade do entomopatógeno (CANTWELL, 1967; ANGUS & LUTHY, 1971; IGNOFFO *et al.*, 1977; KILLICK, 1990; IGNOFFO & GARCIA, 1992).

4.5 - Sensibilidade das formulações à radiação ultravioleta em condições de laboratório

Verificou-se que as diferentes preparações de *B. anticarsia* expostas à radiação UV apresentaram atividades significativamente reduzidas, independente dos seus componentes, o que demonstra a grande sensibilidade do patógeno a esse comprimento de onda (Tabela 8).

Tabela 8. Porcentagem de mortalidade de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* inoculadas com três preparações de *Baculovirus anticarsia*, submetidas à radiação ultravioleta de 253,7 nm.

Tratamento	UV	
	Não-Irradiado	Irradiado
PM	99 A a	37 A b
OE	98 A a	37 A b
Semi-purificado	92 A a	19 B b
Testemunha	0 B a	0 C a
CV (%)	11,278	

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna ou minúscula na linha não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Apesar da elevada redução da mortalidade das lagartas submetidas às preparações irradiadas, observou-se que as duas formulações (PM e OE) foram significativamente superiores à preparação semi-purificada. Pode-se concluir que a adição de óleo vegetal ou argila às suspensões de poliedros permitiu quase que dobrar a proteção ao microrganismo e, conseqüentemente, prolongar sua atividade (Figura 11). Utilizando o mesmo comprimento de onda (253,7 nm), JAQUES (1968, 1971) demonstrou a rápida inativação do VPN de *Trichoplusia ni* após a exposição de suspensões do vírus ao raios ultravioleta durante 10 minutos. Ao final desse período, somente 5% das lagartas morreram pela ação do patógeno irradiado. Por outro lado, o autor conseguiu prolongar a atividade do microrganismo quando adicionou às suspensões diferentes tipos de materiais, como a albumina de ovo em combinação com “India ink” que, mesmo após 60 minutos de exposição à radiação ultravioleta ainda mantiveram 74% da capacidade infectiva original do vírus.

Figura 11. Mortalidade de lagartas de *Anticarsia gemmatilis* inoculadas com três preparações de *Baculovirus anticarsia*, submetidas à radiação ultravioleta de 253,7 nm.

Resultados semelhantes também foram obtidos por SHAPIRO *et al.* (1983) para a suspensão purificada de *Baculovirus* (manutenção de 22% da atividade original depois de exposta à radiação UV), enquanto nas preparações onde houve adição de melão ou açúcar (sacarose) foi mantida a atividade em 41,6 e 48,1%, respectivamente. Para as formulações em pó (talco), IGNOFFO & GARCIA (1996) obtiveram 15,3% de persistência do vírus quando exposto à luz ultravioleta por 24 horas utilizando comprimento de onda de 365 nm, portanto, em tempos diferentes de exposição e, principalmente, no comprimento de onda situado na faixa da radiação solar (ultra-violeta próximo).

Embora muito diferentes química e fisicamente, o que indica que o mecanismo que conferiu a proteção possa ser diferente, as formulações oleosa (milho) e PM (caulim) apresentaram comportamento idêntico. JAQUES (1971) sugere que materiais orgânicos protegem o vírus através da absorção da luz ultravioleta na faixa germicida e também pela cor ou conteúdo protéico, haja vista as suspensões impuras (cruas) terem garantido certa proteção ao patógeno, mantendo-o por considerável período sobre a folhagem ao contrário das suspensões purificadas (DAVID & GARDINER, 1966; CANTWEEL, 1967; MOSCARDI, 1983).

A manutenção de depósitos ativos de vírus por 2 ou 3 dias a mais, provocada pela incorporação de adjuvantes às suspensões de poliedros ou por formulações elaboradas, visando principalmente a proteção contra a radiação UV, aumenta consideravelmente a eficiência do entomopatógeno a campo segundo MOSCARDI (1983).

4.6 - Persistência de três preparações de *B. anticarsia* em folhas de soja (cultivar IAC-8)

Foram calculadas as porcentagens de lagartas de *A. gemmatilis* mortas por *B. anticarsia*, em função da persistência dos diferentes tratamentos (Tabela 9).

Tabela 9. Porcentagem de mortalidade de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* por *Baculovirus anticarsia* em função da persistência de três preparações do patógeno sobre folhas de soja do cultivar IAC-8. Campinas, janeiro de 1993.

Tratamento	Dias após a aplicação				
	0	1	3	7	14
Testemunha ¹	0,00 B a	0,00 D a	0,00 D a	0,00 C a	0,00 C a
Impuro	98,00 A a	91,00 A ab	78,00 B b	44,90 B c	32,00 B c
PM	94,23 A a	42,18 B b	40,45 C b	40,21 B b	22,00 B c
OE	93,12 A a	93,33 A a	100,00 A a	61,83 A b	64,00 A b
CV (%)	4,563				

Dados corrigidos pela fórmula de Abbott.

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

¹ Água

Com base nos dados da Tabela 9 e com as informações sobre os dados climáticos obtidos durante a realização do trabalho (Tabela 10), elaborou-se a Figura 12, representando o comportamento das três preparações do patógeno durante o período de 14 dias, bem como os registros do número de horas de insolação e da precipitação pluviométrica.

Tabela 10. Dados climáticos obtidos durante o período de observação da persistência da atividade de *B. anticarsia* sobre folhas de soja do cultivar IAC-8. Campinas, janeiro de 1993.

Dias após a aplicação	HI ⁽¹⁾	U.R. média (%) ⁽²⁾	Temperatura (°C)			Precipitação (mm) ⁽³⁾
			Máxima	Média	Mínima	
04/01	7,5	94	31,8	20,4	26,1	49
05/01	4,1	97	28,0	20,4	24,2	12
06/01	7,5	98	30,2	19,8	25,0	8
07/01	8,6	97	31,0	19,2	25,1	13
08/01	2,8	91	27,2	19,2	23,2	0
09/01	1,5	98	28,8	19,0	23,9	0
10/01	0,1	96	23,2	19,4	21,3	44 ⁽⁴⁾
11/01	0,0	95	31,9	18,7	20,3	37
12/01	0,2	95	25,0	18,6	21,8	10
13/01	4,2	92	29,8	19,0	24,4	5
14/01	3,6	90	29,4	18,6	24,0	0
15/01	8,8	94	31,0	19,6	25,3	5
16/01	5,4	94	31,6	21,0	26,3	0
17/01	3,5	89	30,4	20,2	25,3	0
Média	4,13	94,36	28,52	19,51	24,01	13,07

Fonte: Seção de Climatologia Agrícola do Instituto Agronômico de Campinas

⁽¹⁾ - Horas de insolação

⁽²⁾ - Umidade Relativa

⁽³⁾ - Obtida na Estação Experimental de Campinas do Instituto Biológico

⁽⁴⁾ - Observado após a coleta dos folíolos

Figura 12. Persistência de três preparações de *B. anticarsia* sobre folhas de soja do cultivar IAC-8. Campinas, janeiro de 1993.

Confrontando-se os resultados apresentados (Tabela 10 e Figura 12), evidenciou-se que a formulação PM foi significativamente afetada pela precipitação ocorrida seis horas após a pulverização do patógeno no campo. A intensidade da chuva atingiu 49 mm/hora, suficiente para remover considerável parcela de vírus das folhas de soja. Naquela data, a redução da atividade do microrganismo foi pouco acima de 50%, enquanto que nos demais tratamentos não foram detectadas alterações significativas na eficiência do bioinseticida. Portanto, é muito provável que a acentuada queda na eficiência do microrganismo formulado em PM deveu-se, em grande parte, à remoção dos poliedros e das partículas da formulação pela ação da chuva. Essa hipótese pode ser evidenciada quando se examina o comportamento dos demais tratamentos nas primeiras 24 horas e também pelos resultados obtidos por BATISTA FILHO *et al.* (1992b) que estudando formulações pertencentes ao mesmo grupo e sem a ocorrência de chuvas, observaram que após 24 horas da aplicação, a formulação PM teve apenas 9% na redução da atividade e, da mesma forma, *B. anticarsia* em OE apresentou, nesse período, sua viabilidade preservada.

Por outro lado, OLIVEIRA & MOSCARDI (1984) concluíram que a precipitação pluviométrica, ao contrário da radiação solar, teve pouca influência sobre a manutenção de *B. anticarsia* sobre as folhas de soja. Entretanto, nesse caso, a quantidade de chuva registrada por dia esteve bem abaixo daquela observada neste trabalho, em especial no primeiro dia, o que pode explicar os resultados não concordantes.

Em estudos conduzidos com outros tipos de baculovírus também atribuíram à radiação solar e não à ação da chuva, os efeitos mais danosos à viabilidade (DAVID & GARDINER, 1966; BULLOCK, 1967).

Perdas significativas da atividade viral (31,29%) foram detectadas somente aos 7 dias para a formulação em óleo, enquanto já no primeiro dia a formulação PM sofreu redução de 52,05% de sua atividade original e a preparação impura perdeu 20% de eficiência no 3º dia. Portanto, a formulação OE apresentou desempenho superior às demais, permitindo a manutenção de maior quantidade de poliedros viáveis sobre as folhas de soja. O efeito protetor conferido pela formulação óleo pode ser visualizado já no 3º dia quando esta diferiu significativamente dos demais tratamentos, mantendo sua eficiência inalterada. Segundo ALVES (1992a), a alta persistência do patógeno nos primeiros três dias de exposição a campo pode estar associada, entre outros fatores, com o baixo número de horas de insolação. Corroborando tal observação, BATISTA FILHO *et al.* (1992d) estudaram a persistência de *B. anticarsia* formulado em óleo (soja) e verificaram que a atividade da formulação decresceu de forma semelhante à observada neste ensaio, contudo num ritmo mais acelerado, e os autores registraram uma média de 9,1 horas diárias de insolação que pode estar associada a maior rapidez da degradação do microrganismo, uma vez que no presente trabalho a média diária obtida foi de apenas 4,1 horas. Em ambos os testes as temperaturas médias ficaram próximas de 25°C.

Entre o 3º e o 7º dias de exposição do patógeno, foi constatado um decréscimo mais acentuado na mortalidade de lagartas tratadas com folíolos provenientes das áreas que receberam o vírus impuro e formulado em OE. Nesse período, ocorreram poucas

chuvas e a média do número de horas de insolação foi baixo (4 horas). Para a formulação PM não foi verificada queda de eficiência no período acima citado, o que pode reforçar a hipótese de que a redução inicial se deve à remoção pela chuva. Essa mesma conclusão é obtida quando se examina o comportamento das formulações entre 7 e 14 dias. Nesse período foram registrados 101 mm de chuva, concentrados, principalmente, no 7º e 8º dias, e, novamente, a formulação PM foi significativamente afetada em sua atividade, ao contrário do vírus em OE e da preparação impura.

A velocidade do decréscimo de atividade do vírus impuro, durante os 14 dias de observação, foi similar àquela observada por MOSCARDI (1983), que demonstrou o efeito protetor do material impuro em relação ao semi-purificado, pela presença de gorduras, proteínas e outros resíduos dos insetos a exemplo dos trabalhos de DAVID *et al.* (1968) e JAQUES (1971 e 1977).

Segundo MOSCARDI (1983), a manutenção da atividade da formulação OE, em níveis superiores a 50% após 7 dias, pode ser considerada adequada, uma vez que ocorre uma reposição natural do vírus no campo, decorrente da morte de lagartas a partir do 5º dia após a aplicação e também pela grande capacidade de recuperação foliar da cultura de soja frente ao ataque da praga. Ressalta-se, ainda, a contribuição dos artrópodos predadores e parasitóides na disseminação do patógeno, chegando a provocar focos primários da doença (FUXA *et al.*, 1993; MOSCARDI *et al.*, 1996).

Outro ponto importante a ser considerado é a possibilidade de se aplicar o produto formulado durante todo o dia, ao contrário das preparações impuras de *B. anticarsia*, que normalmente são aplicadas ao entardecer com vistas a minimizar os

efeitos da radiação ultravioleta, garantindo assim um maior número de horas de atividade do vírus. Esse fato foi comprovado por ALVES², quando estudou o efeito do horário de aplicação sobre a persistência do vírus, não observando nenhuma interferência sobre a atividade do bioinseticida aplicado às 8 e às 12 h, ao contrário da preparação impura. Durante o período de avaliação foi registrada a média de 5,2 horas insolação e apenas 2,5 mm de chuva/dia.

Também, cabe analisar as ponderações de JAQUES (1971) quando ressalta que um material que protege o vírus da luz ultravioleta, em testes de laboratório, pode não protegê-lo da luz solar e vice-versa, dependendo do mecanismo de proteção. Ainda dessa vez, a formulação OE teve comportamento semelhante nas duas condições de experimentação, ao contrário do vírus na forma PM que, em condições de laboratório, conferiu proteção ao patógeno exposto à radiação enquanto, no campo, outros fatores impediram que tivesse o mesmo desempenho.

² ALVES, L.F.A. (doutorando do Depto. de Entomologia da ESALQ/USP, Piracicaba) Comunicação pessoal. 1996.

CONCLUSÕES

O pH extremamente alcalino ou ácido desativou rapidamente preparações de *Baculovirus anticarsia* na forma semi-purificada.

A formulação óleo emulsionável foi altamente estável quando armazenada em condições de ambiente ($T = 24,7 \pm 1,3^{\circ}\text{C}$ e $\text{UR} = 64,2 \pm 4,9$).

O óleo de milho e os adjuvantes utilizados na formulação de *Baculovirus anticarsia* não afetaram a atividade do vírus.

A formulação pó molhável apresentou baixa estabilidade quando armazenada em condições de ambiente ($T = 24,7 \pm 1,3^{\circ}\text{C}$ e $\text{UR} = 64,2 \pm 4,9$).

Temperaturas acima de 40°C afetaram a atividade de *Baculovirus anticarsia* formulado em pó molhável.

As formulações de *Baculovirus anticarsia* em óleo emulsionável e pó molhável protegeram o patógeno contra a radiação ultravioleta .

Baculovirus anticarsia quando formulado em óleo emulsionável teve sua atividade prolongada em condições de campo.

A formulação óleo emulsionável apresentou boa estabilidade, razoável persistência e eficácia para a utilização no controle de *Anticarsia gemmatilis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, G.E.; PATE, T.L. The potential role of a feeding stimulant used in combination with the nuclear polyhedrosis virus of *Heliothis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 8, n.1, p.129-131, 1966.

ALVES, L.F.A.; BATISTA FILHO, A.; AUGUSTO, N.T.; ALVES, S.B. Efeito da concentração de óleo de soja na proteção de *Baculovirus anticarsia* à radiação ultravioleta. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5., Foz do Iguaçu, 1996. **Anais**: sessão de posters. Foz do Iguaçu: Embrapa,CNPSO, 1996. p. 249.

ALVES, L.F.A.; LEITÃO, A.E.F.; AUGUSTO, N.T., LEITE, L.G; BATISTA FILHO, A. Utilização de um adjuvante protetor contra a radiação solar e fagoestimulante em mistura com um vírus de poliedrose nuclear de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 59, n.1/2, p.23-27, 1992a.

- ALVES, L.F.A.; LEITÃO, A.E.F.; AUGUSTO, N.T.; LEITE, L.G.; BATISTA FILHO, A. Utilização de adjuvante em mistura com um vírus de poliedrose nuclear de *Anticarsia gemmatalis*. In SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 3., Águas de Lindóia, 1992. **Anais**. Águas de Lindóia: Embrapa,CNPMA, 1992b. p. 144.
- ANDREWS, G.L.; SIKOROWSKI, P.P. Effects of cotton leaf surface on the nuclear polyhedrosis virus of *Heliothis zea* and *Heliothis virescens* (Lep.: Noctuidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 22, n.2, p.290-291, 1973.
- ANGUS, T.A.; LUTHY, P. Formulation of microbial insecticides. In: BURGESS, H.D.; HUSSEY, N.W. (Ed.) **Microbial control of insects and mites**. London: Academic Press, 1971. p.623-628.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Metodologia de ensaios de defesivos agrícolas**: NBR-8511, São Paulo, ABNT, s.d.
- AUGUSTO, N.T.; BATISTA FILHO, A. Efeito de inertes do grupo do caulim sobre *Baculovirus anticarsia*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 4., Gramado, 1994. **Anais**: sessão de posters. Gramado: Embrapa,CPACT, 1994. p. 101.

AUGUSTO, N.T.; BATISTA FILHO, A.; ALVES, L.F.A. *Baculovirus anticarsia*: efeito de agentes tensoativos. In SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 3., Águas de Lindóia, 1992. **Anais**. Águas de Lindóia: Embrapa,CNPMA, 1992. p. 145.

AUGUSTO, N.T.; BATISTA FILHO, A.; ALVES, L.F.A. Efeito de inertes do grupo do talco sobre *Baculovirus anticarsia*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5., Foz do Iguaçu, 1996. **Anais**: sessão de posters. Foz do Iguaçu: Embrapa,CNPSo, 1996. p. 341.

AUGUSTO, N.T.; BATISTA FILHO, A.; SILVA, E.M. Formulação olesosa de *Baculovirus anticarsia*: compatibilidade de emulsificantes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 15., Caxambu, 1995. **Resumos**. Caxambu: UFLA, 1995. p. 353.

BARRETO, H.B.F. Centro Piloto de Formulações do Instituto Biológico e a sua contribuição para o desenvolvimento da tecnologia de formulações de defensivos agrícolas. **Biológico**, v. 43, n.3/4, p.84-90, 1977.

BATEMAN, R.P.; CAREY, M.; MOORE, D.; PRIOR, C. The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low humidities. **Annals of Applied Biology**, v. 122, n.1, p.145-152, 1993.

BATISTA, T.F.C.; BELARMINO, L.C.; BIANCHINI, C.J. Eficiência de *Baculovirus anticarsia* em suspensões preparadas com diferentes tipos de água e níveis de pH. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5., Foz do Iguaçu, 1996. **Resumos**. Foz do Iguaçu: Embrapa/CNPSo, 1996. p. 425.

BATISTA FILHO, A. Estudo sobre formulações de *Baculovirus anticarsia* em condições de laboratório e campo. Piracicaba, 1990. 72 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

BATISTA FILHO, A. Desenvolvimento de formulações de vírus entomopatogênicos. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5., Foz do Iguaçu, 1996. **Anais**: conferências e palestras. Foz do Iguaçu: Embrapa/CNPSo, 1996. p. 199-206.

BATISTA FILHO, A.; AUGUSTO, N.T. Eficiência do *Baculovirus anticarsia* formulado como óleo emulsionável, no controle de *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818. **Biológico**, v. 53, n.7/12, p.57-59, 1987.

BATISTA FILHO, A.; AUGUSTO, N.T. Formulações de *Baculovirus anticarsia*: resultados de pesquisas desenvolvidas no Instituto Biológico do Estado de São Paulo (1984-1992). In: CICLO DE PALESTRAS SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS, 3., Campinas, 1993. **Anais**. Campinas: Fundação Cargill, 1993. p. 67-72.

BATISTA FILHO, A.; CRUZ, B.P.B.; OLIVEIRA, D.A. Estudos preliminares relacionados ao emprego da liofilização como processo de preservação de *Baculovirus anticarsia*. **Biológico**, v. 51, n.10, p.263-269, 1985.

BATISTA FILHO, A.; CRUZ, B.P.B.; OLIVEIRA, D.A. Observações sobre a ação do *Baculovirus anticarsia*, liofilizado, em condições de campo. **Biológico**, v. 54, n.7/12, p.29-34, 1988.

BATISTA FILHO, A.; ALVES, S.B.; AUGUSTO, N.T.; CRUZ, B.P.B. Estabilidade de formulações de *Baculovirus anticarsia* óleo emulsionável e pó molhável em condições de laboratório. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 58, n.1/2, p.17-20, 1991.

BATISTA FILHO, A.; ALVES, S.B.; AUGUSTO, N.T.; CRUZ, B.P.B. Persistência de duas formulações de *Baculovirus anticarsia* sobre folhas de soja, em condições de campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, n.7, p.1005-1009, 1992b.

BATISTA FILHO, A.; ALVES, S.B.; AUGUSTO, N.T.; CRUZ, B.P.B. Efeito de duas formulações de *Baculovirus anticarsia* sobre o consumo foliar de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818. **Ecossistema**, v. 17, p.74-78, out.1992c.

BATISTA FILHO, A.; ALVES, S.B.; AUGUSTO, N.T.; CRUZ, B.P.B. Estabilidade de *Baculovirus anticarsia* formulado como pó molhável. **Ecossistema**, v. 19, p.30-39, out. 1994a.

BATISTA FILHO, A.; AUGUSTO, N.T.; CRUZ, B.P.B.; MACHADO, L.A. Utilização de *Baculovirus anticarsia* formulado como pós molháveis, no controle de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818, no campo. **Biológico**, v. 52, n.7/9, p.75-78, 1986.

BATISTA FILHO, A.; AUGUSTO, N.T.; TANZINI, M.R.; LEITÃO, A.E.F.. Efeito do processo de moagem na viabilidade dos conídios de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 5., São Paulo, 1992a. **Resumos**. São Paulo: Instituto Biológico, 1992a. p. 19.

BATISTA FILHO, A.; LEITE, L.G.; RAGA, A.; SATO, M.E. Enhanced activity of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. associated with mineral oil against *Cosmopolites sordidus* (Germar) adults. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 24, n.2, p.405-408, 1995.

BATISTA FILHO, A.; ALVES, L.F.A.; AUGUSTO, N.T.; LEITE, L.G.; ALVES, S.B.

Avaliação da persistência de duas formulações de *Baculovirus anticarsia* a campo e laboratório. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 21, n.3, p.453-462, 1992d.

BATISTA FILHO, A.; LEITÃO, A.E.F.; SATO, M.E.; LEITE, L.G.; RAGA, A. Efeito da associação *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. com óleo mineral, na mortalidade de *Cosmopolites sordidus* Germar (Coleoptera: Curculionidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 23, n.3, p.379-383, 1994b.

BRASIL. Leis, Decretos, etc. Portaria nº 6 de 08 de fev. 1985. Normas sobre o registro e renovação de registro de produtos fitossanitários ou defensivos agrícolas. Ministério da Agricultura. **Diário Oficial**, 15 de fev. 1985.

BULL, D.L. Formulations of microbial insecticides: microencapsulation and adjuvants. **Miscellaneous Publications of Entomological Society of America**, v. 10, n.5, p.11-20, 1976.

BULLOCK, H.R. Persistence of *Heliothis* nuclear polyhedrosis virus on cotton foliage. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 9, n.3, p.434-436, 1967.

BULLOCK, H.R.; HOLLINGSWORTH, J.P.; HARTSACK, A.W. Virulence of *Heliothis* nuclear polyhedrosis virus exposed to monochromatic ultraviolet irradiation. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 16, n.3, p.419-422, 1970.

CANTWELL, G.C. Inactivation of biological insecticides by radiation. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 9, n.1, p.138-140, 1967.

COUCH, T.L.; IGNOFFO, C.M. Formulation of insect pathogens. In: BURGESS, H.D. (Ed.) **Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980**. New York: Academic Press, 1981. p.621-634.

CRUZ, I.; VALICENTE, F.H. Efeito da formulação pó molhável do *Baculovirus* sujeita a diferentes condições de armazenamento sobre lagartas *Spodoptera frugiperda* de diferentes idades. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Milho e sorgo. **Relatório técnico anual - 1992**. Sete Lagoas, 1992. p.70.

DAVID, W.A.L. The granulosis virus of *Pieris brassicae* L. and relationship with its host. In: LAUFFER, M.A.; BANG, F.R.; MARAMOROSCH, K.; SMITH, K.M., ed. **Advances in Virus Research**. New York: Academic Press, 1975, p.111-123.

DAVID, W.A.L.; GARDINER, B.O.C. Persistence of granulosis virus of *Pieris brassicae* on cabbage leaves. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 8, n.2, p.180-183, 1966.

DAVID, W.A.L.; GARDINER, B.O.C. The effect of heat, cold, and prolonged storage on a granulosis virus of *Pieris rapae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 9, n.4, p.555-562, 1967.

DAVID, W.A.L.; GARDINER, B.O.C.; WOLLMER, M. The effects of sunlight on a purified granulosis virus of *Pieris brassicae* applied to cabbage leaves. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 11, n.3, p.496-501, 1968.

DAVID, W.A.L.; ELLABY, S.J.; TAYLOR, G. The stability of a purified granulosis virus of the European cabbageworm, *Pieris brassicae*, in dry deposits of intact capsules. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 17, n.2, p.228-233, 1971.

DULMAGE, H.; BURGERJON, A. Industrial and international standardization of microbial pesticides - II. Insect Viruses. **Entomophaga**, v. 22, n.2, p. 131-139, 1977.

DUNKLE, R.L.; SHASHA, B.S. Starch-encapsulated *Bacillus thuringiensis* a potential new method for increasing environmental stability of entomopathogens.

Environmental Entomology, v. 17, n.1, p.120-126, 1988.

FERNANDES, P.M. Controle microbiano de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitidae) utilizando *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Piracicaba, 1991. 114 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

FUXA, J.R.; RICHTER, A.R.; STROTHER, M.S. Detection of *Anticarsia gemmatilis* nuclear polyhedrosis virus in predatory arthropods and parasitoids after viral release in Louisiana soybean. **Journal of Entomological Science**, v. 28, n.10, p.51-60, 1993.

GAZZONI, D.L. **Manejo de pragas da soja: uma abordagem histórica**. Londrina: EMBRAPA, CNPSo, 1994, 72p. (EMBRAPA, CNPSo - Documentos, 78).

GLAZER, I.; KLEIN, H.; NAVOU, A.; NAKACHE, Y. Comparision of efficacy of entomopathogenic nematodes combined with antidisecants applied by canopy sprays against three cotton pests (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 85, n.5, p.1636-1641, 1992.

GOMEZ, S.A.; RUMIATTO, M. Controle de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818, com *Baculovirus anticarsia* aplicado, via aérea, com óleo de soja e melaço. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 11., Campinas, 1987. **Resumos**. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas, 1987. p. 153.

GOMEZ, S.A.; GOMES, V.; RUMIATTO, M. Campos piloto sobre aplicação aérea de *Baculovirus anticarsia* com óleo de soja, em baixa vazão, para o controle de lagarta da soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 11., Campinas, 1987. **Resumos**. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas. p. 152.

GREENE, G.L.; LEPLA, N.C.; DICKERSON, W.D. Velvetbean caterpillar: A rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, v. 69, n.4, p.487-488, 1976.

GUDAUSKAS, R.T.; CANERDAY, D. The effect of heat, buffer salt and H-ion concentration, and ultraviolet light on the infectivity of *Heliothis* and *Trichoplusia* nuclear-polyhedrosis viruses. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 12, n.3, p.405-411, 1968.

HARPAZ, I.; RACCAH, B. Nucleopolyhedrosis virus (NPV) of the Egyptian cottonworm, *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae): temperature and pH relations, host range and synergism. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 32, n.3, p.368, 1978.

HAYASHI, Y.; KAWARABATA, T.; BIRD, F.T. Isolation of a cytoplasmic-polyhedrosis virus of the silkworm, *Bombyx mori*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 16, n.3, p.378-384, 1970.

HUKUHARA, T.; NAMURA, H. Microscopic demonstration of polyhedra in soil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 18, n.1, p.162, 1971.

HUKUHARA, T.; WADA, H. Adsorption of polyhedra of a cytoplasmic virus by soil particles. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 20, n.3, p.309-316, 1973.

HUNTER, D.K.; HOFFMAN, D.F.; COLLIER, S.J. Pathogenicity of a nuclear polyhedrosis virus of the almond moth, *Cadra cautella*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 21, n.3, p.282-286, 1973.

IGNOFFO, C.M.; BATZER, O.F. Microencapsulation and ultraviolet protectants to increase sunlight stability of an insect virus. **Journal of Economic Entomology**, v. 64, n.4, p.850-853, 1971.

IGNOFFO, C.M.; GARCIA, C. The relation of pH to the activity of inclusion bodies of a *Heliothis* nuclear polyhedrosis. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 8, n.3, p.426-427, 1966.

IGNOFFO, C.M.; GARCIA, C. Combinations of environmental factors and simulated sunlight affecting activity of inclusion bodies of the *Heliothis* (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrosis virus. **Environmental Entomology**, v. 21, n.1, p.210-213, 1992.

IGNOFFO, C.M.; GARCIA, C. Simulated sunlight-UV sensitivity of experimental dust formulations of the nuclear polyhedrosis virus of *Helicoverpa/Heliothis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 67, n.2, p.192-194, 1996.

IGNOFFO, C.M.; HOSTETTER, D.L.; SMITH, D.B. Gustatory stimulant, sunlight protectant, evaporation retardant: three characteristics of a microbial insecticidal adjuvant. **Journal of Economic Entomology**, v. 69, n.2, p.207-210, 1976.

IGNOFFO, C.M.; SHASHA, B.S; SHAPIRO, M. Sunlight ultraviolet protection of the *Heliothis* nuclear polyhedrosis virus through starch-encapsulation technology.

Journal of Invertebrate Pathology, v. 57, n.1, p.134-136, 1991.

IGNOFFO, C.M.; HOSTETTER, D.L; SIKOROWSKI, P.P.; SUTTER, G.; BROOKS, W. Inactivation of representative species of entomopathogenic viruses, a bacterium, fungus and protozoan by an ultraviolet light source. **Environmental Entomology**, v. 6, n.3, p.411-415, 1977.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE. Registro de Agentes Microbianos de Controle de Organismos Nocivos. Minuta de Portaria (proposta final). Embrapa/CNPMA, Jaguariúna, 1995. 17 p.

JACQUES, R.P. The inactivation of the nuclear-polyhedrosis virus of *Trichoplusia ni* by ultraviolet radiation. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 14, p. 1161-1163, 1968.

JACQUES, R.P. Tests on protectants for foliar deposits of a polyhedrosis virus. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 17, n.1, p.9-16, 1971.

JACQUES, R.P. Stability of entomopathogenic viruses. **Miscellaneous Publications of Entomological Society of America**, v. 10, p.99-116, 1977.

- JACQUES, R.P. Stability of entomopathogenic viruses in the environment. In: MARAMOROSCH, K.; SHERMAN, K.E. (Ed.) **Viral insecticides for biological control**. New York: Academic Press, 1985. p. 285-360.
- KILLICK, H.J. Influence of droplet size, solar ultraviolet light and protectants, and other factors on the efficacy of baculovirus sprays against *Panolis flammea* (Schiff.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Crop Protection**, v. 9, p.21-28, feb. 1990.
- LEITE, L.G.; BATISTA FILHO, A.; MACHADO, L.A.; CARDOSO, C.L.; HAYASHI, M.S. Efeito do óleo de soja e do óleo mineral na proteção do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. contra a radiação ultravioleta de 2537Å. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 14., Piracicaba, 1993. **Resumos**. Piracicaba: FEALQ, 1993. p. 308.
- LEWIS, F.B.; ROLLINSON, W.D. Effect of storage on the virulence of gypsy moth nucleopolyhedrosis inclusion bodies. **Journal of Economic Entomology**, v. 71, n.5, p.719-722, 1978.
- LUTHY, P.; CORDIER, J.L.; FISCHER, H.M. *Bacillus thuringiensis* as a bacterial insecticide; basic considerations and application. In: KURSTAK, E. (Ed.) **Microbial and virus pesticides**. New York: Marcel Dekker, 1982. p. 35-74.

LUTTRELL, R.G.; YEARIAN, W.C.; YOUNG, S.Y. Effect of spray adjuvants on *Heliothis zea* (lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus included in a boll weevil bait. **Journal of Economic Entomology**, v. 76, n.1, p.162-167, 1983.

MACHADO, L.A., A. BATISTA FILHO, L.G. LEITE, E.M. DA SILVA. Possibilidade do controle biológico de coleobrocas. In: CICLO DE PALESTRAS SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS, 4., Campinas, 1995. **Anais**. Campinas: Instituto Biológico, 1995. p. 185-203.

MARESCA, F. Formulação de agrotóxicos. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE AGROTÓXICOS, 1., Curitiba, 1990. **Resumos**. Curitiba: Insituto de Tecnologia do Paraná, 1990. p. 19-41.

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

MARTIGNONI, M.E.; IWAI, P.J. Laboratory evaluation of new ultraviolet absorbers for protection of Douglas-fir tussock moth (Lepidoptera: Lymantriidae) *Baculovirus*. **Journal of Economic Entomology**, v. 78, n.4, p.982-987, 1985.

McLAUGHLIN, R.E.; ANDREWS, G.; BELL, M.R. Field tests for control of *Heliothis* spp. with a nuclear polyhedrosis virus included in a boll weevil bait. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 18, n.2, p.304-305, 1971.

MEDUGNO, C.C.; CASTRO, M.L. ; GONZALEZ, G. Etapas do desenvolvimento de uma formulação pó molhável para o *Baculovirus anticarsia*: secagem e caracterização da superfície do poliedro. In: ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE FORMULAÇÕES DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS, 2., Campinas, 1989. **Painéis**. Campinas: CATI.

MEDUGNO, C.C.; NAKANO, C.; GONZALEZ, G. Recobrimento de poliedros de *Baculovirus anticarsia* com partículas coloidais. **Pesticidas Revista Técnico Científica**, v. 2, n.2, p.23-35, 1992.

MONTOYA, E.L.; IGNOFFO, C.M.; McGARR, R.L. A feeding stimulant to increase effectiveness of and a field test with a nuclear polyhedrosis virus of *Heliothis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 8, n.3, p.320-324, 1966.

MORRIS, O.N. Effect of sunlight, ultraviolet and gamma radiation and temperature on the infectivity of nuclear polyhedrosis viruses. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 18, n.2, p.292-294, 1971.

MOSCARDI, F. Utilização de *Baculovirus anticarsia* para o controle da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis*., **Comunicado Técnico - EMBRAPA/CNPSo**, n.23, p.1-21, 1983.

MOSCARDI, F. Soybean integrated pest management in Brazil. **FAO Plant Protection Bulletin**, v. 41/42, p.91-100, 1993.

MOSCARDI, F.; SOSA-GOMEZ, D.R. Utilización de virus a campo. In: LECUONA, R.E. (Ed.) **Microorganismos patógenos empleados em el control microbiano de insectos plagas**. Buenos Aires: Talleres Gráficos Mariano, 1996. p. 261-76.

MOSCARDI, F.; POLLATO, S.L.B.; CORRÊA-FERREIRA, B.S. Activity of the *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus after passage through the digestive tract of predatory insects. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 25, n.2, p.315-320, 1996.

MOSCARDI, F.; LEITE, L.G.; BONO, I.S.; PARO, F.E. Estabilidade no armazenamento e atividade de *Baculovirus anticarsia* formulado sobre a lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA. 12., Belo Horizonte, 1989. **Resumos**. Belo Horizonte: EMBRAPA,CNPMS, 1989. p. 235.

NEILSON, M.M.; D.E., ELGEE. The effect of storage on the virulence of polyhedrosis virus. **Journal of Insect Pathology**, v. 2, n.2, p.165-171, 1960.

NEISESS, J. Effect of pH and chlorine concentration on activity of *Bacillus thuringiensis* tank mixtures. **Journal of Economic Entomology**, v. 73, n.2, p.186-188, 1980.

NICKLE, W.R.; CONNICK JR., W.J.; CASTELO, W.W. Effects of "Paste-Pelletized" *Steinernema carpocapsae* (All) on western corn rootworms and Colorado potato beetles. **Journal of Nematology**, v. 26, n.2, p.249-250, 1994.

OLIVEIRA, R.F.; MOSCARDI, F. Persistência de *Baculovirus anticarsia*, *Nomuraea rileyi* e *Bacillus thuringiensis* sobre folhas de soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 9., Londrina, 1984. **Resumos**. Londrina: Embrapa,CNPSo, 1984. p. 144.

PAWAR, V.M.; THOMBRE, U.T.; CHAUDHARI, D.G. Effectiveness of baculoviruses as influenced by different additives. In; CHESTER, L.F. (Ed.) **Adjuvants for agrichemicals**. Boca Raton: CRC Press, 1995. p. 681-688.

PODGWAITE, J.D.; SHIELDS, K.S.; ZERILLO, R.T.; BRUEN, R.B. Environmental persistence of the nucleopolyhedrosis virus of the gypsy moth, *Lymantria dispar*.

Environmental Entomology, v. 8, n.3, p.528-533, 1979.

POLON, J.A. Formulation of pesticidal dusts, wettable powders and granules. In: VALKENBURG, W.V. (Ed.) **Pesticide Formulations**. New York: Marcel Dekker, 1973. p. 143-234.

POTTER, M.F.; WATSON, T.F. Garbanzo bean as a potential feeding stimulant for use with a nuclear polyhedrosis virus of the tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae).

Journal of Economic Entomology, v. 76, n.3, p.449-451, 1983.

POZSGAY, M.; FAST, P.; KAPLAN, H.; CAREY, P.R. The effect of sunlight on the protein crystals from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 and NRD12: a raman spectroscopic study. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 50, n.3, p.246-253, 1987.

PRIOR, C.; JOLLANDS, P.; PATOUREL, G.L.E. Infectivity of oil and water formulations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to the cocoa weevil pest *Pantorhytes plutus* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 52, n.1, p.66-72, 1988.

PRITCHETT, D.W.; YOUNG, S.Y.; YEARIAN, W.C. Efficiency of *Baculovirus* against field populations of fall webworm, *Hyphantria cunea* Drury. **Journal of Georgia Entomological Society**, v. 15, p.332-336, 1980.

RHODES, D.J. 1993. Formulation of biological control agentes. In: JONES, D.G. (Ed.) **Exploitation of microorganisms**. New York: Chapman & Hall, 1993, p. 411-439.

ROSENFELD, C. **Como avaliar as formulações de pesticidas**: manual preparado durante o Projeto UNDP/SP, BRA-24, São Paulo: Instituto Biológico; FAO, 1970. 78p.

SHAPIRO, M.; ROBERTSON, J.L. Enhancement of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) baculovirus by optical brightenes. **Journal of Economic Entomology**, v. 85, n.4, p. 1120-1124, 1992.

SHAPIRO, M.; AGIN, P.P.; BELL, R.A. Ultraviolet protectants of the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nucleopolyhedrosis virus. **Environmental Entomology**, v. 12, n.3, p. 982-985, 1983.

- SMIRNOFF, W.A. The effect of sunlight on the nuclear polyhedrosis virus of *Neodiprion swainei* with measurement of the solar energy received. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 19, n.2, p.179-188, 1972.
- SMITH, D.B.; HOSTETTER, D.L.; PINNELL, R.E.; IGNOFFO, C.M. Laboratory studies of viral adjuvants: formulation development. **Journal of Economic Entomology**, v. 75, n.1, p.16-20, 1982.
- STACEY, A.L.; YEARIAN, W.C.; YOUNG, S.Y. Evaluation of *Baculovirus heliohtis* with feeding stimulants for control of *Heliothis* larvae on cotton. **Journal of Economic Entomology**, v. 70, n.6, p.779-784, 1977.
- STOTZKY, G. Influence of clay minerals on microorganisms II. Effect of various clay species, homoionic clays, and other particles on bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 12, p.831-848, 1966a.
- STOTZKY, G. Influence of clay minerals on microorganisms. III. Effect of particle size, cation exchange capacity, and surface area on bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 12, p.1235-1246, 1966b.

STOTZKY, G.; REM, L.T. Influence of clay minerals on microorganisms. I. Montmorillonite and kaolonite on bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 12, p.547-563, 1966.

STOTZKY, G.; REM, L.T. Influence of clay minerals on microorganisms. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 13, p.1535-1550, 1967.

TANADA, Y.; KAYA, H. **Insect pathology**. London: Academic Press, 1993. 666 p.

THOMAS, E.D.; REICHELDERFER, C.F.; HEIMPEL, A.M. The effect of soil pH on the persistance of cabbage looper nuclear-polyhedrosis virus in soil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 21, n.1, p.21-25, 1973.

VALICENTE, F.H.; CRUZ, I. Efeito do tempo de armazenamento em temperatura ambiente sobre o *Baculovirus spodoptera* na mortalidade da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 13., Piracicaba, 1993., **Resumos**. Piracicaba: FEALQ, 1993. p. 333.

WARD, M.G. Formulation of biological insectides surfactant and diluent selection. In SCHER, M.B. (Ed.) **Advances in pesticide formulation technology**. Washington: American Chemical Society, 1984. p. 175-184.

WOODRING, J.L.; KAYA, H.K. Steneir nematid and heterorhabdit nematodes. A hand of biology and techiques. (Arkansas Agricultural Experimental Station), 1988. 28 p. Southern Cooperative Series Bulletin, 331).

WRAIGHT, S.P.; BRADLEY, C.A. Production, formulation, and application technologies for use of entomopathogenic fungi to control field crop pests. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5., Foz do Iguaçu, 1996. **Anais:** (conferências e palestras). Foz do Iguaçu: EMBRAPA,CNPSo, 1996. p. 170-177.

YOUNG, S.Y; YEARIAN, W.C. Formulation and application of baculoviruses. In: GRANADOS, R.R.; FEDERICI, B.A. (Ed.) **The biology of Baculoviruses**. Boca Raton: CRC Press, 1986. v. 2, p. 157-179.

YOUNG, S.Y; YEARIAN, W.C. Persistence of *Heliothis* NPV on foliage of cotton, soybean, and tomato. **Environmental Entomology**, v. 3, p.253-255, 1974.

YOUNG, S.Y; YEARIAN, W.C.; KIM, K.S. Effect of dew from cotton and soybean foliage on activity of *Heliothis* Nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 29, n.1, p.105-111, 1977.