

Seleção de compostos para fotoestabilização de formulação de *Beauveria bassiana* LCB63 para o controle de *Dactylopius opuntiae* nas condições do Semiárido brasileiro

Selection of compounds for stabilization of formulation of *Beauveria bassiana* LCB63 for control of *Dactylopius opuntiae* under the Brazilian Semiarid conditions

Tamires da Silva¹; Poliane de Sá Santos²; Maria Aparecida Queiroz da Silva³; Carlos Alberto Tuão Gava⁴

Resumo

A cochonilha-do-carmim (*Dactylopius opuntiae*) tem causado severos danos ao cultivo da palma no Semiárido brasileiro. O controle biológico utilizando fungos entomopatogênicos tem se mostrado uma alternativa viável para introdução no manejo integrado da praga, no entanto as condições climáticas do Semiárido são muito restritivas ao controle microbiano, demandando o desenvolvimento de formulações adequadas. Assim, este trabalho teve por objetivo selecionar compostos fotoprotetores efetivos e compatíveis para a formulação de conídios de *Beauveria bassiana* LCB63. Em um primeiro experimento, avaliou-se o

¹ Bolsista PIBIC/CNPq.

² Estudante de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária, FCAV-UNESP.

³ Estudante de Biologia – UPE, Petrolina, PE.

⁴ Pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE. E-mail: gava@cpatsa.embrapa.br.

efeito de doses dos diferentes compostos sobre a germinação de conídios em meio de cultivo. No segundo experimento, avaliou-se a fotoproteção conferida por Neo Heliopan AV (Metoxicinamato de octila), Neo Heliopan E1000 (Metoxicinamato de isoamila) (Symrise Inc.) e Oxibenzona (Sigma Inc.) e de amido e leite em pó desnatado, em exposição direta a radiação UV. Nenhum dos fotoprotetores sintéticos apresentou efeito deletério sobre a germinação dos conídios nas dosagens avaliadas. Os fotoprotetores hidrossolúveis apresentaram efetividade limitada a um tempo de exposição inferior a 2 horas. Em exposição superior, os fotoprotetores sintéticos apresentaram resultados superiores ao controle e aos fotoprotetores hidrossolúveis. Os melhores resultados foram obtidos com a aplicação dos derivados do ácido metoxicinâmico.

Palavras-chave: controle microbiano, fotoprotetores, cochonilha-do-carmim.

Introdução

Isolados dos fungos entomopatogênicos como *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* apresentaram resultados promissores para o controle de *D. opuntiae* (BRITO et al., 2008). No entanto, em condições de campo a eficácia de inseticidas biológicos se reduz de modo acentuado, já que o processo patogênico depende de uma série de fatores ambientais como temperatura, umidade relativa do ar, exposição à radiação solar direta, principalmente aos raios ultravioletas, saturação de água, fatores fungistáticos e outros (REIS et al., 2005). Estratégias de controle biológico em condições adversas requerem o desenvolvimento de formulações capazes de proteger os conídios dos efeitos deletérios provocados pelo ambiente.

A tolerância à exposição à radiação UV é variável entre as espécies de fungos entomopatogênicos. Uma avaliação realizada por Fernandes et al. (2007) identificou variabilidade genética quanto à resistência aos raios UV-B entre isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* expostos a uma fonte artificial de radiação. Aparentemente, a existência e o grau de resistência estão associados à origem geográfica dos isolados, já que isolados oriundos de latitudes mais baixas apresentaram menor suscetibilidade à exposição (BRAGA et al., 2001; LELAND et al., 2005; FERNANDES et al., 2007).

O resultados positivos têm sido obtidos quanto à associação de fotoprotetores às formulações a serem utilizadas em campo que aumentam a tolerância dos conídios à radiação ultravioleta A e B (EDGINGTON et al., 2000). Alves et al. (1998), sugeriram que a maioria dos conídios de fungos entomopatogênicos podem ser encapsulados por óleo emulsionável, que lhes confere proteção contra efeitos deletérios da radiação solar. Considera-se um fotoprotetor eficaz aquele que apresente maior espectro de proteção de radiação, principalmente de comprimento de onda entre 290 a cerca de 370-400nm (GALENA, 2008). Atualmente, há uma série de fotoprotetores sintéticos, classificados como filtros químicos, e uma variedade de compostos de baixo custo que apresentam potencial para o uso em formulações de bioinseticidas como argila, farinha, carvão e materiais fluorescentes como opções de filtros físicos (EDGINGTON et al., 2000).

O objetivo deste trabalho foi selecionar fotoprotetores compatíveis com *B. bassiana* LCB63 para a obtenção de formulações de bioinseticida resistente à radiação UV natural para a aplicação no controle de *D. opuntiae* nas condições do Semiárido nordestino.

Material e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, e o isolado utilizado foi LCB63 de *Beauveria bassiana*, anteriormente selecionado quanto à patogenicidade e virulência à cochonilha-do-carmim no Semiárido nordestino.

Para obtenção do inóculo, o fungo foi cultivado em meio de Batata Dextrose Ágar (BDA) e incubado em BOD a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, no escuro, durante 15 dias. Uma suspensão de conídios foi obtida de placas densamente colonizadas, utilizando-se como dispersante uma solução de Triton X-100 a 0,05% que foi inoculada em erlenmeyers contendo 100 mL de arroz parboilizado autoclavado com 50% de umidade e incubado em câmara de incubação a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 10 dias para obtenção da matriz. Após a esporulação, 10 g do substrato foram transferidos para sacos de plástico contendo arroz autoclavado com 50% de umidade e dispostos em câmara asséptica para crescimento e esporulação por mais 10 dias. Em seguida, a mistura de substrato + propágulos foi transferida para estufa de desidratação com circulação forçada de ar a 35°C até atingir teor de umidade em torno de 10%. Após a desidratação os conídios foram separados dos grãos utilizando-se um coletor de esporos Mycoharvester M5 (ACIS R&D, Devon, UK). Um concentrado técnico

para a formulação foi obtido adicionando-se os conídios a óleo de milho a uma densidade de 10^9 conídios. mL⁻¹.

No primeiro experimento, avaliou-se o efeito de diferentes concentrações dos fotoprotetores lipossolúveis Neo Heliopan AV – NHAV (Metoxicinamato de octila), Neo Heliopan E1000 – NHE1000 (Metoxicinamato de isoamila) (Symrise Inc.) e Oxibenzona (Sigma Inc.) e dos hidrossolúveis amido e leite em pó desnatado, sobre a germinação dos conídios em meio de cultivo BDA (Difco). Após a definição da compatibilidade dos fotoprotetores, foi realizado um segundo experimento para avaliação da fotoproteção oferecida pelos diferentes fotoprotetores à germinação de conídios de *B. bassiana* LCB63 em intervalos crescentes (0 min, 60 min e 120 min.) de exposição à radiação solar natural.

A germinação foi avaliada segundo o método adaptado de Marques et al. (2004), no qual alíquotas de 90 μ L das suspensões foram espalhadas com alça de Drigalsky sobre o meio de cultura BDA distribuído em fina camada sobre lâminas de microscopia autoclavadas. No caso do controle com Triton X-100 a 0,05%, pipetaram-se 150 μ L da suspensão em cada lâmina. A seguir, estas lâminas foram incubadas a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 16 horas e uma solução de ácido láctico e azul de metileno foi utilizada para interromper o processo germinativo. A contagem de conídios foi realizada utilizando-se um microscópio ótico (Zeiss, Germany) com aumento de 400 vezes, contando-se no mínimo 450 conídios por lâmina. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com três repetições por tratamento.

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos no experimento para avaliação da compatibilidade de *B. bassiana* LCB63 aos diferentes fotoprotetores indicaram que não houve efeito significativo ($F_{2,46} = 2,708$; $p = 0,077$) das concentrações utilizadas dos fotoprotetores sobre a taxa de germinação dos conídios (Figura 1). Neste experimento, foram avaliados apenas os compostos sintéticos, com potencial para apresentação de efeito tóxico aos conídios ou tubos germinativos. No entanto, mesmo com a adição da dose mais elevada dos produtos ao meio de cultivo, foram observadas taxas de germinação superiores a 80%.

Os fotoprotetores ou filtros solares agem refletindo ou absorvendo a energia das ondas de radiação UV. No último caso, a energia é dissipada

como calor ou quebra de ligações químicas, reduzindo os danos sobre a membrana celular e de organelas causados pela radiação (BURGES, 1998). No caso de desenvolvimento de formulações para produtos agrícolas, um fotoprotetor adequado deve apresentar alta capacidade de proteção e estabilidade por algumas horas após a pulverização no campo, passível de ser utilizado em baixa concentração e economicamente viável (EDGINGTON et al., 2000).

De forma geral, os fotoprotetores utilizados ofereceram proteção efetiva contra a radiação UV (Tabela 1), com a manutenção da viabilidade significativamente superior ao tratamento testemunha. Aos 120 minutos de exposição à UV natural, houve forte diminuição da viabilidade para todos os tratamentos, com a testemunha apresentando germinação zero. Os fotoprotetores lipossolúveis apresentaram maior proteção aos conídios ($p < 0,005$), com taxas de germinação significativamente superiores aos tratamentos controle e fotoprotetores lipossolúveis. Neste contexto, um segundo experimento para avaliação da capacidade de proteção ao longo do tempo foi realizado, utilizando-se uma concentração de 1% dos fotoprotetores, concentração esta de baixo impacto no custo final de uma formulação.

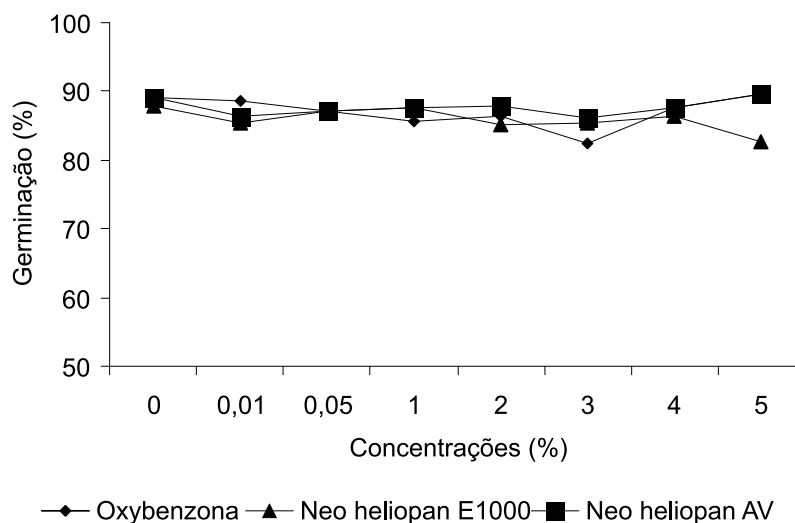


Figura 1. Efeito de doses crescentes de diferentes fotoprotetores sobre a germinação de conídios do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* LCB63.

No experimento para avaliação da eficiência de fotoproteção ao longo do tempo em exposição prolongada à radiação solar natural, verificou-se efeito significativo da adição dos fotoprotetores e do tempo de exposição sobre a taxa de germinação dos conídios ($F_{6,126} = 8,931$, $p < 0,001$). De forma similar ao primeiro experimento, os fotoprotetores não tiveram efeito deletério sobre a germinação nas concentrações utilizadas, como pode ser observado nos tratamentos sem exposição ($F_{6,126} = 1,542$; $p = 0,106$). Após 60 e 120 minutos, os produtos já demonstravam efeito de proteção aos conídios conforme o aumento da exposição à radiação solar ($F_{6,126} = 8,513$; $p = 0,001$ e $F_{6,126} = 28,214$; $p = 0,000$, respectivamente).

A partir dos resultados obtidos, verificou-se que todos os compostos utilizados apresentaram efetiva fotoproteção em curto período, como pode ser observado para o tempo de 60 minutos. Neste período, todos os fotoprotetores diferiram significativamente do tratamento controle, porém não se distinguiram entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). Aos 120 minutos de exposição, a taxa de germinação do tratamento controle atingiu zero e todos os fotoprotetores destacaram-se significativamente deste (Tukey, $p < 0,05$). No entanto, a taxa de germinação apresentada pelo amido e leite foram significativamente inferiores aos fotoprotetores sintéticos ($p > 0,05$).

Tabela 1. Influência da radiação solar sobre a germinação de *Beauveria bassiana* LCB63 sob ação de fotoprotetores na concentração de 1%.

Produto	Tempo de exposição (min.)		
	0	60	120
Triton	81,87 ± 6,39 b	49,40 ± 6,51 b	0 ± 00 c
Amido	88,30 ± 4,70 ab	78,00 ± 9,19 a	11,19 ± 7,07 b
Leite	85,27 ± 6,60 b	77,36 ± 7,79 a	16,03 ± 5,29 b
Neo Heliopan AV	86,48 ± 3,66 ab	71,55 ± 8,92 a	41,31 ± 11,61 a
Neo Heliopan E 1000	91,45 ± 1,77 ab	74,22 ± 8,83 a	41,45 ± 8,14 a
Oxibenzona	93,87 ± 1,24 a	76,26 ± 4,45 a	34,61 ± 9,28 a

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não são significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Conclusões

Os compostos testados apresentam potencial fotoprotetor para a aplicação na formulação de bioinseticida a base de conídios de *Beauveria bassiana* LCB63, não apresentando efeito deletério sobre a sua germinação. Na dose testada, os compostos derivados do ácido metoxicinâmico apresentaram a maior taxa de fotoproteção dos conídios contra a radiação UV, com resultados superiores a 40% de germinação após 2 horas de exposição.

Referências

- ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1.163 p.
- BRAGA, G. U. L.; FLINT, S. D.; MILLER, C. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 61 °N to 54 °S. **Journal of Invertebrate Pathology**, Orlando, v. 78, p. 98-108, 2001.
- BRITO, E. S.; MENEZES, M. E. L.; ERLO, R.; MOTA, E. F.; GAVA, C. A. T.; SAMUELS, R. I. Avaliação do desempenho de fungos entomopatogênicos sobre fêmeas de *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera: Dactylopiidae) em condições de laboratório. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 22., 2008, Uberlândia. **Ciência, tecnologia e inovação**: anais. Viçosa, MG: UFV, 2008. 1 CD-ROM.
- BURGES, H. D. **Formulation of microbial biopesticides**: beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments. Dordrecht: Kluwer Academics, 1998, 496 p.
- EDGINGTON, S.; SEGURA, H.; LA ROSA, W. WILLIAMS, T. Photoprotection of *Beauveria bassiana*: Testing simple formulations for control of the coffee berry borer. **International Journal of Pest Management**, London, v. 46, n. 3, p. 169-176, 2000.
- FERNANDES, E. K. K.; RANGEL, D. E. N.; MORAES, A. M. L.; BITTENCOURT, V. R. E.P.; ROBERT, D. W. Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria* spp. Isolates. **Journal of Invertebrate Pathology**, Orlando, v. 96, n. 3, p. 237-243, 2007.
- GALENA: Informe científico. Disponível em: <<http://www.galena.com.br/>>. Acesso em: 8 dez. 2008.
- LELAND, J. E.; MCGUIRE, M. R.; GRACE, J. A.; JARONSKI, S. T.; ULLOA, M.; PARK, Y.; PLATTNER, R. D. Strain selection of a fungal entomopathogen, *Beauveria bassiana*, for control of plant bugs (*Lygus* spp.) (Heteroptera: Miridae). **Biological Control**, Orlando, v. 35, p. 104-114, 2005.

MARQUES, R. P.; MONTEIRO, A. C.; GENER, T. P. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo de Nim (*Azadirachta indica*). **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 34, n. 6, p.1.675-1.680, 2004.

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