

SELEÇÃO DE INERTES E ADJUVANTE VISANDO A ELABORAÇÃO DE
FORMULAÇÃO GRANULADA DE *BACILLUS SPHAERICUS* NEIDE*L.F.A. Alves¹, S.B. Alves, N.T. Augusto

¹Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Rua Universitária, 2069, CEP 85814-110, Cascavel, PR, Brasil. E-mail: lasg@unimidia.com.br

RESUMO

Nessa pesquisa avaliaram-se a flutuabilidade e compatibilidade biológica de diferentes materiais de origem mineral e vegetal para serem incorporados ao processo de desenvolvimento de uma formulação granulada de *Bacillus sphaericus*. Os testes de flutuabilidade foram realizados em aquários de vidro, contendo água destilada. Amostras dos materiais em pó ou granulados foram distribuídas na superfície da água e as avaliações periódicas revelaram que sabugo de milho, cortiça e vermiculita foram os que apresentaram maior flutuabilidade. Com relação à compatibilidade, os materiais foram colocados na superfície de um meio de cultura em placas de Petri previamente inoculadas com esporos de *B. sphaericus*. Após incubação das mesmas a 30°C durante 24 horas, verificou-se que todos os materiais foram compatíveis. Além dos parâmetros citados, o baixo custo e a resistência à moagem e ao peneiramento sugere-se a escolha do sabugo de milho como veículo da formulação e do agregante testado como adjuvante compatível para o produto em desenvolvimento.

PALAVRAS-CHAVE: *Bacillus sphaericus*, formulação, inerte, adjuvante, *Culex quinquefasciatus*, mosquito.

ABSTRACT

SELECTION OF INERT INGREDIENTS AND ADJUVANTS FOR A GRANULATED FORMULATION OF THE *BACILLUS SPHAERICUS* NEIDE. The aim of this research was to evaluate the buoyancy and biological compatibility of different materials for incorporation to the *Bacillus sphaericus* (granules). The buoyancy tests were accomplished in glass fishbowls, containing distilled water. Samples of the powdered materials or granules were distributed in the surface of the water and periodic evaluations revealed that corn-cob, cork and vermiculite were the ones more buoyant. Related to the compatibility, the materials were inoculated in the surface of in nutrient-agar medium in Petri dishes previously inoculated with spores of *B. sphaericus*. After incubation at 30 °C for 24 hours, it was observed that all the materials were compatible. Besides the mentioned parameters, the low cost and the resistance to the processing suggest the choice of the corn as vehicle of the formulation and of the adjuvant tested as compatible for the product in development.

KEY WORDS: *Bacillus sphaericus*, formulation, inert, adjuvant, *Culex quinquefasciatus*, mosquito.

*Parte integrante da Tese de Doutorado em Entomologia do primeiro autor, desenvolvido com auxílio de bolsa do CNPq.

INTRODUÇÃO

Bacillus sphaericus tem sido utilizado como agente de controle de pernilongos por mais de 20 anos. O desenvolvimento de formulações granuladas aumentou a eficiência do patógeno, pois a liberação contínua do complexo esporo-cristal na superfície da água torna os propágulos mais disponíveis durante a alimentação (LACEY, 1984, 1990).

Entretanto, na elaboração da formulação, uma série de produtos são incorporados ao microrganismo, os quais podem afetá-lo durante o armazenamento. Neste sentido, WARD (1984) salienta a possibilidade de uma interação negativa entre a membrana do microrganismo e as moléculas dos surfactantes (adjuvantes).

A seleção de substratos inertes adequados é de extrema importância para o sucesso de uma formulação. Os ingredientes inertes devem ser analisados do ponto de vista biológico e também operacional, pois podem interagir com as condições do ambiente causando a morte do microrganismo ou então afetar os equipamentos durante sua elaboração e/ou aplicação. Os inertes têm como principal função atuar como diluente e, dependendo das características, podem exercer outras atividades secundárias que são atribuídos dos adjuvantes (BATISTA FILHO *et al.*, 1998).

Os adjuvantes podem ser incorporados à formulação visando aumentar o contato do inseto com o patógeno, por um efeito atrativo; outros produtos podem proteger o microrganismo formulado contra o pH do meio e radiação ultravioleta e, desta maneira prolongam a persistência da formulação no campo (RHODES, 1993).

Deve-se ainda considerar que os adjuvantes também podem melhorar as características físico-químicas do produto formulado, tornando-o também adequado aos hábitos do inseto a ser controlado (BATISTA FILHO *et al.*, 1998).

Considerando a importância dos inertes e adjuvantes no processo de formulação, constata-se que existem poucos trabalhos relacionados ao assunto, principalmente com relação aos efeitos adversos que estes produtos podem causar sobre o microrganismo.

De modo geral, devido aos interesses econômicos envolvidos no processo de desenvolvimento de formulações, poucos trabalhos foram publicados sobre o assunto, sendo encontrados no Brasil estudo sobre

inertes em formulações de Vírus de Poliedrose Nuclear de *Anticarsia gemmatilis* (AUGUSTO *et al.*, 1992; 1995; 1996) e de fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* (MARQUES, 1993).

Assim, no presente trabalho estudou-se a compatibilidade física e biológica de diferentes materiais (inerte e adjuvante) a serem incorporados à uma formulação granulada de *Bacillus sphaericus* visando ao controle de *Culex quinquefasciatus* (Diptera, Culicidae).

MATERIAL E MÉTODOS

1) Teste de flutuabilidade

Foram conduzidos ensaios de seleção de inertes, constando de testes de compatibilidade entre o patógeno (isolado padrão) e os inertes e adjuvante a serem incorporados à formulação sólida e capacidade de flutuação. Os testes foram realizados no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos (Departamento de Entomologia, ESALQ/USP), testando-se os materiais (veículos e adjuvantes) individualmente e em combinações, que pelas suas características físicas garantam a flutuabilidade (Tabela 1).

Tabela 1 - Inertes e adjuvante, utilizados no processo de seleção de matéria-prima para a elaboração da formulação sólida de *Bacillus sphaericus*.

Origem	
Vegetal	mineral
agregante (adjuvante)	argila
sabugo de milho	vermiculita
polpa cítrica	filito
cortiça	diatomita
	sflica

Foram feitas preparações preliminares das formulações, contendo os diferentes materiais necessários excetuando-se o patógeno, que foram avaliadas quanto à sua capacidade de flutuar, determinando-se o tempo de permanência na superfície da água e a porcentagem de decantação nos intervalos de avaliação.

Para elaboração dos testes, os materiais foram previamente preparados no Centro Piloto de Defensivos Agrícolas do Instituto Biológico sediado em Campinas, a fim de serem moídos e peneirados segundo as especificações técnicas para o tipo de formulação a que se destinavam (granulada do tipo *spray on*).

Em seguida, amostras de 0,01 g de todos os inertes foram distribuídas na superfície da água destilada em aquário de vidro (30 x 14 x 18 cm) contendo 2 litros de água destilada, sendo usados 3 recipientes para cada um dos produtos. As avaliações foram realizadas a cada hora, durante 7 horas e também após 24, 48, 72 e 240 horas após o início do experimento. Excessão é feita à cortiça que foi avaliada durante 20 dias consecutivos. Nestas, foram feitas observações e, visualmente, foi estimada a porcentagem de flutuabilidade, contando-se no caso dos grânulos, o número de partículas na superfície (comparando-se com o número aplicado) ou atribuindo-se notas em uma escala previamente determinada. Os materiais que se mostraram mais adequados prosseguiram nos testes de seleção de inertes.

2) Testes de compatibilidade em meio sólido

Os materiais citados anteriormente foram também submetidos a uma bateria de testes em meio de cultura (exposição de curta duração), visando-se determinar sua compatibilidade com *Bacillus sphaericus* e substâncias hidro-solúveis difundidas no meio de cultura.

Foram preparadas placas de Petri com meio sólido ANY (Nutriente Ágar + 1% de extrato de levedura) da marca Difco, sendo 3 placas para cada produto, constituindo cada uma delas uma repetição. Na superfície do meio de cultura inoculou-se 0,1 mL de uma suspensão concentrada do caldo recém-fermentado (sem diluição) que foi distribuída com uma alça de Drigalsky. Em seguida, uma porção dos materiais foi colocada sobre a superfície do meio previamente inoculado e as placas incubadas a 30 °C durante 24 horas, em uma câmara tipo B.O.D. regulada para as condições citadas e com fotofase de 14 horas. Para comparação, foram preparadas placas inoculadas com esporos e células da bactéria.

Após o período de incubação, as placas foram observadas e com auxílio de uma lupa e iluminação verificou-se o crescimento das células no meio identificando-se eventual halo de inibição de crescimento ao redor da porção de inerte aplicada no meio de cultura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1) Teste de flutuabilidade

Verificou-se que dentre os inertes testados, os minerais argila, diatomita, filito, sílica e o vegetal polpa

cítrica foram reprovados pois, após uma hora praticamente apresentavam sedimentação completa. A vermiculita, embora com excelente flutuabilidade inicial (até 7 horas), sedimentou-se totalmente após 24 horas.

Tabela 2 - Comportamento de diferentes materiais aplicados em aquários, na superfície de água destilada, em condições de laboratório (Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos, Departamento de Entomologia, ESALQ/USP)

Material	Horas											
	1	2	3	4	5	6	7	24	48	72	240	
Argila	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Cortiça*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Cortiça + agregante*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Diatomita	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Filito	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Sabugo de milho	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	
Sabugo de milho + agregante	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	
Polpa cítrica	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Vermiculita	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	3	
Vermiculita + agregante	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	3	

1 = Flutuação total; 2 = Flutuação parcial; 3 = Sedimentação total

*100% de flutuabilidade aos 20 dias de exposição

As preparações elaboradas com a cortiça (isolada ou em combinação com o agregante) não sedimentaram durante as primeiras 8 horas e, assim permaneceram por 30 dias. Intermediariamente, o sabugo de milho moído e selecionado (6 mesh) mostrou-se altamente flutuante durante 7 horas com sedimentação gradativa no decorrer de 10 dias. Observou-se que em relação ao milho e a vermiculita, a cortiça por ser pouco densa foi facilmente carregada para os bordos do recipiente o que no campo poderia se constituir em um problema no momento da aplicação pela elevada deriva provocada pelo vento que poderia afetar a sua distribuição na superfície da água.

Observou-se também que o agregante não interferiu na flutuabilidade dos inertes, pois tanto a cortiça, vermiculita e o sabugo isoladamente ou em mistura com o agregante tiveram o mesmo comportamento na água, ou seja, o adjuvante não alterou a tensão superficial das partículas.

2) Testes de compatibilidade em meio sólido

Através da ausência de halo de inibição no crescimento da bactéria, constatou-se que todos os materi-

ais não liberaram substâncias tóxicas no meio de cultura, sendo considerados igualmente compatíveis nas condições deste experimento, não causando qualquer efeito sobre a germinação dos esporos e crescimento da bactéria (Tabela 3).

Este tipo de teste, embora revele apenas os efeitos imediatos sobre os patógenos, tem sua importância, pois MARQUES (1993) conseguiu detectar a existência de molhantes e emulsificantes dos grupos alquil sulfato de sódio e alquil sulfonossuccinato de sódio e álcool graxo poliglicol-éter com efeito negativo sobre isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* e que assim podem ser descartados do processo de formulação destes fungos entomopatogênicos.

Também AUGUSTO & BATISTA FILHO (1994) observaram a importância na seleção dos inertes quanto à compatibilidade biológica. Estudando o efeito de inertes do grupo do caulim sobre o AgNPV de *Anticarsia gemmatilis*, os autores verificaram haver grandes variações de compatibilidade, chegando mesmo, em alguns casos, a desativar o entomopatógeno em poucos dias.

Tabela 3 - Compatibilidade de *Bacillus sphaericus* com diferentes materiais (Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos, Departamento de Entomologia, ESALQ/USP).

	Relação		
	Compatível	Inibidor	Letal
Argila	X		
Cortiça*	X		
Cortiça + agregante*	X		
Diatomita	X		
Filito	X		
Sabugo de milho	X		
Sabugo de milho + agregante	X		
Polpa cítrica	X		
Vermiculita	X		
Vermiculita + agregante	X		

*100% de flutuabilidade aos 20 dias de exposição

Da mesma maneira, a compatibilidade entre adjuvantes usados em formulações em pó (dispersantes e umectantes) ou líquidos (emulsificante S) e *B. thuringiensis* foi avaliada constatando-se que nas concentrações normalmente empregadas (1 a 3%) a maioria dos dispersantes e umectantes aniônicos foram incompatíveis (bactericidas ou bacteriostáticos) e que emulsificantes não iônicos e catiônicos foram

compatíveis e passíveis de serem empregados em formulações oleosas (ALVES, L.F.A. Observação pessoal, 1995. Dados não publicados).

A fim de selecionar um inerte que pudesse ser efetivamente incorporado ao processo em desenvolvimento, foram considerados, além da compatibilidade e flutuabilidade, outros aspectos como custo/disponibilidade da matéria-prima, facilidade no manuseio (moagem e peneiramento) e teor de resíduos sólidos na embalagem.

No caso específico da vermiculita, embora seja disponível comercialmente em granulometria pré-determinada o que pode favorecer o preparo da formulação economizando etapas de moagem e peneiramento, além da baixa flutuabilidade observada, seus grânulos quebram-se facilmente desintegrando o produto alterando suas características e provavelmente seu desempenho (AUGUSTO, N.T. Comunicação pessoal, 1996). A cortiça, embora seja altamente flutuante, devido a sua baixa densidade é facilmente dispersada e acumula-se na superfície da água sem distribuir-se igualmente na área (fato observado nos aquários).

Assim, o sabugo de milho além de possuir características mais adequadas, constitui-se em um sub-produto agroindustrial (resíduo do beneficiamento do milho) que lhe confere um custo muito baixo pois seu destino normal é ser incorporado à ração animal. Também, a elevada resistência dos grânulos após a moagem e peneiramento (baixo teor de resíduo e quebra dos grânulos) e facilidade para preparo preliminar (moagens sucessivas) sugerem a sua escolha dentre os demais, visando a elaboração da formulação. Da mesma forma, o agregante testado mostrou-se compatível e adequado para compor a formulação em desenvolvimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUGUSTO, N.T.; BATISTA FILHO, A. Efeito de inertes do grupo do caulim sobre *Baculovirus anticarsia*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 3., 1994, Gramado, RS. *Anais*.
 AUGUSTO, N.T.; BATISTA FILHO, A.; ALVES, L.F.A. *Baculovirus anticarsia*: efeito de agentes tensoativos. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 3., 1992, Águas de Lindóia, SP. *Anais*. p.145.

- AUGUSTO, N.T.; BATISTA FILHO, A.; SILVA, E.M. Formulação oleosa de *Baculovirus anticarsia*: compatibilidade de emulsificantes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 15., 1995, Caxambu, MG. *Resumos*. p.353.
- 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., 1996, Foz do Iguaçu, PR. *Anais: sessão de posters*, p.341.
- BATISTA FILHO, A.; ALVES, S.B.; ALVES, L.F.A.; PEREIRA, R.M.; AUGUSTO, N.T. Formulação de entomopatógenos. In: ALVES, S.B. (Coord.) *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.917-967.
- LACEY, L.A. Production and formulation of *Bacillus sphaericus*. *Mosquito News*, v.44, n.2, p.153-159, 1984.
- LACEY, L.A. Persistence and formulation of *Bacillus sphaericus*. In: BARJAC, H. de & SUTHERLAND, D.J. (Eds.). *Microbial control of mosquitoes and blackflies*. New Brunswick: Rutgers University Press, 1990. p. 284-294.
- 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. 146p. [Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo].
- RHODES, D.J. Formulation of biological control agents. In: JONES, D.G. (Ed.) *Exploitation of microorganisms*. New York, 1993. p.411-439.
- WARD, M.G. Formulation of biological insecticides surfactant and diluent selection. In SCHER, M.B. (Ed.) *Advances in pesticide formulation technology*. Washington: American Chemical Society, 1984. p. 175-184.

Recebido para publicação em 4/1/99