

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

MORGANNA RESSE DE MELO

SELEÇÃO DE TENSOATIVOS E AVALIAÇÃO DE COMPATIBILIDADE COM  
*Beauveria bassiana* PARA DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO WP

PATOS DE MINAS – MG

FEVEREIRO DE 2020

**MORGANNA RESSE DE MELO**

**SELEÇÃO DE TENSOATIVOS E AVALIAÇÃO DE COMPATIBILIDADE COM  
*Beauveria bassiana* PARA DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO**

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-graduação em  
Biotecnologia como requisito parcial  
para obtenção do título de Mestre em  
Biotecnologia.

**Prof. Dr. Edgar Silveira Campos**

**Profa. Dra. Líbia Diniz Santos**

**Profa. Dra. Marta F. Zotarelli**

**PATOS DE MINAS – MG**

**FEVEREIRO DE 2020**

**MORGANNA RESSE DE MELO**

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

|              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| M528<br>2020 | <p>Melo, Morganna Resse de, 1990-<br/>SELEÇÃO DE TENSOATIVOS E AVALIAÇÃO DE COMPATIBILIDADE<br/>COM <i>Beauveria bassiana</i> PARA DESENVOLVIMENTO DE<br/>FORMULAÇÃO [recurso eletrônico] / Morganna Resse de Melo. -<br/>2020.</p> <p>Orientadora: Edgar Silveira Campos .<br/>Coorientadora: Líbia Diniz Santos.<br/>Coorientadora: Marta Fernando Zotarelli.<br/>Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,<br/>Pós-graduação em Biotecnologia.<br/>Modo de acesso: Internet.<br/>Disponível em: <a href="http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.125">http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.125</a><br/>Inclui bibliografia.<br/>Inclui ilustrações.</p> <p>1. Biotecnologia. I. , Edgar Silveira Campos,1981-, (Orient.). II.<br/>Santos, Líbia Diniz ,1978-, (Coorient.). III. Zotarelli, Marta<br/>Fernando,1985-, (Coorient.). IV. Universidade Federal de<br/>Uberlândia. Pós-graduação em Biotecnologia. V. Título.</p> <p>CDU: 60</p> |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:  
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091  
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia  
Av. Getúlio Vargas, 230, 3º andar, Sala 308 - Bairro Centro, Patos de Minas-MG, CEP 38700-128  
Telefone: (34) 3823-3714 - Ramal 39 - www.ppgbiotec.ibtec.ufu.br - ppgbiotec@ibtec.ufu.br



### ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

|                                    |                                                                                                                                                        |                 |       |                       |       |
|------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-------|-----------------------|-------|
| Programa de Pós-Graduação em:      | Biotecnologia                                                                                                                                          |                 |       |                       |       |
| Defesa de:                         | Dissertação de Mestrado Acadêmico                                                                                                                      |                 |       |                       |       |
| Data:                              | 17 de fevereiro de 2019                                                                                                                                | Hora de início: | 09:50 | Hora de encerramento: | 11:35 |
| Matrícula do Discente:             | 41812BTC006                                                                                                                                            |                 |       |                       |       |
| Nome do Discente:                  | Morganna Resse de Melo                                                                                                                                 |                 |       |                       |       |
| Título do Trabalho:                | SELEÇÃO DE TENSOATIVOS E AVALIAÇÃO DE COMPATIBILIDADE COM <i>Beauveria bassiana</i> PARA DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO WP                              |                 |       |                       |       |
| Área de concentração:              | Biociências                                                                                                                                            |                 |       |                       |       |
| Linha de pesquisa:                 | Prospecção de produtos bioativos de interesse médico e industrial                                                                                      |                 |       |                       |       |
| Projeto de Pesquisa de vinculação: | Desenvolvimento de processo eco-friendly para a produção de biossurfactantes para formulações de uso farmacêutico a partir de resíduos agroindustriais |                 |       |                       |       |

Reuniu-se no Sala de Video Conferência, Campus Patos de Minas, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora em sessão fechada por video conferência, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, assim composta: Professores Doutores: Profa. Ana Lucia Figueiredo Porto; Profa. Raquel Cristina Cavalcanti Dantas; Prof. Edgar Silveira Campos orientador da candidata.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. Edgar Silveira Campos, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Ana Lucia Figueiredo Porto, Usuário Externo**, em 27/02/2020, às 16:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Edgar Silveira Campos, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/02/2020, às 20:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Raquel Cristina Cavalcanti Dantas, Professor(a) do Magistério Superior**, em 02/03/2020, às 08:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1874023** e o código CRC **D8EE7E63**.

---

## RESUMO

Produtos à base de fungos entomopatogênicos como *Beauveria* spp. são reconhecidos por sua efetividade no controle de insetos pragas, devido a capacidade de adesão a cutícula do inseto através das hidrofobinas. Mas a hidrofobicidade do fungo dificulta o desenvolvimento de formulações comprometendo a eficiência da aplicação. Faz-se necessário o uso de tensoativos para reduzir a tensão superficial, mas muitos são prejudiciais aos microrganismos. O objetivo deste trabalho é selecionar tensoativos compatíveis com *Beauveria bassiana* e ao mesmo tempo reduzir a tensão superficial para desenvolvimento de formulação pó solúvel em água. Na primeira parte deste trabalho, preparou-se formulações usando 25 surfactantes diferentes, as quais foram testadas quanto à viabilidade após 30 dias de armazenamento a 25°C. Seis surfactantes forneceram os melhores resultados e foram selecionados para a continuação do trabalho. Assim, novas formulações foram preparadas e avaliadas quanto à tensão superficial, tempo de umectação, germinação de conídios, viabilidade e índice biológico durante 3 meses de armazenamento. Posteriormente, através do delineamento composto central (DCC), foi determinada a faixa ideal de concentração para os dois surfactantes selecionados. O menor tempo de umectação (1,61 min) e a menor tensão superficial (38 mN / m) foram obtidos usando o Emulsogen TS 200 a 5%. Todas as seis formulações mostraram uma diminuição na germinação após 1 mês de armazenamento. Após 3 meses de armazenamento, a formulação controle e a formulação preparada com Surfom D apresentaram taxas de germinação de 0% e 55%, respectivamente. A viabilidade mais alta ( $1,14 \times 10^9$  UFC/g) foi obtida com Surfom D. Realizou-se também um ensaio de índice biológico, o qual a *B. bassiana* foi compatível tanto com Emulsogen TS 200, quanto com Surfom D a 5%. O Emulsogen TS 200 foi o mais eficaz na redução da tensão superficial, mas diminuiu a viabilidade dos conídios. Surfom D apresentou propriedades de umectação ruins, mas aumentou a taxa de germinação de *B. bassiana*. A combinação dos dois surfactantes e suas concentrações foi estudada pelo DCC. A região ótima para compor uma formulação foi de cerca de 3% de cada um dos surfactantes para as variáveis de tensão superficial, tempo de umectação, germinação e UFC. A estabilidade da formulação de contendo 3% de Emulsogen TS 200 e Surfom D foi de 2 meses à temperatura ambiente (25°C).

**Palavras-chave:** Formulação, Fungo entomopatogênico, Surfactantes, Compatibilidade, Delineamento Central Composto

## ABSTRACT

Entomopathogenic fungal products such as *Beauveria* sp. formulations are recognized for their effectiveness in controlling insect pests, attributed to the ability to adhere to the insect cuticle through hydrophobins. However, because of their high hydrophobicity, fungal agents require the addition of surfactants to reduce particle aggregation during application. This study aimed to select surfactants that can improve the wettability of *Beauveria bassiana* formulations without affecting fungal viability. In a first experiment, formulations prepared using 25 different surfactants were tested for viability after 30 days of storage at 25 °C. Six surfactants provided the best results and were selected for further experiments. New formulations were prepared and evaluated for surface tension, wetting time, conidial germination, viability, and biological index during 3 months of storage. Subsequently, through central composite design (DCC) the optimal concentration range for the two selected surfactants was determined. The shortest wetting time (1.61 min) and lowest surface tension (38 mN/m) were obtained using Emulsogen TS 200 at 5%. All six formulations showed a decrease in germination after 1 month of storage. After 3 months of storage, the control formulation and formulations prepared using Surfom D had germination rates of 0% and 55%, respectively. The highest viability ( $1.14 \times 10^9$  colony-forming units/g) was obtained with Surfom D. *B. bassiana* was found compatible with 5% Emulsogen TS 200 and Surfom D. Emulsogen TS 200 was the most effective in reducing surface tension but decreased fungal viability and conidial germination. Surfom D showed poor wetting properties but increased *B. bassiana* germination rate. The combination of both surfactants seem a good option and was evaluated through DCC. The optimum region is around was 3% of each of the surfactants in the composition of a formulation for the variables surface tension, wetting time, germination and CFU. The stability of the *B. bassiana* formulation containing 3% Emulsogen TS 200 and Surfom D is 2 months at room temperature (25 °C).

**Keyword:** Formulation, Entomopathogenic fungus, Surfactants, Compatibility, Design of experiments

## SUMÁRIO

|          |                                                                                                                                                                      |           |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b>                                                                                                                                                    | <b>9</b>  |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>                                                                                                                                         | <b>12</b> |
| 2.1      | <i>Beauveria</i> spp.                                                                                                                                                | 12        |
| 2.2      | Produção                                                                                                                                                             | 14        |
| 2.3      | Formulação                                                                                                                                                           | 15        |
| 2.3.1    | Avaliação das formulações                                                                                                                                            | 20        |
| 2.4      | Tensão superficial                                                                                                                                                   | 22        |
| 2.5      | Tensoativo                                                                                                                                                           | 22        |
| 2.5.1    | Tensoativo não iônico                                                                                                                                                | 23        |
| 2.5.2    | Tensoativo aniônico                                                                                                                                                  | 24        |
| 2.5.3    | Tensoativo catiônico                                                                                                                                                 | 25        |
| 2.6      | Micelas                                                                                                                                                              | 25        |
| 2.7      | Balanço Hidrofílico-Lipofílico                                                                                                                                       | 26        |
| <b>3</b> | <b>SURFACTANT SELECTION FOR ENHANCING THE WETTABILITY OF <i>BEAUVERIA BASSIANA</i> (BALS.-CRIV.) VUILL. (1912) (ASCOMYCOTA: CORDYCIPITACEAE) POWDER FORMULATIONS</b> | <b>28</b> |
| 3.1      | Introduction                                                                                                                                                         | 29        |
| 3.2      | Material and methods                                                                                                                                                 | 29        |
| 3.2.1    | Culture conditions                                                                                                                                                   | 30        |
| 3.2.2    | Preparation of powder formulations                                                                                                                                   | 30        |
| 3.2.3    | Wetting time                                                                                                                                                         | 31        |
| 3.2.4    | Fungal viability                                                                                                                                                     | 31        |
| 3.2.5    | Germination rate                                                                                                                                                     | 31        |
| 3.2.6    | Surface tension                                                                                                                                                      | 31        |
| 3.2.7    | Biological index                                                                                                                                                     | 31        |
| 3.2.8    | Statistical analysis                                                                                                                                                 | 32        |
| 3.3      | Results and discussion                                                                                                                                               | 32        |
| 3.4      | Conclusion                                                                                                                                                           | 41        |



|               |    |
|---------------|----|
| Zorzetti, J.; | 44 |
|---------------|----|

## 4 COMBINAÇÕES DO USO DE TENSOATIVOS NO PROCESSO DE DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO WP DE *B. BASSIANA* ----- 45

|                |    |
|----------------|----|
| 4.1 Introdução | 45 |
|----------------|----|

|                        |    |
|------------------------|----|
| 4.2 Material e Métodos | 46 |
|------------------------|----|

|                                             |    |
|---------------------------------------------|----|
| 4.2.1 Produção de <i>Beauveria bassiana</i> | 46 |
|---------------------------------------------|----|

|                               |    |
|-------------------------------|----|
| 4.2.2 Preparo das formulações | 46 |
|-------------------------------|----|

|                          |    |
|--------------------------|----|
| 4.2.3 Tempo de umectação | 48 |
|--------------------------|----|

|                   |    |
|-------------------|----|
| 4.2.4 Viabilidade | 48 |
|-------------------|----|

|                  |    |
|------------------|----|
| 4.2.5 Germinação | 49 |
|------------------|----|

|                          |    |
|--------------------------|----|
| 4.2.6 Tensão superficial | 49 |
|--------------------------|----|

|                        |    |
|------------------------|----|
| 4.2.7 Índice biológico | 49 |
|------------------------|----|

|                            |    |
|----------------------------|----|
| 4.3 Resultados e Discussão | 50 |
|----------------------------|----|

|               |    |
|---------------|----|
| 4.4 Conclusão | 60 |
|---------------|----|

## 5 CONCLUSÃO FINAL ----- 61

|             |    |
|-------------|----|
| REFERÊNCIAS | 62 |
|-------------|----|

|                                              |    |
|----------------------------------------------|----|
| ANEXO - NORMAS DA REVISTA BIOLOGICAL CONTROL | 68 |
|----------------------------------------------|----|

## 1 Introdução

Várias são as substâncias químicas usadas no controle de insetos e o seu uso intensivo tem promovido diversos problemas. Os principais estão relacionados ao meio ambiente, como a contaminação dos alimentos, do solo, da água e dos animais; a intoxicação de agricultores; a resistência de pragas a certos princípios ativos dos agrotóxicos e a eliminação de organismos benéficos, com redução da biodiversidade. Dentre as alternativas para a redução do uso de agrotóxicos com o manejo integrado tem-se realizado o controle biológico, através da introdução de um agente microbiano ou aproveitando o controle biológico natural (BETTIOL, MORANDI, 2009).

O controle biológico de insetos pragas na agricultura com o uso de microrganismos ao invés dos produtos químicos cresce 20% ao ano no país. Em 2010 haviam 19 produtos registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) como defensivos biológicos. Sete anos depois, o número de registro aumentou para 143 (MONTEIRO, 2017).

Os principais microrganismos usados no controle biológico são os fungos. Os fungos que provocam doenças nos insetos são denominados entomopatogênicos como *Beauveria* spp. e *Metarhizium* spp. que são cosmopolitas e não deixam resíduos indesejáveis, portanto, podem ser usados mesmo perto da colheita. Esses são capazes de controlar diversas espécies de insetos. Há mais de 700 espécies de entomopatógenos, sendo as espécies do gênero *Beauveria* e *Metarhizium* as mais frequentemente utilizadas no controle biológico (FARIA; WRAIGHT, 2007). Algumas espécies desses gêneros infectam quase que todas as ordens de insetos e, por isso, grande atenção é dispendida ao estudo desses fungos (JUNGES, 2014). Diferente de bactérias e vírus, os fungos podem infectar os insetos não somente pela ingestão, mas também pelos espiráculos e particularmente pela superfície do tegumento (SILVA, 2001).

O uso do fungo entomopatogênico *B. bassiana* em escala comercial iniciou-se na década de 60 com o uso de arroz cozido como substrato para o seu crescimento. O fungo cresce na superfície do arroz cozido, formando o micélio e posteriormente conídios (esporulação). Após a esporulação, o arroz é seco e triturado para ser vendido como uma formulação do tipo pó molhável sem nenhum aditivo (UHRY, 2007). Produtos com composição de arroz com fungo moído são comuns, devido as dificuldades tecnológicas para extrair o fungo da matriz (arroz). O grande problema da composição desse tipo de formulação é a dificuldade de formar uma

suspensão homogênea para pulverização, uma vez que o fungo é hidrofóbico e não há tensoativos na formulação. Além disso o tamanho das partículas do arroz triturado pode contribuir para a obstrução dos bicos das máquinas. Consequentemente a aplicação não será uniforme e a eficácia do agente biológico ficará comprometida (BATISTA, 2014). Assim, muitas vezes os produtos biológicos são deixados de lado, simplesmente porque a formulação não permite uma forma adequada da entrega do ativo no alvo.

Entretanto o MAPA reconhece 81 tipos de formulação para uso na agricultura. Essas são classificados em formulações para diluições em água e em solvente orgânicos, formulações para aplicação direta, formulações para tratamento de semente e outras formulações denominadas especiais (BRASIL, 2016).

Dentre as formulações para diluição em água a base de fungos, a formulação pó molhável, representada pela sigla WP (*wettable powder*), a base de fungo representa um grande desafio para a indústria, pois os fungos são na sua maioria hidrofóbicos (HERRMANN, 2014). O uso de tensoativo na formulação permite ao fungo interação com a água quebrando a tensão superficial. Além disso, promovem uma rápida umectação do produto no preparo da calda (formulação fica suspensa em água) para pulverização, dispersão dos conídios e uma cobertura uniforme do alvo. O tensoativo com essas características são denominados umectantes.

Há registrado no Brasil 17 produtos contento como agente ativo o fungo do gênero *Beauveria*. Desses, 15 são formulações WP (BRASIL, 2018). A facilidade de produção desse tipo de formulação e o baixo custo justifica a preferência (SILVA, 2006), além da fácil aplicação (BRAR et al., 2006). Entretanto, muitas vezes, esses produtos possuem baixa qualidade de umectação, devido à ausência de tensoativo na fórmula, consequência da incompatibilidade entre ativo e tensoativo.

Inúmeros trabalhos na literatura selecionam surfactantes baseado apenas na compatibilidade do fungo, e não correlacionam com a eficiência em quebrar a tensão superficial (SANTOS, 2009; SILVA, 2006; TANZINI et al., 2001). Portanto, a seleção de surfactantes para uso em formulações deve correlacionar o seu efeito como tensoativo em quebrar a tensão superficial com a compatibilidade com o fungo e, além disso, deve ser viável economicamente para aplicação na indústria. Esses são parâmetros indispensáveis a serem avaliados no desenvolvimento de formulações biológicas.

Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar surfactantes químicos quanto a quebra da tensão superficial do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*, bem como e sua compatibilidade e estabilidade para armazenamento na composição de uma formulação WP.

## 2 Revisão bibliográfica

### 2.1 *Beauveria* spp.

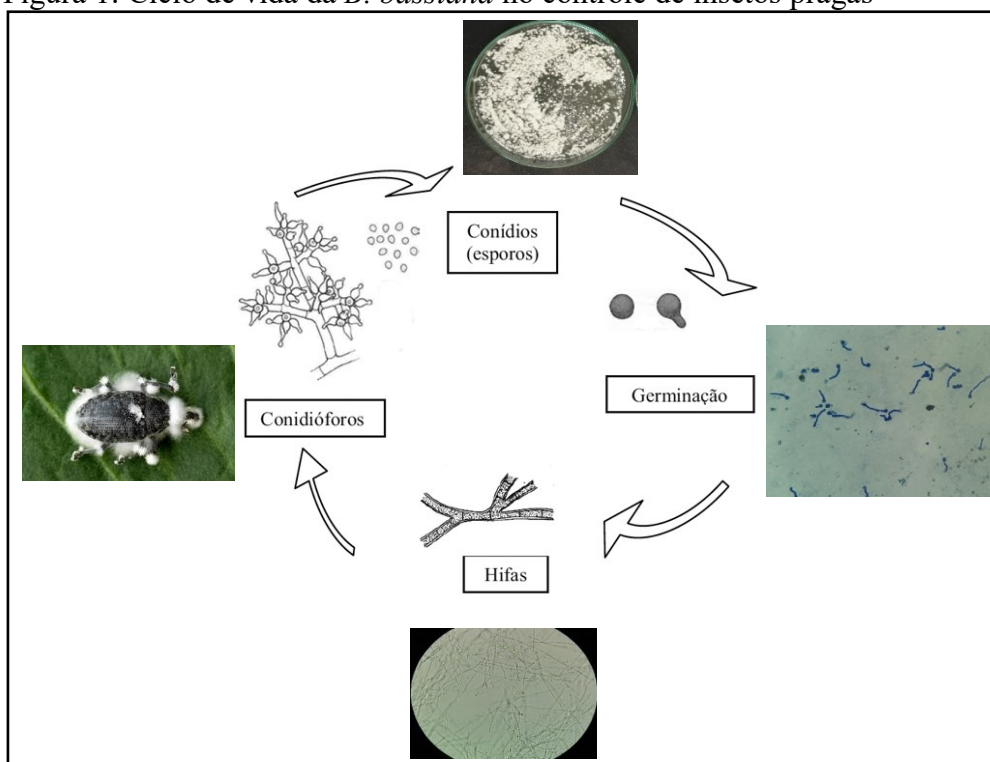
O fungo do gênero *Beauveria* foi descrito pela primeira vez em 1835 por Agostino Bass. Em experimentos com “moscardina”, doença que ataca o bicho-da-seda, ele percebeu que um agente externo formava uma “massa branca” que era capaz de crescer e matar o inseto. A causa da morte do bicho-da-seda foi atribuída a um fungo que se reproduzia dentro do inseto bloqueando a hemolinfa. Mais tarde esse fungo foi identificado como *Beauveria bassiana* (UHRY, 2007).

Desde a sua descoberta, *B. bassiana* é utilizada como inseticida no controle de insetos pragas como “broca do café” (*Hypothenemus hampei*), “moleque da bananeira” (*Cosmopolites sordidus*), “ácaro da falsa ferrugem” (*Phyllocoptruta oleivora*), “brocado-olho” (*Rhynchophorus palmarum*), “broca da cana-de-açúcar” (*Diatraea saccharalis*) e “mosca branca” (*Bemisia tabaci*) (UHRY, 2007).

O seu ciclo biológico permite sua caracterização como um parasita facultativo. Primeiramente, o esporo (os conídios) adere sobre a cutícula de um hospedeiro suscetível. O processo de adesão do esporo a cutícula do inseto é mediado a partir de moléculas sintetizadas pelo fungo, chamado adesinas. Um tipo de adesina conhecido como MAD1, localizado na superfície dos conídios, foi descrito em *Metarhizium anisopliae* (MORA; CASTILHO; FRAGA, 2017).

Para a germinação dos conídios após adesão ao inseto, há necessidade de uma fonte exógena de carbono como a quitina. Após germinação, há a formação do apressório na extremidade da hifa permitindo a penetração do fungo através das camadas da cutícula do inseto. Os conídios podem penetrar em qualquer parte da cutícula do inseto através de pressão mecânica e degradação de cutícula através de enzimas como proteases, quitinases e lipases (MORA; CASTILHO; FRAGA, 2017). Após penetração, as hifas se disseminam na hemocele do inseto com consequente extrusão sobre o exoesqueleto do hospedeiro, formando novos conídios a partir das hifas (JUNGES, 2010). O micélio (conjunto de hifas) formado sobre o cadáver dos insetos é de coloração branca (MORAIS, 2015). Na Figura 1 é mostrado o aspecto da colônia de *B. bassiana* em meio de cultura sólido.

Figura 1: Ciclo de vida da *B. bassiana* no controle de insetos pragas



Fonte: Próprio autor

*B. bassiana* conídios uninucleados ou multinucleados, hialinos, de forma arredondada que medem entre 1,5 a 3,0  $\mu\text{m}$  de diâmetro (FENG; POPRAWSKI; KHACHATOURIANS, 1994; UHRY, 2007). As formas dos conídios podem variar de globoso, elipsoide, cilíndrico, reniforme e vermiforme e com grande variedade de tamanhos (MORAIS, 2015). Os conidióforos são únicos ou agrupados irregularmente, de estrutura dilatada na base e afilada na extremidade de onde saem os conídios (UHRY, 2007).

A característica hidrofóbica dos conídios da *Beauveria* spp. e de outros fungos como *Metarhizium* spp. e *Paecilomyces* spp., é devido à presença de proteínas ricas em cisteína na parede celular, chamadas hidrofobinas (MORA, 2015; KRUGER et al., 2014). Há também, glicoproteínas que ficam dispostas em hastes sobrepostas na superfície do conídio. Segundo Kruger et al. (2014) e Mascarin e Jaronski (2016) esse fato faz com que o óleo seja um veículo ideal para esse tipo de conídio. Holder et al. (2007) avaliaram a hidrofobicidade de *B. bassiana* do ensaio *Microbial adhesion to hydrocarbons* (MATC), em que as células se dividem entre duas soluções imiscíveis (água e hexadecano). Os conídios apresentaram alta afinidade pela fase orgânica, sendo classificados claramente como hidrofóbicos (HI= 0,88).

O fungo *B. bassiana* utilizado em escala comercial na produção de inseticidas biológicos. No mundo são encontrados diversos produtos comerciais para controle biológico contendo *B. bassiana* ingrediente ativo. No Brasil há 32 formulações registradas com o fungo do gênero *Beauveria* (BRASIL, 2020). Os métodos produtivos de fungos entomopatogênicos que foram criados em meados do século passado começaram a ser comercializados no Brasil nos anos 60 (BATISTA, 2014).

## 2.2 Produção

Diversas formas do ciclo de vida dos fungos são potenciais opções no desenvolvimento de bioinsecticidas. Na natureza, no processo de infecção de insetos, o conídio é a unidade de disseminação, e o amplo conhecimento do processo de produção fazem dessa estrutura fúngica a mais utilizada em fungicidas biológicos (HORACZEK; VIERNSTEIN, 2004).

Os métodos produtivos de fungos entomopatogênicos foram criados em meados do século passado e começaram a ser comercializados no Brasil nos anos 60. As técnicas de obtenção são baseadas na utilização de cereais como substrato para o crescimento fúngico, representação esquemática apresentada na Figura 2. Um inóculo, contendo o fungo, proveniente de meio líquido é adicionado ao substrato, geralmente arroz, para multiplicação, onde vai crescer na forma de hifas que levará a formação dos conídios, processo denominado fermentação bifásica. O fungo pode ser vendido desta forma, sendo necessária uma pré-lavagem no momento da utilização para a retirada dos esporos do substrato, ou esta mistura pode ainda ser seca e triturada, e então vendida sob a forma de pó-molhável (BATISTA, 2014). Uma vez que o fungo é altamente hidrofóbico a formulação constituída somente de arroz colonizado e moído não permite que os conídios fiquem dispersos de forma homogênea quando diluída em água para pulverização. Uma vez que a aplicação não é uniforme, a eficácia do agente microbiano é comprometida (SILVA, 2006).

Figura 2: Representação simplificada do método de produção de *B. bassiana* mostrando a característica hidrofóbica dos conídios ao serem adicionados na água.



Assim, além de produzir, há a necessidade de formular os microrganismos. A Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias (Embrapa) disponibiliza um protocolo especialmente para produção massal de *B. bassiana*. O primeiro passo para fazer uma formulação à base de microrganismos consiste na multiplicação do fungo e, posteriormente, na sua separação do substrato (na maioria das vezes arroz) utilizado para crescimento. O microrganismo separado do substrato será o ativo da formulação (EMBRAPA, 2004). A umidade final do fungo deve estar o mais próximo de 5%, umidades baixas auxiliam na separação dos conídios do substrato e oferecem condições adequadas para que o produto obtido seja formulado (EMBRAPA, 2004). Além de facilitar o processo de extração dos conídios do substrato, o baixo teor de água (5%) ajuda no prolongamento da vida prateleira, assim como a baixa temperatura de armazenamento e nível de oxigênio dentro das embalagens (MASCARIN E JARONSKI, 2016). Isso porque a baixa umidade, deixa a unidade infectiva em um estágio de dormência, o metabolismo é reduzido e a germinação é inibida (HORACZEK; VIERNSTEIN, 2004).

O ativo deve estar puro sem resíduos e em alta concentração, o que permite a adição de formulantes com funções que conferem melhor performance à formulação final. Quando a formulação é arroz colonizado moído, o arroz desempenha apenas a função de veículo do fungo, sem agregar nenhum valor ao produto.

### **2.3 Formulação**

Uma formulação pode ser definida como um processo que se inicia com a produção do patógeno e segue com a adição de produtos que ajudam a manter ou até mesmo aumentar a viabilidade e eficiência do microrganismo em atingir o alvo. Os estudos de formulação devem ainda considerar os efeitos da temperatura, umidade, radiação solar e a estabilidade do patógeno antes e depois que ele alcance o agro ecossistema, uma vez que o desempenho destes entomopatógenos pode ser afetado por uma variedade de fatores ambientais (BRAR et al., 2006; MONTEIRO et al., 2014).

A temperatura é um dos fatores de grande relevância na manutenção da viabilidade dos conídios. Entretanto, a temperatura pode ser mais ou menos prejudicial a considerando os componentes da formulação. Simková (2009) avaliou a germinação de *B. bassiana* comparando conídio não formulado e misturado com dois veículos inertes (IC 1 e IC2), e um agente nutritivo (NC), os nomes não foram relatados. Na temperatura de 22°C, após 30 dias, os conídios não formulados germinaram 59%, o IC1 e IC2 germinaram 93% e 74%, respectivamente, sendo que a germinação inicial foi 97%. O veículo nutritivo manteve a germinação após os 30 dias assim



como o IC 1, mas o agente nutritivo foi o único que manteve a germinação após 60 dias. Nas temperaturas de 4°C e -20°C uma alta viabilidade foi mantida, com quedas mínimas. Com exceção do inerte IC2, a germinação do IC1 inicial de 97% reduziu para 42% após 90 dias a 4°C. Quando os conídios foram aplicados para controle de *Tenebrio molitor*, as maiores mortalidades foram obtidas com conídios armazenados a 4°C independente se formulado ou qual inerte utilizado. Nesse caso, na temperatura de 4°C, a menor mortalidade foi de 70% e a maior de 87%. Já para os conídios armazenados a 20°C a maior e menor mortalidade após 90 dias foram de 20% e 3%, respectivamente.

Dentro dos fatores abióticos, atenção especial deve ser dada a radiação solar, particularmente os espectros UVA e UVB, um importante fator na viabilidade pós-aplicação de *Beauveria* spp., bem como de outros fungos. Fungos entomopatogênicos são, em geral, mais sensíveis a radiação ultravioleta, e a tolerância é dependente de espécie, isolado, meio de cultivo, idade da cultura e formulação (FERNANDES et al., 2015). A proteção dos esporos da radiação solar pode ser feita com adição de filtros solares solúveis em óleo para formulações a base de óleo. Ou a própria formulação baseada em óleo pode ser capaz de aumentar a tolerância dos conídios a radiação (FERNANDES et al., 2015). Tem sido proposto como protetor: argilas, filtros físicos (dióxido de titânio), químicos como oxibenzofenona, mas este já é relatado como tóxico aos microrganismos (MASCARIN E JARONSKI, 2016).

A formulação de bioinseticidas é complexa, porque além dos fatores abióticos, a natureza biológica dos agentes microbianos pode ser afetada por substâncias utilizadas na formulação, principalmente os tensoativos. Diferentes tipos de tensoativos ao serem adicionados na formulação conferem suspensibilidade, dispersão em veículo adequado, além de aumentar a deposição, espalhamento, adesão, retenção e toxicidade sobre o alvo (SILVA, 2006). Diante da complexidade das formulações biológicas, que envolve fatores bióticos e abióticos, uma formulação requer ensaios que atestem a utilização de compostos compatíveis com o agente ativo; o melhoramento da capacidade de adesão/espalhamento nos insetos, nos tecidos vegetais além da possibilidade de estocagem do produto em condições ambiente (BATISTA, 2014). Alves et al. (1996) afirmaram que a formulação é um passo crucial no desenvolvimento de pesticidas microbianos.

Existem 81 tipos de formulações diferentes descritas pelo MAPA (BRASIL, 2016). Dentre todas, a formulação do tipo WP é muitas vezes preferível devido a facilidade de produção e o baixo custo (SILVA, 2006). Contudo, muitas vezes são de baixa qualidade, devido

à ausência de umectantes na formulação e incompatibilidade com o ativo. Entretanto, ganham atenção quando têm uma maior vida de prateleira, boa miscibilidade com a água e facilidade de aplicação com equipamentos convencionais (BRAR et al., 2006).

Das formulações registradas no Brasil com o fungo do gênero *Beauveria*, 21 das 32 formulações são WP (BRASIL, 2020), Tabela 1. Mascarin e Jaronski (2016) listaram produtos registrados em diversos países contendo propágulos de *B. bassiana*. A maioria delas são formulações WP, seguido de suspensão concentrada (SC) e emulsão concentrada (EC). No entanto, a maioria dos micopesticidas (> 70%) engloba concentrados técnicos não formulados (substrato com ativo) (MASCARIN; FERNANDES; JACKSON, 2016).

A principal diferença das formulações SC e EC para a formulação WP, é que as primeiras são líquidas e por isso mais difíceis de serem estabilizadas. Uma formulação SC é uma suspensão constituída de uma mistura de partículas sólidas finamente divididas e dispersas em um líquido. As partículas sólidas não se dissolvem no líquido e a mistura deve ser agitada para manter as partículas uniformemente distribuídas. A maioria das suspensões terá uma aparência turva e viscosa. Enquanto uma formulação EC é uma emulsão formada pela dispersão de um líquido (como gotículas) em outro líquido através de agitação. O ingrediente ativo é dissolvido em um solvente à base de óleo e esse é misturado com água, formando uma emulsão (óleo em água) com a ajuda de um agente emulsificante para evitar a separação de fases (DEAN, 2017).

A formulação WP se caracteriza como um pó seco finamente moído que se parece com poeira e deve ser misturada com água para aplicação (FARIA; WRAIGHT, 2007). Necessitam de agitação constante para manter o ativo que é sólido suspenso. Como vantagens têm menos absorção cutânea e ocular do que formulações EC e outras formulações líquidas, mas podem ser perigosas quando inalada pelo operador (DEAN, 2017). Brar et al. (2006) descreveu o tipo de matéria prima a ser usada para compor uma formulação WP. O ativo pode compor mais de 50% da formulação (DEAN, 2017), o inerte 15 a 45% o dispersante 1 a 10% e o surfactante 3 a 5%. O dispersante deve ser adicionado a suspensão para manter a dispersão do ativo; o surfactante para romper a tensão superficial na interface líquido-sólido (o excesso pode levar geração de espuma e partição de esporos).

No entanto, o principal componente da formulação WP é o tensoativo com função umectante. Além da molécula anfifílica do tensoativo, outras matérias primas foram citadas por

Brar et al. (2006) com função umectantes, são elas: poliacrilamidas, polissacarídeos, certos tipos de gomas, sorbitol, sacarose, melaço, poliglicol e glicerol. Esses também podem reduzir a deriva de pulverização, na maioria das vezes resultante de gotículas finas (<50 µm de diâmetro), que são levadas da área alvo por brisas, incluindo aquelas causadas pelo veículo que transporta o equipamento de pulverização.

**Tabela 1: Produtos comerciais registrados no Brasil contendo o fungo do gênero *Beauveria*.**

| <b>Nome comercial</b> | <b>Titular do registro</b>                                                | <b>Formulação*</b> |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| Dobbel.               | Maneogene Agrociências S.A                                                | SC                 |
| Atrevido              | Koppert do Brasil Holding Ltda.                                           | WP                 |
| Boveria-Turbo         | Biovalens Ltda. - Uberaba                                                 | WP                 |
| Granada               | Laboratorio de Bio Controle Farroupilha Ltda                              | WP                 |
| Bovebio               | Biofungi Ind. e Com. de Def. Biológicos e Inoculantes Ltda.               | WP                 |
| Beauvetec             | Koppert do Brasil Holding Ltda.                                           | WP                 |
| Beauvel               | Dillon Biotecnologia Ltda                                                 | SC                 |
| Bovenat               | Bionat Soluções Biologicas Ltda                                           | WP                 |
| Beauveria Oligos WP   | Oligos Biotecnologia Ltda.                                                | GR                 |
| Auin                  | Agrivalle Brasil Industria e Comercio de Produtos Agricolas Ltda.         | WP                 |
| Mycotrol ES           | Mitsui & Co (Brasil) S.A.                                                 | SE                 |
| Beauvecontrol         | Simbiose Indústria e Comércio de Fertilizantes e Insumos Microbiológicos  | OD                 |
| BioBVB                | Vital Brasil Chemical Industria e Comercio de Produtos Quimicos Ltda - ME | WP                 |
| Sulis CE              | MFB Agricola Industria e Comercio Ltda.                                   | EC                 |
| Interceptor           | Koppert do Brasil Holding Ltda.                                           | WP                 |
| BeauveControl         | Simbiose Indústria e Comércio de Fertilizantes e Insumos Microbiológicos  | WP                 |
| Ballvéria             | Ballagro Agro Tecnologia Ltda.                                            | WP                 |
| Boveryd FR 25         | TZ Biotech Ltda.                                                          | GL                 |
| Auin CE.              | Agrivalle Brasil Industria e Comercio de Produtos Agricolas Ltda.         | EC                 |
| Biobev                | Micro Bio Soluções Ambientais Ltda                                        | EC                 |
| VESTIX                | Basf S.A. – São Paulo                                                     | OD                 |
| Boveryd               | TZ Biotech Ltda.                                                          | WP                 |
| Exterminador Bio      | Simbiose Indústria e Comércio de Fertilizantes e Insumos Microbiológicos. | WP                 |
| Bovemax EC            | Novozymes BioAg Produtos para Agricultura Ltda                            | EC                 |
| Excellence Mig-66.    | Excellence Industria e Comercio de Produtos Biologicos Ltda               | WP                 |
| Ecobass               | Toyobo do Brasil Produtos Biológicos Ltda.                                | WP                 |
| Beauveria JCO         | JCO Indústria e Comércio de Fertilizantes Ltda.                           | WP                 |
| Boveril WP PL63       | Koppert do Brasil Holding Ltda.                                           | WP                 |
| Bravo                 | TOPBIO - Insumos Biológicos Indústria e Comércio Ltda – Tibau/RN          | WP                 |
| Hovex                 | Ballagro Agro Tecnologia Ltda.                                            | WP                 |
| Bouveriz WP           | Biocontrol Sistema de Controle Biológico Ltda (Matriz)                    | WP                 |
| Bioveria WP           | Bioenergia do Brasil S.A.                                                 | WP                 |

\*WP: Pó molhável em água; EC: Emulsão concentrada; OD: Óleo emulsionável; GL: Gel emulsionável; SE: Suspensão emulsionável; SC: Suspensão concentrada; GR: Granulo

Após a pulverização, quando as gotas se espalham sobre o inseto alvo, elas podem se dividir em gotas menores, ficar retidas ou ser ricocheteadas, dependendo das características da calda e da superfície da praga. A formulação tem importante papel na formação de gotas,

principalmente, o uso de adjuvantes, que podem modificar as características físico-químicas da calda e, conseqüentemente, favorecer a eficiência da aplicação e reduzir a deriva. Além disso, não se sabe se a morfologia dos conídios tais como tamanho e formato podem interferir na tensão superficial das suspensões utilizadas (MENDONÇA et al., 2007).

Devido à dificuldade de adicionar um surfactante compatível à formulação, muitas formulações não contém os componentes citados por Brar et al. (2006) como no trabalho de Nugroho e Ibrahim (2007), onde formulações de *B. bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Paecilomyces fumosoroseus* foram preparadas sem umectante, apenas com 60% de um determinado tipo de argila misturado aos conídios do fungo.

Kurgel (2014), avaliou formulações WP e emulsão concentrada (EC) com *Metarhizium anisopliae*. As formulações descritas como WP foram: (1) esporo puro; (2) arroz moído; (3) 80% amido de milho com 20% de ativo e (4) 85% talco com 15% de ativo. As formulações EC foram: (1) 15% ativo com 85% de óleo de soja; (2) 15% ativo, 80% óleo de soja e 5% Plurafac; (3) 15% ativo, 80% óleo de soja e 5% Bayer Xtra; (4) 15% ativo, 80% óleo de soja e 5% Tween 80. Quando avaliado a germinação das formulações EC após 24 horas, os três emulsionantes apresentaram-se estatisticamente iguais. Mas o fungo mostrou comportamento diferente após 50 dias a 20°C. A germinação das formulações apenas com o óleo de soja e a formulação com óleo de soja com Tween 80% foram próximas (em torno de 50%), enquanto as demais tiveram germinação abaixo de 10%. Para as formulações WP, a formulação de arroz moído diferiu significativamente das demais, com 50% de conídios viáveis. A viabilidade das demais foi inferior a 20% após 50 dias a 20°C.

Um estudo recente avaliou o efeito de três tensoativos não iônicos na germinação e crescimento micelial de três isolados de *Beauveria* spp. Os tensoativos avaliados foram Tween20, Tween80 e Break Thru nas concentrações 0,1, 0,5, 1 e 5%. Além da diferença entre o comportamento dos isolados, todos apresentaram uma diminuição na germinação. Break Thru diminuiu em 70% a germinação quando utilizado a 5%, e mesmo a 0,1% observou-se uma queda de 40% para dois isolados testados. Tween80 e Tween 20 promoveram uma queda brusca da germinação quando utilizado a 0,5% (MWAMBURI, 2015). O autor sugeriu uma das cepas como a mais adequada para se tornar um produto comercial por ser menos afetado quanto a germinação pelos diferentes surfactantes, e ser capaz de germinar rapidamente em uma ampla faixa de temperatura, de 25 a 30°C após 24 horas de incubação. As concentrações dos tensoativos que foram menos danosas ao isolado destacado foram 0,1% para Tween80 e Break

Thru, e 1% para Tween 20 (Mwamburi, 2015). Um ponto importante a ser considerado é, se a formulação for preparada com o tensoativo, o isolado deverá manter a viabilidade ao longo do tempo.

Esses estudos são insuficientes devido a carência de aditivos nas fórmulas avaliadas. Além disso, muitos estudos realizados visando o desenvolvimento de biológicos não estão disponíveis na íntegra na literatura, uma vez que essa tecnologia continua sendo segredo industrial das grandes empresas.

### **2.3.1 Avaliação das formulações**

No desenvolvimento de produtos biológicos, as formulações são avaliadas microbiologicamente e quanto as características físico-químicas. Microbiologicamente através dos testes de: germinação, Neubauer, unidade formadora de colônia, crescimento micelial e esporulação (EMBRAPA, 2013). Esses testes darão informações sobre a viabilidade e vigor do fungo inicialmente e a durante a vida útil das formulações para estimar a compatibilidade dos microrganismos com os componentes da formulação e a vida de prateleira do produto final.

Quando a compatibilidade é avaliada através do teste de germinação, o que se espera é que a germinação não tenha alterações significativas quando adicionado o tensoativo. Mas se houver uma inibição da germinação, que essa não altere o efeito inseticida do fungo. O efeito do surfactante na viabilidade do conídio no trabalho de Mwamburi (2015) foi avaliado com adição desse ao meio ágar e contagem dos conídios germinados após 24 horas de incubação, considerando que o comportamento dos mesmos surfactantes pode ser diferente quando em contato com os conídios em uma formulação, por exemplo. Assim, a seleção do surfactante é uma etapa crítica, pois não deve inibir a germinação dos esporos. Segundo Silva (2006), a germinação é a medida de avaliação da qualidade de biopesticidas (viabilidade). A qualidade desses produtos está associada a uma germinação maior que 85%.

No trabalho de Monteiro et al. (2014), o método de avaliação da compatibilidade através do índice biológico (associação entre germinação, crescimento vegetativo e esporulação). O objetivo foi analisar a compatibilidade de agentes molhantes e dispersantes com o isolado JAB 68 de *Metarhizium anisopliae*, para o desenvolvimento de composições de pó molhável. Os umectantes avaliados foram Tween 80 e Unitol L20 nas concentrações de 0,01, 0,05, 0,2, 0,5 e 1%. Para o Tween 80 todas as concentrações avaliadas foram compatíveis com o fungo, sem diferença estatística entre os valores de germinação e crescimento micelial. Enquanto que o

Unitol L20 foi compatível somente nas doses de 0,01 e 0,05% de acordo com índice biológico. Germinação e esporulação diferiram estatisticamente entre o tratamento controle e Unitol L20 0,01%. Para o controle, a germinação foi de 99,3% e a esporulação de  $4,12 \times 10^9$  conídios/mL. Já com a adição do umectante Unitol L20 a germinação reduziu para 97,5% e a esporulação para  $1,52 \times 10^9$  conídios/mL. Dessa forma, as concentrações compatíveis foram selecionadas para compor a formulação WP, a qual foi desenvolvida para controle de carrapatos bovinos, cigarrinha da folha e da raiz da cana-de açúcar e das pastagens.

Além da viabilidade do agente microbiano, a formulação deve apresentar determinadas características físicas, para uma boa performance ao ser diluída para aplicação. Nas formulações WP à base de fungo, a quebra da tensão superficial é a principal característica físico-química para uma boa aceitação do produto e uniformidade da aplicação.

A capacidade do surfactante em reduzir a tensão superficial pode ser avaliada diretamente pelo teste que mede a força para quebrar a tensão superficial, ou indiretamente através do tempo necessário para que o pó consiga penetrar na água (molhar). A metodologia de avaliação do tempo de umectação para produtos biológicos segue a mesma norma de agroquímicos da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, NRB 13242) para a determinação de molhabilidade. Para outros testes importantes, como granulometria e suspensibilidade, também é utilizado as metodologias desenvolvidas para produtos químicos (HERRMANN, 2014).

A Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico (ABCBio) recomenda que a norma NRB 13242 não seja aplicada a formulações contendo fungos, uma vez que esses são hidrofóbicos, e a norma não é específica para esse tipo de produto. Assim, a ABCBio, fundada em 2008, visa atender essa demanda do setor e criar normas específicas. A ABCBio já conquistou importantes mudanças nas leis e normas sobre os biológicos ao longo dos últimos anos junto ao MAPA, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais (Ibama) e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). O propósito da associação é desenvolver uma legislação específica, com regras claras sobre os defensivos biológicos, imensamente diferentes dos tradicionais químicos. Foi criado um grupo com a participação de fornecedores de matérias primas, empresas do controle biológicos e consumidor final para discutir e propor normas específicas para avaliação dos produtos biológicos considerando as particularidades de cada organismo (insetos, fungos, bactérias e vírus) (HERRMANN, 2014).

## 2.4 Tensão superficial

A tensão superficial está relacionada à diferença entre as energias das espécies na superfície e no interior do líquido. As moléculas em um líquido interagem umas com as outras e o grau desta atração vai depender das propriedades de cada substância. As interações de uma molécula no interior de um líquido são equilibradas por forças igualmente atrativas em todas as direções. Já as moléculas na superfície têm suas forças de atração formando uma resultante no sentido do interior do líquido. Por conta desse desequilíbrio de forças, as moléculas na superfície estão em um estado energético maior do que as moléculas no interior do líquido. A maior quantidade possível de moléculas irá sair da superfície e ir para o interior do líquido, por isso a superfície tende a contrair espontaneamente. A tensão superficial é, portanto, uma medida da energia de coesão presente numa interface. A presença de um segundo componente pode tanto aumentar quanto diminuir a tensão superficial de uma fase aquosa. Por exemplo, moléculas orgânicas com caráter anfifílico têm tendência de se dispor na interface já que a dissolução das mesmas em água é desfavorável. Desta forma, espécies anfifílicas se acumulam na superfície, dando origem a um filme superficial diminuindo a tensão superficial da água (GASPAR, 2015).

## 2.5 Tensoativo

Os tensoativos ou surfactantes são substâncias que pela sua estrutura e propriedades têm a capacidade de reduzir as tensões interfacial e superficial dos líquidos onde se encontram. Fazem parte da família das moléculas anfifílicas, que são moléculas que têm como característica duas regiões de solubilidades distintas e com distância suficiente para se comportarem de maneira independente, apesar de serem ligadas uma a outra. Os tensoativos possuem em sua estrutura uma cabeça polar, parte hidrofílica da molécula, e uma cauda apolar, parte hidrofóbica (VALE, 2009).

A parte hidrofóbica é um grupamento que consiste de uma ou mais cadeias hidrocarbônicas, que tem entre 10 e 20 átomos de carbono por cadeia. Podem ser citados parafinas, olefinas, álcoois, alquifenóis e alquilbenzenos (FARIAS, 2005). A cadeia pode ser saturada ou insaturada, linear ou ramificada, alifática e/ou aromática (JENSEN, 2007). A toxicidade de tensoativo com grupos alquil de cadeia longa deve ser cuidadosamente abordada, porque blastosporos e células fúngicas vegetativas podem ser mais sensíveis do que conídios aéreos (MASCARIN e JARONSKI, 2016).

Os grupos hidrofílicos podem ser divididos naqueles que ionizam ou não em solução aquosa. A propriedade hidrofílica daqueles que ionizam em água deriva de um forte caráter ácido ou básico que permite a formação de sais verdadeiros, altamente ionizáveis com a neutralização, a exemplos dos grupos sulfonato, sulfato, carboxilato e sais de amônio quartenário. Por outro lado, os grupos hidrofílicos não iônicos possuem uma multiplicidade de elementos que são hidrófilos fracos, mas que apresentam um efeito cumulativo. Com o aumento do número destes grupos, aumenta-se a hidrofilicidade do agregado ao nível desejado. Neste grupo incluem-se os polioxietilenos, sucrose e polipeptídeos, entre outros (FARIAS, 2005). Os tensoativos são classificados considerando a carga (ou ausência de carga) da sua superfície ativa (parte polar).

Os tensoativos têm alta aplicabilidade industrial, podendo ser utilizados, por exemplo, como: emulsificantes, agentes molhantes, solubilizantes, anti-espumantes e desemulsificantes (VALE, 2009). Os umectantes são os tensoativos que reduzem a tensão superficial e aumentam a molhabilidade. Nos tensoativos com características umectantes os grupos hidrofílicos e hidrofóbicos estão em equilíbrio, de modo que a presença do grupo hidrofílico torna um umectante mais solúvel em água, enquanto que o grupo hidrofóbico é repelido pela água. Assim há maior quantidade de tensoativos na superfície ou próximo a superfície da líquido (FARIAS, 2005).

### **2.5.1 Tensoativo não iônico**

O tensoativo não iônico não fornece íons em solução aquosa e sua hidrofília se deve à presença, em suas moléculas, de grupamentos funcionais que possuam forte afinidade pela água. Apresentam características bem particulares, visto que são compatíveis quimicamente com a maioria dos outros tensoativos e suas propriedades são pouco afetadas pelo pH. Este fato os torna bastante atrativos do ponto de vista industrial. Existem basicamente três grandes grupos de tensoativos não iônicos: alcanolamidas de ácidos graxos, ésteres de ácidos graxos como polióis e tensoativos etoxilados e propoxilados. Como exemplos de tensoativos não iônicos têm-se os tweens e spans. (DALTIM, 2011). Jin et al. (2009) sugere o uso de tensoativos não iônicos associado a microrganismos, por serem considerados menos tóxicos que os tensoativos iônicos.

Os spans são agentes emulsivos derivados da desidratação do sorbitol, esterificados com um ácido graxo como o láurico, palmítico, esteárico e oléico. Seu uso apresenta maior aplicação



como agente emulsivo em emulsões do tipo água/óleo (A/O). O span 80, monoleato de sorbitano é um líquido oleoso, amarelo pálido, solúvel nos óleos e corpos gordurosos, com *Equilíbrio Hidrófilo – Lipófilo* (EHL) igual a 4,3 (JENSEN, 2007).

Os tweens são conhecidos como polissorbitatos e são derivados dos spans, nos quais foram inseridas uma ou várias cadeias polietilênicas. O tween 80 é o monoleato de polioxietilenossorbitano, um líquido oleoso de cor amarela citrina, solúvel em água e nos óleos minerais e vegetais, com valor de EHL igual a 15 (JENSEN, 2007). O Twenn 80 tem sido altamente usado em laboratório para ajudar a suspender conídios hidrofóbicos em água (KRUGER et al., 2014).

### **2.5.2 Tensoativo aniônico**

Tensoativos aniônicos são aqueles que fornecem íons negativamente carregados em solução aquosa. Os alquil sulfonatos, alquil fosfatos e alquilbenzenosulfonatos e os carboxilatos são representantes dessa classe de tensoativo (FARIAS, 2005; DALTIM, 2011).

Possuem função de detergência, com melhor resultado quando as cadeias alquila ou alquilarila estão na faixa de 12 a 18 átomos de carbono, mas principalmente na faixa de 12 a 14 átomos de carbono. Os contra íons mais utilizados são sódio, potássio, amônio e cálcio. O sódio e potássio promovem rápida dissociação do tensoativo e uma alta solubilidade em água. O cálcio (a maioria dos sais de cálcio é insolúvel em água) auxilia na solubilização em óleo, sendo comumente utilizado para preparação de emulsões água em óleo. Além disso, os tensoativos aniônicos tem sua solubilidade reduzida na presença de eletrólitos (DALTIM, 2011). O dodecilbenzenosulfonato de sódio (DBS) constitui, quantitativamente, a classe mais importante de umectantes, devido às suas propriedades e seu baixo custo de produção, sendo utilizado principalmente na formulação de detergentes e produtos de limpeza domésticos e industriais. São produzidos por alquilação do benzeno com cloreto de alquila ou olefinas correspondentes e posterior sulfonação do alquilbenzeno obtido e sua neutralização. A sulfonação dos alquilbenzenos, que à baixas temperaturas geralmente ocorrem em posição *para*, pode ser feita com ácido sulfúrico concentrado, óleum ou trióxido de enxofre, sendo este último o processo mais utilizado (FARIAS, 2005).

### 2.5.3 Tensoativo catiônico

Tensoativo catiônico são aqueles que fornecem íons carregados positivamente em solução aquosa. A maioria dos tensoativos catiônicos contém na molécula pelo menos um átomo de nitrogênio com uma carga positiva, como aminas e quaternários de amônio. Aqueles tensoativos que contêm amina só funcionam no estado protonado, portanto só podem ser utilizados em meio ácido. Já os quaternários de amônio não são sensíveis a variações de pH (DALTIM, 2011).

Há ainda o tensoativo anfótero, esses possuem caráter iônico duplo, possuindo propriedades dos tensoativos aniônicos a altos valores de pH e dos tensoativo catiônico a baixos valores de pH. Os aminoácidos e as betaínas são os principais representantes desta classe (DALTIM, 2011).

## 2.6 Micelas

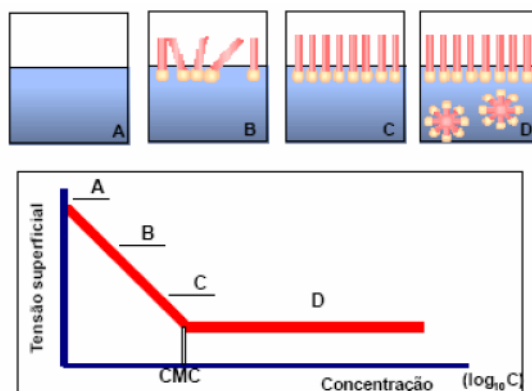
A concentração micelar crítica (CMC) é a mais importante característica físico química de um tensoativo, pois representa a barreira entre concentrações em que as moléculas dos tensoativos têm comportamentos diferentes, importante para entender as possíveis aplicações de cada tensoativo. A CMC de um tensoativo pode ser medida pela avaliação das propriedades físico químicas, como a tensão superficial. Acima da CMC a concentração do tensoativo livre se mantém praticamente constante e a concentração de micelas cresce com o aumento da concentração total do tensoativo (DALTIM, 2011).

Quando um terceiro componente é adicionado a uma solução aquosa de tensoativo o equilíbrio se altera. Se a solução se encontra abaixo do CMC, a solubilidade do novo aditivo será essencialmente a mesma que seria em água. Mas, caso a concentração do tensoativo seja acima da CMC, poderá ser observado um aumento significativo da solubilidade, quando o aditivo é mais estável dentro das micelas disponíveis do que na fase continua (DALTIM, 2011).

Para entender a ação de um umectante observa-se a distribuição do umectante numa solução aquosa e o efeito na tensão superficial. A representação esquemática apresentada na Figura 2 ilustra esse fenômeno. A adição de umectantes à água tende a saturar todas as interfaces (situações B e C), de modo que a partir de uma CMC há a saturação do meio e a formação de micelas (situação D). A micela é a forma que o umectante assume para melhorar a estabilidade

na solução deixando as cadeias hidrofóbicas juntas e as cadeias hidrofílicas voltadas para a água (FARIAS, 2005).

Figura 2 – Distribuição do umectante numa solução aquosa, efeito na tensão superficial e formação de micelas



Fonte: (FARIAS, 2005).

Acredita-se que seja interessante a formação de micelas no preparo de uma suspensão a partir de uma formulação. Como os conídios de *B. bassiana* são hidrofóbicos, e se esses ficarem no interior das micelas, a formulação será mais facilmente incorporada na água. Dessa forma, menor será o tempo de umectação, mais rápido será o preparo da calda homogênea, onde o microrganismo vai estar disperso de forma uniforme e não na superfície da água devido a sua hidrofobicidade.

## 2.7 Balanço Hidrofílico-Lipofílico

Em 1948, Griffin introduziu a noção de *Equilíbrio Hidrófilo – Lipófilo*, (EHL), estabelecendo assim um sistema para classificar os tensoativos numericamente, segundo as suas características hidrofílicas e lipofílicas. Cada surfactante tem um determinado número de EHL, que varia de 0 a 20, de acordo com sua estrutura química. O número de EHL do surfactante pode ser calculado sabendo-se o número dos grupos lipofílicos e hidrofílicos contidos na molécula, de acordo com a Equação 1. (DALTIM, 2011)

Equação 1

$$\text{EHL} = 7 + \Sigma (\text{n}^\circ \text{ dos grupos hidrofílicos}) - \Sigma (\text{n}^\circ \text{ dos grupos lipofílicos}) \quad (1)$$

O número de EHL dos surfactantes fornece uma indicação útil da solubilidade em qualquer fase óleo e/ou água e também pode ser usado para preparações de emulsões. A Tabela

2 indica a aplicação mais comum dos tensoativos de acordo com o valor do EHL. Uma molécula, com alto número de EHL, apresenta um maior número de grupos hidrofílicos.

Tabela 2: Classificação dos tensoativos de acordo com o valor de EHL

| Faixa de EHL | Aplicação                     |
|--------------|-------------------------------|
| 3 – 6        | Emulsionante de água em óleo  |
| 7 – 9        | Umectante                     |
| 8 – 14       | Emulsionante de óleo em água  |
| 9 – 13       | Detergente                    |
| 10 – 13      | Solubilizante                 |
| Acima de 12  | Dispersante de sólido em água |

Fonte: (DALTIM, 2011)

Sabendo que controle biológico está em crescimento exponencial e diante dos grandes avanços e investimentos no desenvolvimento dos produtos biológicos, há uma constante melhoria nos produtos levando ao controle biológico mais efetivo. A seleção dos componentes da formulação, principalmente os tensoativos para diminuir a hidrofobicidade do fungo agregam qualidade e mais eficiência ao produto. Assim tensoativos já aplicados a produtos agrícolas, foram avaliados afim de desenvolver uma formulação de fácil preparo, ou seja, de diminuir a hidrofobicidade do fungo, com viabilidade a temperatura ambiente. Dessa forma, há potencial para se tornar um produto comercial para aplicação nas culturas de soja, feijão, cana e café, por exemplo, onde há problemas com insetos pragas.

Esse trabalho está disposto em formato de capítulos, os quais serão apresentados no formato de artigo científico. No capítulo seguinte intitulado “Surfactant selection for enhancing the wettability of *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. (1912) (Ascomycota: Cordycipitaceae) powder formulations” serão abordados a avaliação de 25 diferentes tensoativos para a seleção daqueles compatíveis com o fungo *Beauveria* sp. Dos 25 tensoativos 5 foram selecionados e então dois tensoativos para seguirem o desenvolvimento do trabalho. Os dois tensoativos selecionados, Emulsogen TS200 e Surfom D foram avaliados em combinação de maneira a tentar se obter um produto com boas características de umectação e estabilidade para armazenamento. Estes resultados estão apresentados no capítulo 4, intitulado: “Combinações do uso de tensoativos no processo de desenvolvimento de formulação *wettable powder* de *B. bassiana*”.

### 3 Surfactant selection for enhancing the wettability of *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. (1912) (Ascomycota: Cordycipitaceae) powder formulations

Morganna Resse Melo<sup>a</sup>, Marta Fernanda Zotarelli<sup>a</sup>, Líbia Diniz Santos<sup>a</sup>, Edgar Silveira<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Federal University of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil 38408-100

*E-mail addresses:* morgannaressemelo@gmail.com (M.R. Melo), martazotarelli@ufu.br (M.F. Zotarelli), libia@ufu.br (L.D. Santos), edgar@ufu.br (E. Silveira).

#### ABSTRACT

Entomopathogenic fungal products such as *Beauveria* sp. formulations are recognized for their effectiveness in controlling insect pests, attributed to the ability to adhere to the insect cuticle through hydrophobins. However, because of their high hydrophobicity, fungal agents require the addition of surfactants to reduce particle aggregation during application. This study aimed to select surfactants that can improve the wettability of *Beauveria bassiana* formulations without affecting fungal viability. In a first experiment, formulations prepared using 25 different surfactants were tested for viability after 30 days of storage at 25 °C. Six surfactants provided the best results and were selected for further experiments. New formulations were prepared and evaluated for surface tension, wetting time, conidial germination, viability, and biological index during 3 months of storage. The shortest wetting time (1.61 min) and lowest surface tension (38 mN/m) were obtained using Emulsogen TS 200 at 5%. All six formulations showed a decrease in germination after 1 month of storage. After 3 months of storage, the control formulation and formulations prepared using Surfom D had germination rates of 0% and 55%, respectively. The highest viability ( $1.14 \times 10^9$  colony-forming units/g) was obtained with Surfom D. *B. bassiana* was found compatible with 5% Emulsogen TS 200 and Surfom D. Emulsogen TS 200 was the most effective in reducing surface tension but decreased fungal viability and conidial germination. Surfom D showed poor wetting properties but increased *B. bassiana* germination rate.

**Keywords:** Formulation, *Beauveria bassiana*, Surfactant, Compatibility

### 3.1 Introduction

Intensive use of chemical insecticides has been linked to widespread pest resistance, elimination of beneficial organisms, and contamination of crops, soil, water resources, and animals. Alternative pest control measures, such as biological control, have attracted increasing attention of farmers and researchers. In Brazil, the demand for biological pesticides has grown at an annual rate of 20%, and is likely to continue to increase as new products enter the market. The number of registered products rose from 19 in 2010 to 143 in 2017 (Monteiro, 2017).

Entomopathogenic fungi, such as *Beauveria* spp. and *Metarhizium* spp., are the main microorganisms used for biological control of pest insects (Faria and Wraight, 2007). To be effective, fungal agents need to maintain their viability during storage, handling, and field application (Alves et al., 2007). Fungal formulations should be designed to minimize contamination, provide protection against abiotic stresses, and allow storage at ambient temperature. Many different types of formulations have been developed, but the most common fungal products are wettable powders (Brazil, 2016). For instance, of the 32 *Beauveria* products currently marketed in Brazil, 21 are wettable powders (Brazil, 2020). Powder formulations with good wettability offer several advantages, such as easy preparation, low cost (Silva and Neves, 2016), and easy application (Brar et al., 2006).

The development of biological control products based on *Beauveria* sp. is challenging. *Beauveria* fungal spores are highly hydrophobic as a result of the presence of cysteine-rich proteins called hydrophobins in their cell wall. The exoskeleton of insects is also composed of chitin, a highly hydrophobic, water repellent molecule (Gallo et al., 2002). Thus, the addition of surfactants to *Beauveria* formulations may contribute to improving both wettability and efficiency. This study aimed to assess the effect of different surfactants on the surface tension, wetting time, viability, and germination rate of *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. (1912) (Hypocreales: Cordycipitaceae) powder formulations after 3 months of storage at 25 °C.

### 3.2 Material and methods

The tests were performed with *B. bassiana* strain GF 429. Surfactants were kindly provided by Croda Ltd. (Campinas, SP, Brazil), Oxiteno (São Paulo, SP, Brazil), and Clariant AG (Blumenau, SC, Brazil) (Table 2). All other reagents were of analytical grade.

**Table 3:** Description of surfactants used in this study.

| Code | Brand name         | Manufacturer | Chemical composition                                              | EHL* | Type of surfactant | Aspect | Function      |
|------|--------------------|--------------|-------------------------------------------------------------------|------|--------------------|--------|---------------|
| 1    | Crodasinc LS95     | Croda        | Sodium sarcosine                                                  | 16   | Anionic            | Solid  | -             |
| 2    | Dispersol BB4      | Croda        | -                                                                 | -    | -                  | Solid  | -             |
| 3    | Surfom D           | Oxiteno      | Sodium naphthalene condensate sulfonate                           | -    | Anionic            | Solid  | Dispersant    |
| 4    | Morwet EFW         | Akzonobel    | Sodium alkyl naphthalene sulfonate blender and Anionic surfactant | -    | Anionic            | Solid  | Wetting agent |
| 5    | Surfom WG 8168     | Oxiteno      | Sodium alkyl naphthalene condensate sulfonate                     | -    | Anionic            | Solid  | Dispersant    |
| 6    | Surfom HRB         | Oxiteno      | Alkyl naphthalenes sulphate de sodium                             | -    | Anionic            | Solid  | Wetting agent |
| 7    | AlkEST TW80        | Oxiteno      | Sorbitan monooleate 80EO                                          | 15   | -                  | Liquid | Emulsifier    |
| 8    | Alkosynt IT 120    | Oxiteno      | Isotridecyl alcohol 12 EO                                         | 14.5 | Non-ionic          | Liquid | Emulsifier    |
| 9    | AlkEST TW20        | Oxiteno      | Sorbitan Monolaurate 20EO                                         | 16.7 | -                  | Liquid | Emulsifier    |
| 10   | Dispersogen BSI    | Clariant     | Blender                                                           | 14   | Anionic            | Solid  | Wetting agent |
| 11   | Dispersogen PD     | Clariant     | Blender                                                           | 9    | Anionic            | Solid  | Wetting agent |
| 12   | Genapol X 060      | Clariant     | C13 oxo-Alcohol ethoxylate with 6 EO                              | 11   | Non-ionic          | Liquid | -             |
| 13   | Emulsogen TS 200   | Clariant     | Tristyryl phenol polyethylene glycol ether                        | 14   | Non-ionic          | Liquid | Emulsifier    |
| 14   | Alkonat L70        | Oxiteno      | Lauric Alcohol 7EO                                                | 12.1 | Non-ionic          | Liquid | Emulsifier    |
| 15   | Ultranex NP 95     | Oxiteno      | Nonylphenol 9.5 EO                                                | 13.0 | Non-ionic          | Liquid | Emulsifier    |
| 16   | Alkosynt IT 60     | Oxiteno      | Isotridecyl alcohol 6 EO                                          | 11.5 | Non-ionic          | Liquid | Emulsifier    |
| 17   | Dispersogen SIB    | Clariant     | Blender                                                           | -    | -                  | Solid  | -             |
| 18   | Surfom 260         | Oxiteno      | Alcohol ethoxylate adsorbed on silica                             | -    | -                  | Solid  | Wetting agent |
| 19   | Alkosynt ID 60     | Oxiteno      | Isodecyl alcohol 6 EO                                             | 12.5 | Non-ionic          | Liquid | Emulsifier    |
| 20   | Alkosynt IT 80     | Oxiteno      | Isotridecyl alcohol 8 EO                                          | 12.8 | Non-ionic          | Liquid | Emulsifier    |
| 21   | Triton x 100       | -            | Octylphenol ethoxylate                                            | 13.5 | Non-ionic          | Liquid | -             |
| 22   | Morwet 3020        | Akzonobel    | Blender Alkyl naphthalene desulfonate                             | -    | Anionic            | Solid  | -             |
| 23   | Morwet IP          | Akzonobel    | Isopropyl sodium naphthalene sulfonate                            | -    | -                  | Solid  | Wetting agent |
| 24   | Alkopon NS ECO 92N | Oxiteno      | -                                                                 | -    | -                  | Liquid | -             |
| 25   | Bluesil SP3309     | Elkem        | -                                                                 | 12   | -                  | Liquid | Silicone      |

\* hydrophilic–lipophilic balance Source: Own authorship

A first experiment was designed to determine the compatibility of *B. bassiana* conidia and surfactants at 5% and 10% concentration. After 30 days of storage at 25 °C, formulations were evaluated for viability and wetting time, and the best surfactants were selected for further investigations. In a second experiment, new formulations were prepared using the selected surfactants at 5%. Formulations were analyzed for viability, germination rate, wetting time during 3 months and surface tension was evaluated after the preparation of the formulation and after 1 months. All formulations were storage at 25 °C during the evaluations. The biological index was also determined.

### 3.2.1 Culture conditions

Conidial preparations were produced by solid-state fermentation using rice as substrate. After 7 days of incubation, rice was dried at 28 °C to 10% moisture, and conidia were separated by sieving. Three batches were used in the experiments.

### 3.2.2 Preparation of powder formulations

Powder formulations were prepared by manually shaking the components in a polypropylene bag. Each formulation contained 20% *B. bassiana* conidia, 5 or 10% surfactant, and 70 or 75% Kaolin (Infinity Pharma, Campinas, SP, Brazil). Powder formulations were

stored in air-tight dark polypropylene containers at 25 °C. As a control a formulation made by a mix of *B. bassiana* conidia and Kaolin was used to compare with formulations contend the surfactants.

### **3.2.3 Wetting time**

Wetting time was determined according to ABNT NBR 13242 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2005).

### **3.2.4 Fungal viability**

Formulations were serially diluted in (distilled water with tween 1%), plated on potato dextrose agar (PDA), and incubated at  $25 \pm 1$  °C for 5 days under a 12 h photoperiod. Colonies were counted, and results are expressed in colony-forming units (CFU)/g (EMBRAPA, 2013).

### **3.2.5 Germination rate**

Germination rate was determined by pipetting 20 µL of a conidial suspension ( $10^6$  conidia/mL) obtained from each formulation on equidistant points of a PDA plate and incubating the samples at 25 °C for 20 h. Conidia with a germ tube longer than the conidial diameter were considered to have germinated (EMBRAPA, 2013).

### **3.2.6 Surface tension**

Surface tension was determined by the du Noüy ring method using a force tensiometer (K6, Krüss GmbH, Hamburg, Germany), previously calibrated with 99.7% ethyl alcohol (Tropea, 2007). Powders (0.3 g) were suspended in 50 mL of distilled water for analysis.

### **3.2.7 Biological index**

Colony diameter, sporulation rate, and germination rate were determined according to Martins, Alves and Mamprim (2016) in triplicate. Briefly, a suspension of  $5.25 \times 10^6$  pure conidia/mL was plated on PDA containing 5% surfactant and incubated for 15 days at  $25 \pm 1$



°C. After that, the colony diameter was measure, quantity of conidia produced (sporulation), and germination were determined and used to calculate the biological index (BI) of surfactants, according to Eq. (2):

$$BI = [47(D) + 43(S) + 10(G)] \div 100 \quad (2)$$

where  $D$  is the colony diameter,  $S$  is the sporulation rate, and  $G$  is the germination rate. Parameters are relative to control.

BI values were used as a measure of surfactant toxicity or compatibility (Alves et al., 2007). Surfactants were classified into toxic ( $BI < 42$ ), moderately toxic ( $42 \leq BI \leq 66$ ), and compatible ( $BI > 66$ ) (Araujo, 2009; Pinto et al., 2012; Monteiro et al., 2014).

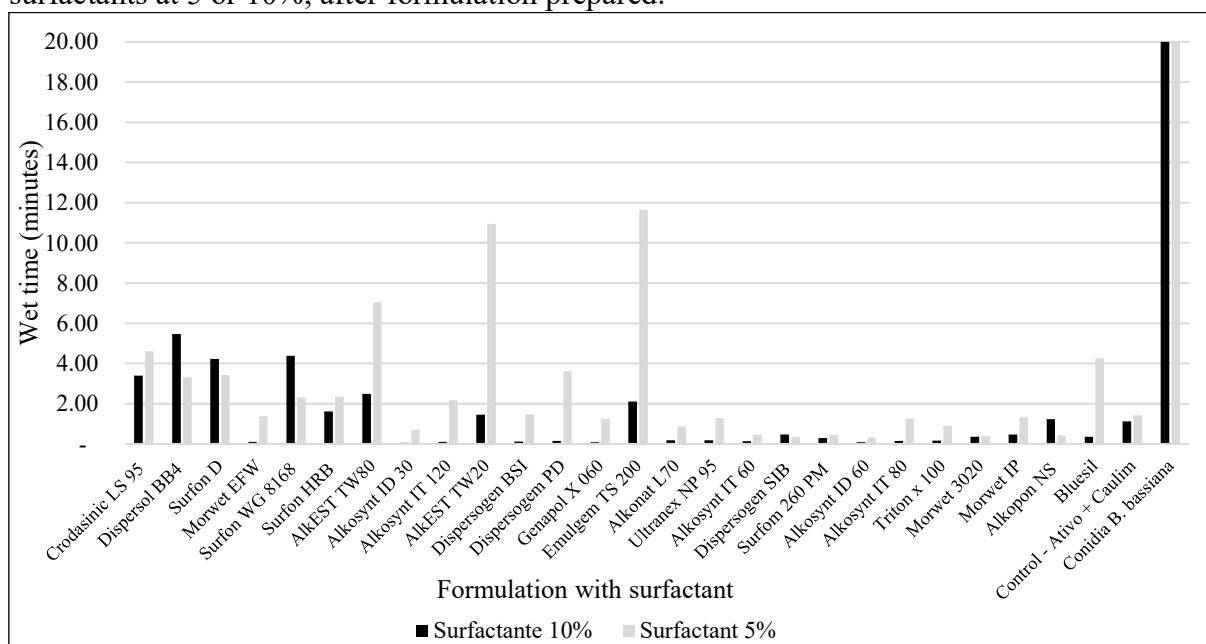
### 3.2.8 Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate. Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) followed by the Scott–Knott test at a significance level of 0.05 using the Sisvar statistical software version 5.6.

## 3.3 Results and discussion

The wetting time of *B. bassiana* formulations prepared with different surfactants at 5 or 10% is shown in Fig. 3. The control (fungal spores) took more than 20 min to wet. All surfactants were effective in reducing wetting time compared with the control. Formulations prepared with 10% surfactant took  $1.82 \pm 1.58$  min to wet, and formulations composed of 5% surfactant took  $3.21 \pm 3.03$  min.

**Fig. 3.** Wetting time of 1 g of *Beauveria bassiana* powder formulations containing different surfactants at 5 or 10%, after formulation prepared.



Wetting times of less than 2 min were obtained using the following surfactants at 5%: Morwet EFW, Dispersogen BSI, Genapol X-060, Alkonat L 70, Ultrane NP 95, Alkosynt IT 60, Dispersogen SIB, Surfom 260 PM, Alkosynt ID 60, Alkosynt IT 80, Triton X-100, Morwet 3020, Morwet IP, and Alkopon NS. Among formulations composed of 10% surfactant, the longest wetting times were observed using Alkest TW 80 (7 min), Alkosynt IT 120 (11 min), and Genapol X-060 (12 min). There is no general consensus about the ideal wetting time for biological formulations, but short wetting times are preferred.

Surfactants with a hydrophilic–lipophilic balance (HLB) value of 7 to 9 are classified as wetting agents (Daltin, 2011). Thus, of the surfactants analyzed in this study, only Dispersogen PD can be classified as such. The manufacturer states that Dispersogen PD, Dispersogen BSI, Surfom 260, Surfom HRB, Morwet EFW, and Morwet IP have wetting properties. Formulations containing these surfactants had wetting times of less than 3 min.

Jin et al. (2008) prepared wettable powder formulations using two strains of *B. bassiana* and 0.2% surfactant. The authors compared the wetting times of formulations (0.1 g) composed of Ethal TDA with different HLB values, Triton X-100, Span 80, and Tween 80. The shortest wetting times were 1.2 and 3.2 min, obtained using Ethal TDA with an HLB value of 8 and 10, respectively. Span 80 led to the worst results (Jin et al., 2008). Span 80 and Alkest TW 80 (used in this study) are two commercial brands of sorbitan monooleate. In accordance with the results of Jin et al. (2008), in this study, Alkest TW 80 led to poor results; the wetting time of the

formulation was 7.05 min. This is likely due to the emulsification activity of sorbitan monooleate in water/oil emulsions.

**Table 53** shows the viability of *B. bassiana* conidia in wettable powder formulations. Microbial viability was significantly influenced by surfactant concentration. Only Morwet IP, Emulsogen TS 200, and Surfom D at 5% did not affect *B. bassiana* viability during storage. Most formulations containing 10% surfactant showed a substantial reduction in viability after 30 days. Surfom D, Surfom WG 8168, and Bluesil SP 3309 at 10% caused viability losses of 42, 30, and 43%, respectively. Fungal counts did not vary in formulations containing Dispersol BB4. Formulations containing 10% Dispersogen BSI, Morwet 3020, or Morwet IP also did not lose viability after 30 days, but initial counts were lower than that of the control. Only *B. bassiana* conidia were also evaluated and a significant reduction in viability was observed after 30 days, showing that viability was affected by storage, regardless of the presence of surfactants.

Microbial viability is affected by temperature, moisture, water activity, and oxygen concentration (Kruger et al. 2014). Formulations were stored at 25 °C, but microbial products have greater viability at lower temperatures, such as 4 °C. The moisture content was lower than 8%. As formulations were not vacuum-packed, the presence of oxygen may have stimulated metabolic activity (Zorzetti et al., 2014).

**Table 4:** Fungal count (CFU/g) of *B. bassiana* powder formulations containing different surfactants at 5 or 10% after 30 days of storage at 25 °C.

| Surfactant          | Concentration: 5%                |                                          | Concentration: 10%               |                                          |
|---------------------|----------------------------------|------------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------------|
|                     | CFU/g ( $\times 10^9$ )<br>1 day | CFU/g ( $\times 10^9$ )<br>after 30 days | CFU/g ( $\times 10^9$ )<br>1 day | CFU/g ( $\times 10^9$ )<br>after 30 days |
| Crodasinc LS 95     | $0.873 \pm 0.80^{Ba}$            | $1.80 \pm 0.68^{Ab}$                     | $2.99 \pm 0.36^{Da}$             | $0.10 \pm 0.01^{Ab}$                     |
| Dispersol BB4       | $9.10 \pm 0.95^{Ba}$             | $11.8 \pm 4.35^{Cb}$                     | $1.78 \pm 0.23^{Ba}$             | $1.56 \pm 0.03^{Ba}$                     |
| Surfom D            | $10.2 \pm 1.79^{Aa}$             | $9.27 \pm 1.00^{Ca}$                     | $3.25 \pm 0.08^{Da}$             | $1.37 \pm 0.33^{Bb}$                     |
| Morwet EFW          | $8.77 \pm 1.25^{Ba}$             | $2.29 \pm 0.79^{Ab}$                     | $1.02 \pm 0.22^{Aa}$             | $0.32 \pm 0.082^{Ab}$                    |
| Surfom WG 8168      | $9.77 \pm 2.86^{Aa}$             | $3.17 \pm 0.21^{Ab}$                     | $3.56 \pm 0.55^{Ea}$             | $1.07 \pm 0.083^{Bb}$                    |
| Surfom HRB          | $1.15 \pm 3.01^{Aa}$             | $2.07 \pm 0.20^{Ab}$                     | $3.51 \pm 0.15^{Ea}$             | $0.29 \pm 0.18^{Ab}$                     |
| AlkEST TW80         | $1.11 \pm 1.95^{Aa}$             | $2.41 \pm 0.11^{Ab}$                     | $1.36 \pm 0.25^{Ba}$             | $0.03 \pm 0.004^{Ab}$                    |
| Alkosynt IT 120     | $1.10 \pm 1.00^{Aa}$             | $3.14 \pm 0.25^{Ab}$                     | $0.71 \pm 0.12^{Aa}$             | $0.02 \pm 0.006^{Ab}$                    |
| AlkEST TW20         | $7.73 \pm 1.25^{Ba}$             | $2.56 \pm 1.20^{Ab}$                     | $2.51 \pm 0.99^{Ca}$             | $0.002 \pm 0.0002^{Ab}$                  |
| Dispersogen BSI     | $10.6 \pm 0.50^{Aa}$             | $5.73 \pm 0.32^{Bb}$                     | $0.64 \pm 0.021^{Aa}$            | $0.31 \pm 0.14^{Aa}$                     |
| Dispersogen PD      | $11.5 \pm 1.73^{Aa}$             | $4.08 \pm 0.33^{Bb}$                     | $3.10 \pm 0.035^{Da}$            | $0.27 \pm 0.03^{Ab}$                     |
| Genapol X 060       | $11.9 \pm 5.64^{Aa}$             | $6.17 \pm 0.67^{Bb}$                     | $2.63 \pm 0.56^{Ca}$             | $0.03 \pm 0.007^{Ab}$                    |
| Emulsogen TS 200    | $4.48 \pm 0.21^{Aa}$             | $3.51 \pm 0.38^{Ba}$                     | $1.69 \pm 0.37^{Ba}$             | $0.26 \pm 0.01^{Ab}$                     |
| Alkonat L70         | $14.4 \pm 2.15^{Da}$             | $1.15 \pm 0.44^{Ab}$                     | $2.50 \pm 0.37^{Ca}$             | $0.004 \pm 0.001^{Ab}$                   |
| Ultranex NP 95      | $6.98 \pm 0.63^{Ba}$             | $3.73 \pm 0.38^{Bb}$                     | $2.51 \pm 0.35^{Ca}$             | $0.23 \pm 0.05^{Ab}$                     |
| Alkosynt IT 60      | $8.33 \pm 0.55^{Ba}$             | $2.91 \pm 0.89^{Ab}$                     | $3.66 \pm 0.015^{Ea}$            | $0.04 \pm 0.006^{Ab}$                    |
| Dispersogen SIB     | $12.0 \pm 0.38^{Aa}$             | $2.68 \pm 0.96^{Ab}$                     | $3.00 \pm 0.54^{Da}$             | $0.02 \pm 0.007^{Ab}$                    |
| Surfom 260 PM       | $15.4 \pm 2.57^{Da}$             | $0.04 \pm 0.01^{Ab}$                     | $2.99 \pm 0.34^{Da}$             | $0.001 \pm 0.0006^{Ab}$                  |
| Alkosynt ID 60      | $12.1 \pm 1.57^{Aa}$             | $2.48 \pm 0.26^{Ab}$                     | $1.66 \pm 0.37^{Ba}$             | $0.004 \pm 0.003^{Ab}$                   |
| Alkosynt IT 80      | $8.60 \pm 1.68^{Ba}$             | $5.17 \pm 0.93^{Bb}$                     | $1.49 \pm 0.23^{Ba}$             | $0.03 \pm 0.006^{Ab}$                    |
| Triton x 100        | $8.70 \pm 0.76^{Ba}$             | $2.01 \pm 1.04^{Ab}$                     | $2.50 \pm 0.57^{Ca}$             | $0.44 \pm 0.02^{Ab}$                     |
| Morwet 3020         | $6.00 \pm 1.00^{Aa}$             | $1.49 \pm 0.45^{Ab}$                     | $0.61 \pm 0.059^{Aa}$            | $0.56 \pm 0.21^{Aa}$                     |
| Morwet IP           | $4.80 \pm 0.95^{Aa}$             | $2.27 \pm 0.40^{Aa}$                     | $0.72 \pm 0.12^{Aa}$             | $0.36 \pm 0.04^{Aa}$                     |
| Alkapon NS          | $8.43 \pm 0.57^{Ba}$             | $3.15 \pm 0.52^{Ab}$                     | $5.74 \pm 0.77^{Fa}$             | $0.33 \pm 0.09^{Ab}$                     |
| Bluesil             | $10.80 \pm 1.21^{Aa}$            | $3.73 \pm 4.40^{Bb}$                     | $3.12 \pm 0.82^{Da}$             | $1.35 \pm 0.14^{Bb}$                     |
| Formulation Control | $9.13 \pm 2.61^{Ba}$             | $2.71 \pm 0.55^{Ab}$                     | $3.12 \pm 0.82^{Da}$             | $0.34 \pm 0.07^{Ab}$                     |

Means followed by the same uppercase letters in a column or lowercase letters in a row do not differ at  $p < 0.05$  by the Scott–Knott test.

Surfactants were selected on the basis of fungal viability after 30 days of storage, as all formulations were able to reduce the wetting time. At 10%, Morwet IP, Dispersogen BSI, Dispersol BB4, and Morwet 3020 were found compatible with *B. bassiana*, whereas, at 5%, Surfom D, Morwet IP, and Emulsogen TS 200 were compatible. These surfactants were chosen for further analyses. Surfactant compatibility is generally associated with its concentration in the formulation (Zorzetti et al., 2014). The lower the surfactant concentration, the greater the chances of not affecting fungal viability. Therefore, compatible surfactants were used at 5% in subsequent experiments.

Dunlap, Behle, and Jackson (2014) observed that the alkyl chain length of a surfactant is inversely proportional to fungal viability; surfactants with long alkyl chains are able to

penetrate the cell membrane. This explains why Morwet EFW, Surfom WG 8168, and Surfom HRB, which are based on sodium alkyl naphthalene, substantially decreased fungal viability after 30 days of storage, whereas, Surfom D, based on sodium naphthalene, did not.

UltraneX NP 95 (nonylphenol) at 5% decreased viability by 50%. This result differs from previous reports. Tanzini et al. (2001) classified Surfom 950 and Surfom WP, both based on nonylphenol, as compatible with *B. bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Santos et al. (2012) used UltraneX NP 100 and Unitol L 20 at 0.1% in *B. bassiana* formulations and observed that surfactants were compatible with the fungus and that viability was influenced by the HLB value. It is known that the effect of chemical products on fungi varies according to species and strain, chemical compound, concentration, and analytical method (Zorzetti et al., 2014). Products containing nonylphenol and their ethoxylates were classified as priority hazardous substances by the European Water Framework Directive (2000/60/EC) because they are environmentally persistent and toxic to aquatic life. Nonylphenol mimics the natural hormone 17 $\beta$ -estradiol, causing negative health effects in wildlife and humans (Silva and Neves, 2016). Its use in agriculture has declined. In Brazil, the compound is prohibited only in the state of Rio Grande do Sul (Brazil, 2012).

Compatibility between surfactant and fungus must be assessed not only at the time of preparation but also after storage. Alves et al. (2002) observed a negative effect of surfactants on microbial viability after 35 days of storage. Silva and Neves (2016) observed a significant reduction in germination after a formulation composed of 15% *B. bassiana* conidia, 10% silica-adsorbed nonylphenol, 10% sodium alkyl naphthalene, and 65% diatomite was stored at  $6 \pm 2$  °C for 90 days; the reduction in germination rate was attributed to the presence of surfactants.

A second experiment was carried out using the six selected surfactants to confirm their compatibility with *B. bassiana*. Formulations were evaluated for viability, germination, wetting time, and surface tension. According to Santos et al. (2012), chemical compounds can inhibit germination and vegetative growth. Thus, analysis of fungal count (CFU/g), although useful, does not provide conclusive results about fungal compatibility. The germination test was performed to assess the effects of surfactant on conidial germination.

**Table 5** shows the wetting time of powder formulations with 6 surfactants during 3 months of storage. The wetting time of the conidia of *B. bassiana* was 14.31 min at the beginning of storage, 3.47 min after 1 month, and 2.46 min after 2 months. Singh et al. (2004) observed an effect of culture age on *Coniothyrium minitans* cell surface hydrophobicity and

electrostatic charge. Conidial hydrophobicity was found to decrease with culture age, whereas cell surface electrostatic charge became more negative with culture age.

The surfactants that promoted the shortest wetting times in average were Emulsogen TS 200 (1.61 min) and Dispersogen BSI (2.02 min). Formulations containing Dispersol BB4 (8.44 min) and Surfom D (10.32 min) had longer wetting times than the control after storage, indicating that these surfactants have poor wetting properties.

**Table 5:** Wetting time of *Beauveria bassiana* formulations containing different surfactants at 5% during 3 months of storage. , according to ABNT NBR 13242.

| Surfactant          | Wet time (min) $\pm$ DP       |                                |                                |                               |
|---------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
|                     | 1 day                         | 30 days                        | 60 days                        | 90 days                       |
| Emulsogen TS200     | 2.45 $\pm$ 0.02 <sup>Bc</sup> | 1.49 $\pm$ 0.03 <sup>Ab</sup>  | 1.23 $\pm$ 0.03 <sup>Aa</sup>  | 1.25 $\pm$ 0.03 <sup>Aa</sup> |
| Dispersol BB4       | 9.26 $\pm$ 0.06 <sup>Gc</sup> | 9.12 $\pm$ 0.06 <sup>Ec</sup>  | 7.91 $\pm$ 0.52 <sup>Eb</sup>  | 7.46 $\pm$ 0.02 <sup>Da</sup> |
| Morwet IP           | 5.32 $\pm$ 0.02 <sup>Dc</sup> | 5.34 $\pm$ 0.035 <sup>Cc</sup> | 3.35 $\pm$ 0.12 <sup>Cb</sup>  | 2.35 $\pm$ 0.03 <sup>Ba</sup> |
| Surfom D            | 8.57 $\pm$ 0.05 <sup>Fa</sup> | 12.92 $\pm$ 0.28 <sup>Fd</sup> | 10.33 $\pm$ 0.02 <sup>Fc</sup> | 9.47 $\pm$ 0.03 <sup>Eb</sup> |
| Dispersogen BSI     | 1.39 $\pm$ 0.03 <sup>Ab</sup> | 4.28 $\pm$ 0.05 <sup>Bc</sup>  | 1.31 $\pm$ 0.06 <sup>Ab</sup>  | 1.11 $\pm$ 0.04 <sup>Aa</sup> |
| Morwet 3020         | 4.32 $\pm$ 0.03 <sup>Cc</sup> | 6.40 $\pm$ 0.01 <sup>Dd</sup>  | 2.91 $\pm$ 0.32 <sup>Bb</sup>  | 2.16 $\pm$ 0.04 <sup>Ba</sup> |
| Formulation Control | 6.21 $\pm$ 0.15 <sup>Eb</sup> | 4.27 $\pm$ 0.04 <sup>Ba</sup>  | 4.40 $\pm$ 0.04 <sup>Da</sup>  | 4.47 $\pm$ 0.03 <sup>Ca</sup> |

Means followed by the same uppercase letters in a column and lowercase letters in a row do not differ at  $p < 0.05$  by the Scott–Knott test.

**Table 6** presents the surface tension of fungal powder formulations containing 5% surfactant. The surface tension of the water used to prepare suspensions was 72 mN/m.

**Table 6:** Surface tension (mN/m) of *Beauveria bassiana* formulations containing 5% surfactant after formulated e 1 month of stored.

| Surfactant          | Surface tension (mN/m)      |                             |
|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|                     | 1 day                       | 30 days                     |
| Emulsogen TS200     | 38 $\pm$ 0.33 <sup>Aa</sup> | 38 $\pm$ 1.01 <sup>Aa</sup> |
| Dispersol BB4       | 56 $\pm$ 2.46 <sup>Ca</sup> | 56 $\pm$ 1.97 <sup>Da</sup> |
| Morwet IP           | 50 $\pm$ 0.97 <sup>Ca</sup> | 49 $\pm$ 2.96 <sup>Ca</sup> |
| Surfom D            | 53 $\pm$ 1.72 <sup>Ca</sup> | 53 $\pm$ 2.00 <sup>Da</sup> |
| Dispersogen BSI     | 48 $\pm$ 0.87 <sup>Ca</sup> | 48 $\pm$ 1.99 <sup>Ca</sup> |
| Morwet 3020         | 44 $\pm$ 0.83 <sup>Ba</sup> | 43 $\pm$ 1.17 <sup>Ba</sup> |
| Formulation Control | 53 $\pm$ 3.38 <sup>Ca</sup> | 50 $\pm$ 2.11 <sup>Ca</sup> |

Means followed by the same uppercase letters in a column and lowercase letters in a row do not differ at  $p < 0.05$  by the Scott–Knott test.

Surface tension did not vary with time. Dispersol BB4 (56 mN/m), Morwet IP (49.5 mN/m), and Surfom D (53 mN/m) did not reduce the surface tension of formulations compared with the control. Surface tensions were lowest in formulations containing Emulsogen TS 200 (38 mN/m) and Morwet 3020 (43.3 mN/m).

Surface tension results were in accordance with the results of the wetting test. Emulsogen TS 200 afforded the shortest wetting time and lowest surface tension. According to the manufacturer, the critical micelle concentration (CMC) of Emulsogen TS 200 is  $0.034 \pm 2.1$  g/L. The formulation contained 0.3 g/L surfactant, almost 10 times higher than the CMC. Under these conditions, the concentration of micelles increases. Therefore, it is likely that fungi were stabilized inside the micelles, leading to reduced wetting time and surface tension (Daltin, 2011).

Dispersol BB4, Morwet IP, and Surfom D, which were not able to decrease surface tension, resulted in the longest wetting times. The three surfactants are based on naphthalene sulfonate but have different properties. The CMCs of Morwet IP (7.7 g/L) and Morwet 3020 (1.5 g/L) are much higher than that of Emulsogen TS 200. Their concentration in formulations was not sufficient to achieve micelle formation; therefore, the surfactant remained at the water/air interface.

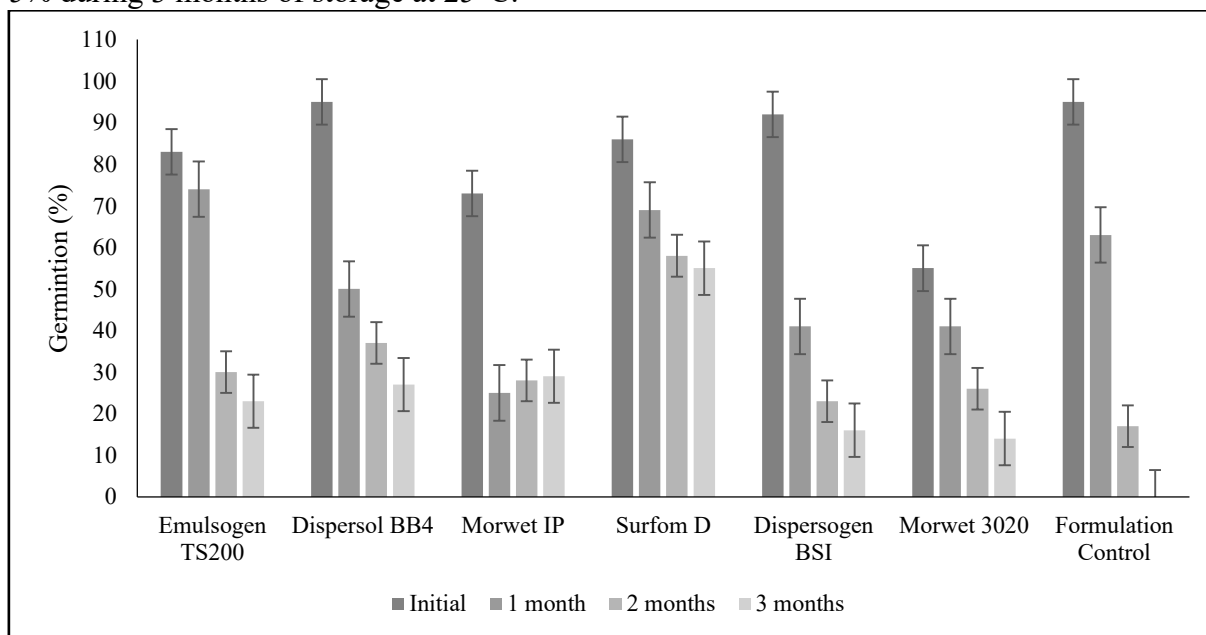
Unlike other surfactants, Surfom D does not form micelles; rather, it has a dispersing effect (Oxiten, 2018). Thus, the surface tension does not vary with surfactant concentration. This is probably due to the large size of Surfom D molecules and explains why the surface tension was the same as that of the control. A wetting agent assists in the incorporation of wettable powders into the aqueous phase during dilution by reducing the surface tension at the solid/liquid interface. As a result, the powder becomes wet and can mix with water more easily. After the powder is diluted in water and ready for spraying, a dispersant is required to maintain the particles in suspension and prevent them from agglomerating (Croda, 2018).

The results show that micelle-forming surfactants are ideal for suspensions containing hydrophobic active agents, such as *B. bassiana*. The fungus remains entrapped in the micelles because of its hydrophobicity, and the powder can be easily mixed with water.

**Fig.4** shows the germination rates of *B. bassiana* formulations. Conidial germination in the control decreased from 91 to 63 and 29% after 1 and 2 months of storage, respectively. Germination was not observed in month 3. Similar results were found by Alves et al. (1996): *B. bassiana* conidia survived for only 60 days at room temperature (15–38 °C) and wettable powder formulations began to lose viability after 60–150 days. Kruger et al. (2014) assessed the viability of *B. bassiana* wettable powders and found that spore germination was reduced to

20 and 5% after 50 and 100 days of storage at 20 °C, respectively. In a study by Silva and Neves (2016), a mixture of *B. bassiana* conidia and dry parboiled rice was stored in different packages for 60 days at 25 °C. Germination decreased by 79, 71, and 33% in Coex, metalized polyester, and polyethylene packages, respectively.

**Fig.4.** Conidial germination rate of *B. bassiana* formulations containing different surfactants at 5% during 3 months of storage at 25°C.



As the germination rate decreased with time in the control formulation, an overall reduction in germination rate was expected for all formulations. However, germination rate in the presence of Surfom D was highest in the end of 3 months. Accordingly, the formulation containing Surfom D had the highest microbial viability after 3 months of storage, 28% (**Table 6**). These results suggest that the surfactant protected conidia. Surfom D may be used to extend the shelf life of fungal wettable powders. However, although Surfom D increased conidial germination, it increased wetting time in comparison to the control (10.32 vs. 4.84 min).



**Table 6:** Fungal count (CFU/g) of *B. bassiana* formulations containing different surfactants a 5% during 3 months of storage at 25°C.

| Surfactant          | Colony-forming units (CFU/g) ( $\times 10^9$ ) |                                |                                |                               |
|---------------------|------------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
|                     | 1 day                                          | 30 days                        | 60 days                        | 90 days                       |
| Emulsogen TS200     | $2.49 \pm 0.51$ <sup>Bb</sup>                  | $1.83 \pm 0.11$ <sup>Bb</sup>  | $0.403 \pm 0.05$ <sup>Aa</sup> | $0.25 \pm 0.06$ <sup>Aa</sup> |
| Dispersol BB4       | $7.33 \pm 1.7$ <sup>Ec</sup>                   | $1.69 \pm 0.27$ <sup>Bb</sup>  | $1.87 \pm 0.63$ <sup>Bb</sup>  | $0.16 \pm 0.02$ <sup>Aa</sup> |
| Morwet IP           | $0.623 \pm 0.24$ <sup>Aa</sup>                 | $0.883 \pm 0.27$ <sup>Aa</sup> | $0.400 \pm 0.22$ <sup>Aa</sup> | $0.05 \pm 0.01$ <sup>Aa</sup> |
| Surfom D            | $3.99 \pm 0.36$ <sup>Cc</sup>                  | $2.29 \pm 0.44$ <sup>Bb</sup>  | $5.13E \pm 0.23$ <sup>Cd</sup> | $1.14 \pm 0.10$ <sup>Ba</sup> |
| Dispersogen BSI     | $5.80 \pm 0.27$ <sup>Dc</sup>                  | $2.79 \pm 0.28$ <sup>Bb</sup>  | $1.44 \pm 0.33$ <sup>Bd</sup>  | $0.05 \pm 0.01$ <sup>Aa</sup> |
| Morwet 3020         | $2.47 \pm 0.12$ <sup>Bb</sup>                  | $2.22 \pm 1.10$ <sup>Bb</sup>  | $0.373 \pm 0.07$ <sup>Aa</sup> | $0.14 \pm 0.03$ <sup>Aa</sup> |
| Formulation Control | $2.10 \pm 0.25$ <sup>Bc</sup>                  | $1.87 \pm 0.15$ <sup>Bc</sup>  | $1.17 \pm 0.58$ <sup>Bb</sup>  | $0.01 \pm 0.01$ <sup>Aa</sup> |

Means followed by the same uppercase letters in a column and lowercase letters in a row do not differ at  $p < 0.05$  by the Scott–Knott test.

The formulation containing Morwet IP had the lowest initial fungal count and one of the lowest counts after 3 months of storage (8% viability). Viable fungal count did not vary significantly over time, but the viability loss was substantial. These results, added to the results of the germination test, show that Morwet IP is incompatible with *B. bassiana*. Formulations containing Dispersol BB4 and Dispersogen BSI and the control showed good viability after 2 months of storage, 25, 25, and 55%, respectively. The viability of formulations containing Morwet 3020 and Emulsogen TS 200 was 15 and 16%, respectively. Although the formulation containing Emulsogen TS 200 had low surface tension and a short wetting time, it was stable for 1 month of storage only, limiting its commercial use. After 2 months, germination and fungal count were reduced by 50%.

Viability assays are crucial for determining compatibility between chemical products and fungal agents. The efficiency of the wettable powder depends on a fast germination capacity and an effective fungal penetration in the host. Rapid sporulation contributes to the spread of epizootic diseases (Feijó, 2007). Colony radial growth is an important parameter to assess virulence, as it is directly associated with host infection rate. Chemical compounds may delay germination but should not affect microbial viability (Zorzetti et al., 2014). In formulations, the surfactant is in direct and constant contact with the microorganism, but the fungus is in a dormant state (Horaczek and Viernstein, 2004). Therefore, it is necessary to assess the BI, colony growth, germination rate, and viable count of formulations for determining compatibility.

The toxicity of surfactants to *B. bassiana*, estimated by their BI values, is presented in **Table 7**.

BI indicates how surfactants affect growth, sporulation, and germination when in direct contact

with vegetative cells. Results may differ from those obtained when dormant cells are exposed to surfactants, as measured by the other viability assays.

**Table 7:** Effect of surfactants at 5% concentration on *Beauveria bassiana* colony diameter, sporulation rate, germination rate, and biological index (BI).

| Surfactant      | Colony diameter (cm) | Sporulation ( $\times 10^8/\text{mL}$ ) | Germination (%) | Biological index | Classification * |
|-----------------|----------------------|-----------------------------------------|-----------------|------------------|------------------|
| Emulsogen TS200 | $4.6 \pm 0.67$       | $1.6 \pm 0.4$                           | $85 \pm 2.64$   | 82               | C                |
| Dispersol BB4   | $2.90 \pm 0.21$      | $1.73 \pm 0.208$                        | $96 \pm 1.00$   | 67               | C                |
| Morwet IP       | 0                    | 0                                       | 0               | 0                | T                |
| Surfom D        | $4.43 \pm 0.15$      | $0.84 \pm 0.29$                         | $85 \pm 1.00$   | 68               | C                |
| Dispersogen BSI | $2.27 \pm 0.67$      | $2.33 \pm 0.15$                         | $76 \pm 2.65$   | 66               | C                |
| Morwet 3020     | 0                    | 0                                       | 0               | 0                | T                |
| Control         | $4.47 \pm 0.5$       | $4.23 \pm 0.93$                         | $84 \pm 3.63$   | -                | -                |

\* BI < 42, toxic;  $42 \leq \text{BI} \leq 66$ , moderately toxic; BI > 66, compatible (Araujo, 2009; Pinto et al., 2012; Monteiro et al., 2014).

Morwet IP and Morwet 3020 completely inhibited *B. bassiana* growth, sporulation, and germination; that is, these surfactants were fungicidal. Emulsogen TS 200, Dispersol BB4, Surfom D, and Dispersogen BSI were compatible with *B. bassiana*. Tanzini et al. (2001), using the BI method, found that 2% Surfom D is moderately toxic to *B. bassiana* and toxic to *M. anisopliae*.

### 3.4 Conclusion

This study showed that surfactant concentration and type influence the viability of *B. bassiana* powder formulations. Twenty-five surfactants were tested over 30 days of storage. Six surfactants produced good results and were selected for further analyses. A second experiment was carried out to evaluate the compatibility of the six surfactants with *B. bassiana* over 3 months of storage. Surfom D and Emulsogen TS 200 afforded the best results. The formulation containing 5% Surfom D showed a high germination rate and fungal count at the end of the storage period but had high surface tension and long wetting time. Emulsogen TS 200, on the other hand, led to a reduction in surface tension and wetting time but also reduced conidial viability to zero after 2 months of storage. The biological index showed that 5% Surfom D and Emulsogen TS 200 are compatible with *B. bassiana*. Future studies should investigate the use of surfactant combinations in *B. bassiana* powder formulations to increase both wettability and shelf life. Storage conditions (moisture, temperature, and packaging) may also be evaluated to assess their effects on formulation viability.

## Acknowledgements

We thank the Minas Gerais Research Foundation (FAPEMIG), the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), and the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES) for their financial support.

**Declarations of interest:** none.

## References

- Alves, R. T.; Bateman R. P.; Gunn J.Ç; Prior C. and Leather S.R., 2002. Effects of different formulations on viability and medium-term storage of *Metarhizium anisopliae* conidia. **Neotropical Entomology**, [s.l.], v. 31, n. 1, p.91-99. Springer Nature. [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1519-566X2002000100013](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-566X2002000100013). Access on 21 jul. 2019. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2002000100013>
- Alves, S. B.; Pereira R.M.; Stimac J.L. and Vieira, S.A., 1996. Delayed Germination of *Beauveria bassiana* Conidia after Prolonged Storage at Low, Above - freezing Temperatures. **Biocontrol Science and Technology**, v. 6, p. 575–581. <https://doi.org/10.1080/09583159631217>
- Araujo J.J.M.; Marques, E.J. and Oliveira, J. V., 2009. Potencial de isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* e do óleo de Nim no control do pulgão *Lipaphys erysimi* (Kalt.) (Hemiptera: Aphididae). **Neotropical Entomology**, [S.I.], v. 38, n. 4, p.520-525. Springer Nature. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2009000400014>
- Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 13242**: Determinação de molhabilidade. Rio de Janeiro, 2005.
- Brar, S.K.; Verma, M.; Tyagi, R.D. and Valéro, J.R., 2006. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. **Process Biochemistry**, [S.I.], v. 41, n. 2, p.323-342. Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.07.015>
- Brasil. Tribunal de justiça do Rio Grande do Sul. **Agravo de Instrumento: AI 70051607760**, 2012. <https://tj-rs.jusbrasil.com.br/jurisprudencia/22566761/agravo-de-instrumento-ai-70051607760-rs-tjrs/inteiro-teor-110869269#>. Access on 15 dez. 2018.
- Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Tipos de formulations para registro de products fitossanitários**. 2016. [http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/agroquimicos-fiscalizacao/publicacoes-agroquimicos/copia\\_de\\_7108f8c23f739060e040a8c075020f36.xls/view](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/agroquimicos-fiscalizacao/publicacoes-agroquimicos/copia_de_7108f8c23f739060e040a8c075020f36.xls/view). Access on 7 abr. 2018.

Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**, AGROFIT. 2020. [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Access on 19 fev. 2020.

Croda, 2018. Products e Aplicações. <https://www.crodacropcare.com/pt-br/products-and-applications> (Access on dez. 2018).

Oxiten, 2018. Agroquímicos. <http://www.oxiten.com.br/agroquimicos/#produtos-solucoes> (Access on 05 dez. 2018).

Daltin, D, 2011. **Surfactants**: química, propriedades e aplicações. São Paulo: Blucher, 59 p.

Dunlap, C. A.; Behle, R. W. J. and Mark A, 2014. Compatibility of OMRI-certified surfactants with three entomopathogenic fungi. **Biocontrol Science and Technology**, [s.l.], v. 24, n. 4, p.436-447. Informa UK Limited. <https://doi.org/10.1080/09583157.2013.870532>

Embrapa, 2013. **Evaluation da qualidade de products a base de *Trichoderma***. Jáguaariúna: Embrapa, 51 p.

Faria, M. R. and Wraight, S. P. 2007. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, [S.I.], v. 43, n. 3, p.237-256. Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.08.001>

Feijó, F.; Lima, P.M. ; Alves, N.D.and Lima, E.A.L.A., 2007. Comportamento e aspectos citológicos de *Beauveria bassiana* after passagem em ovo, larva e adulto de *Chrysomya albiceps*. n. January, 2017. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.74, n.4, p. 349-355. [https://www.researchgate.net/publication/265872603\\_comportamento\\_e\\_aspectos\\_citologicos\\_de\\_beauveria\\_bassiana\\_apos\\_passagem\\_em\\_ovo\\_larva\\_e\\_adulto\\_de\\_chrysomya\\_albiceps](https://www.researchgate.net/publication/265872603_comportamento_e_aspectos_citologicos_de_beauveria_bassiana_apos_passagem_em_ovo_larva_e_adulto_de_chrysomya_albiceps). Access on 15 may 2019

Gallo D.; Nakano, O.; Silveira Neto, S.; Carvalho, R. P. L.; Batista, G. C.; Berti Filho, E.; Parra, J. R. P.; Zucchi, R. A. and Alves, S. B., 2002. Entomologia Agrícola. 1 ed. Piracicaba: FEALQ, 920p.

Horaczek, A. and Viernstein, H., 2004. Comparison of three commonly used drying technologies with respect to activity and longevity of aerial conidia of *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. **Biological Control**, [s.l.], v. 31, n. 1, p.65-71. Elsevier BV. <https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.elsevier-58e3b303-b581-3e9b-a2c7-0dc91f718272>. Access on 28 nov. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2004.04.016>

Jin, X.; Streett D.A.; Dunlap, C.A. and Lyn M.E , 2008. Application of hydrophilic–lipophilic balance (EHL) number to optimize a compatible non-ionic surfactant for dried aerial conidday of *Beauveria bassiana*. **Biological Control**, [s.l.], v. 46, n. 2, p.226-233. Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.03.008>

Kruger, R. D.;Posadas J.B.; Lewylle M.A.; Mini J.I. and Lecuona R.E., 2014. Solid Substrate Production and Formulation of an Isolate of *Metarhizium anisopliae* for Biological Control of

Stem Bug *Tibraca limbativentris*. **World Applied Sciences Journal**. S.l., p. 1242-1251. [https://www.idosi.org/wasj/wasj32\(7\)14/8.pdf](https://www.idosi.org/wasj/wasj32(7)14/8.pdf). Access on 12 dez 2019.

Martins, C. C., Alves, L. F. A., and Mamprim, A. P., 2016. **Effect of plant extracts and a disinfectant on biological parameters and pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Ascomycota: Cordycipitaceae)**. *Brazilian Journal of Biology*, 76(2), 420-427. Epub May 03, 2016. <https://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.17914>.

Monteiro, A.C.; Mochi D.A.; Corrêa M.A.; Pietro R.C.L.R. and Barbosa J.C., 2015. **Composições contendo o isolado JAB 68 do fungus entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* e uso das composições**. BR nº BR 102014004519-8 A2, 26 fev. 2014.

Monteiro, G. **Uso do controle biológico de pragas dispara no Brasil**. 2017. <https://exame.abril.com.br/ciencia/uso-do-controle-biologico-dispara-no-brasil>. Access on 24 may. 2018.

Pinto, A. P. F.; Filho A.B.; Almeida J.E.M.A. and Wenzel I.M., 2012. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* ao psilídeo DaypHorina citri e compatibilidade do fungus com products fitossanitários. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [S.I.], v. 47, n. 12, p.1673-1680. Fap UNIFESP (SciELO). <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2012001200001>

Santos, P. S.; Silva M.A.Q.; Monteiro A.C. and Gava C.A.T., 2012. Selection of surfactant compounds to enhance the dispersion of *Beauveria bassiana*. **Biocontrol Science and Technology**, [s.l.], v. 22, n. 3, p.281-292. Informa UK Limited. <https://doi.org/10.1080/09583157.2012.655708>

Silva, R. Z. and Neves, P. M. O., 2016. Estabilidade de conidia de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. acondicionados em different embalagens. **Arquivos do Instituto Biológico**, [s.l.], v. 83, p.1-7. FapUNIFESP (SciELO). <https://doi.org/10.1590/1808-1657000362014>

Singh, T.; Saikia R.; Jana T. and Arora D.K., 2004 Hydrophobicity and surface electrostatic charge of conidia of the mycoparasite *Coniothyrium minitans*. *Mycological Progress*. v. 3, p219- 228.. <https://doi.org/10.1007/s11557-006-0092-x>

Tanzini, M. R.; Alves S.B.; Setten A. and Augusto N.T, 2001. Compatibilidad de agentes tensoactivos con *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. **Manejo Integrado de Pragas**, [s.l.], v. 59, p.15-18. <http://www.sidalc.net/repdoc/A1741E/A1741E.PDF>. Access on 25 nov. 2019.

Tropea, C., Yarin A., Foss, J.F., 2007., Springer Handbook of Experimental Fluid Mechanics, **Springer-Verlag**, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-30299-5>

Zorzetti, J.; Santoro P.H.; Constanski K.C. and Neves P.M.O.J., 2014. Sensibilidade de conidia de *Beauveria bassiana* a fatores abióticos after sucessivos cultivos in vitro. **Semina: Ciências Agrárias**, [s.l.], v. 35, n. 4, p.1773-1783. Universidade Estadual de Londrina. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2014v35n4p1773>

## 4 COMBINAÇÕES DO USO DE TENSOATIVOS NO PROCESSO DE DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO WP DE *B. bassiana*

### 4.1 Introdução

*Beauveria* spp. é um fungo entomopatogênico amplamente utilizado no controle biológico dos insetos (FARIA & WRIGHT, 2007). O desenvolvimento de produtos contendo *Beauveria* spp representa um grande desafio para a indústria, uma vez que é um fungo hidrofóbico devido à presença de proteínas ricas em cisteína na parede celular chamadas hidrofobinas. Além disso, a superfície do inseto é feita de quitina e é repelente à água (Gallo et al., 2002). Assim, o uso de surfactantes se torna interessante, pois fará com que os conídios se espalhem quando o produto for diluído em água e ao entrar em contato com o inseto, possivelmente aumentando a eficiência de controle da praga alvo.

Entretanto, a viabilidade das formulações a base de microrganismos pode ser afetada pelos tensoativos. Desse modo, é importante o estudo tanto da composição como concentrações dos ingredientes que compõe um produto a fim de encontrar o equilíbrio entre esses para estender a viabilidade e qualidade dos produtos biológicos. Uma opção para auxiliar no desenvolvimento da formulação mais compatível com o microrganismo é o uso do planejamento estatístico, a aplicação da metodologia de delineamento composto central. Em estudos que possuem duas ou mais variáveis que podem influenciar no processo é importante o uso dessa ferramenta, uma vez que permite o estudo do grau de influência destas e de suas interações no sistema. Permite também reduzir o número de experimentos em determinado estudo, dessa forma diminuindo tempo e recursos financeiros necessários para uma investigação experimental.

Os tensoativos Emulsogen TS200 e Surfom D foram selecionados para o estudo de sua combinação no desenvolvimento de uma formulação pó molhável. Em estudo prévio (Capítulo 3), verificou-se que o Surfom D (sulfonato de condensado de naftaleno de sódio) tem baixa propriedade umectação (OXITENO, 2018), mas forneceu uma proteção ao fungo (*B. bassiana*). Por outro lado, o Emulsogen TS200 (Tristirilfenol polietilenoglicol éter) apresentou excelente capacidade umectante ao ser usado na formulação com o mesmo microrganismo.

Desse modo o objetivo deste trabalho foi estudar a influência dos tensoativos Emulsogen TS200 e Surfom D em combinação e a suas concentrações sobre a viabilidade e efeito umectante de uma formulação contendo conídios de *B. bassiana*, em pó solúvel em água,

por meio de um delineamento composto central rotacional (DCCR) visando a determinação das concentrações ótimas.

## **4.2 Material e Métodos**

### **4.2.1 Produção de *Beauveria bassiana***

O isolado do fungo *B. bassiana* (GF429) foi preservado em discos de papel e armazenados em frascos de vidro a -80°C. Para a produção, discos de papel da cultura preservada foram colocados em Placas de petri de 9,0 × 1,5 mm contendo meio de cultura potato dextrose ágar (PDA) e incubado a 25°C em BOD por 7 dias para crescimento e esporulação. Posteriormente em câmara de fluxo laminar vertical as placas esporuladas foram lavadas com água estéril contendo o espalhante adesivo (Tween 80® - 0,1mL/L) com auxílio de espátula de metal, previamente flambada. Toda a suspensão foi transferida para erlenmeyer de 1 L contendo 500 mL de meio de cultura JP (extrato de levedura 5%, açúcar 20% e água destilada). Os erlenmeyers foram mantidos em agitação a 200 rpm por 24 horas para desenvolvimento do micélio (inóculo) a ser misturado com arroz estéril.

Primeiramente, para o preparo do arroz, esse ficou imerso durante 15 minutos em água. Após hidratação 200 g do arroz foram colocados em sacos de polipropileno e fechados fazendo duas dobras e colocando três grampos. A esterilização foi feita por 20 minutos a 121°C com 1 Kgf/cm<sup>2</sup>, em seguida todo material foi transferido para a câmara de fluxo laminar para resfriamento antes da inoculação. A inoculação foi realizada adicionando 60 mL do inóculo, com auxílio de uma seringa, nos sacos com o arroz que foram homogeneizados manualmente. Após a inoculação do substrato, os sacos foram levados para a sala de crescimento com temperatura controlada (25°C ± 2°C) por sete dias, tempo necessário para a esporulação. O arroz colonizado foi transferido para bandejas e colocado para secar a 28°C até atingir a umidade de 12%. Em seguida o arroz seco foi peneirado em malha de 80 mesh para separar os conídios de *B. bassiana* do arroz. Os conídios foram mantidos refrigerados até o preparo das formulações.

### **4.2.2 Preparo das formulações**

Foram preparadas 100 g de formulação para cada experimento do Delineamento Composto Central Rotacional DCCR, de composição igual a 20% de conídios do *B. bassiana*, os tensoativos (Surfom D e Emulsogen TS200) e o caulim, que foram misturados em um saco

plástico de polietileno com agitação manual. Paralelamente aos ensaios do DCCR, preparou-se um controle contendo apenas os conídios de *B. bassiana* (GF429).

Para o estudo do efeito das concentrações de dois tensoativos na formulação de agente de controle biológico a base de *B. bassiana*, foi realizado o DDCR, com 3 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios. A concentração e a combinação dos tensoativos investigados nos experimentos através do DCCR estão apresentadas na tabela 8.

Foi avaliado os tensoativos Emulsogen TS200 e Surfom D previamente selecionados e cordialmente fornecidos pela Clariant e Oxiteno, respectivamente. Todos os outros reagentes utilizados eram de grau analítico.

Tabela 8: Delineamento Composto Central Rotacional com os tensoativos Emulsogen TS200 e Surfom D em combinação

| Experimentos | Concentração de Surfom D | Concentração de Emulsogen TS200 |
|--------------|--------------------------|---------------------------------|
| 1            | -1 (1%)                  | -1 (1%)                         |
| 2            | 1 (5%)                   | -1 (1%)                         |
| 3            | -1 (1%)                  | 1 (5%)                          |
| 4            | 1 (5%)                   | 1 (5%)                          |
| 5            | - $\alpha$ (0,18)        | 0 (3%)                          |
| 6            | + $\alpha$ (5,82%)       | 0 (3%)                          |
| 7            | 0 (3%)                   | - $\alpha$ (0,18)               |
| 8            | 0 (3%)                   | + $\alpha$ (5,82%)              |
| 9            | 0 (3%)                   | 0 (3%)                          |
| 10           | 0 (3%)                   | 0 (3%)                          |
| 11           | 0 (3%)                   | 0 (3%)                          |

Após o preparo, as formulações foram armazenadas em embalagens herméticas de polipropileno pretas e mantidas a 25°C para avaliação microbiológica quanto à germinação e Unidades formadoras de colônias (UFC), com objetivo de determinar a proporção de tensoativos capaz de manter por mais tempo uma maior viabilidade. Foi avaliado também o tempo de umectação e a tensão superficial. As avaliações foram realizadas imediatamente após o preparo das formulações e após 1 e 2 meses para germinação, tempo de umectação e tensão superficial. A unidades formadoras de colônias (UFC) foi avaliada após o preparo das formulações e após 1, 2 e 3 meses.

A fim de encontrar as melhores concentrações dos tensoativos Emulsogen TS200 e Surfom D no processo de desenvolvimento de uma formulação WP de *B. bassiana* o processo



foi otimizado pela metodologia de superfície de respostas (MSR) descrita por Box, Hunter & Huter (1978), com base nos dados DCCR.

#### **4.2.3 Tempo de umectação**

O tempo de umectação foi determinado de acordo com a ABNT NBR 13242 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2005). Um béquer foi preenchido com 250 mL com água destilada, deixando um espaço livre de 2 cm da borda do béquer. Posteriormente, pesou-se 1g da amostra teste e adicionou-se ao béquer de uma só vez, acionando-se o cronômetro. O resultado foi expresso no tempo gasto para total umectação da amostra até ausência de grumos na superfície, sendo aceitável a presença de película superficial. A norma não define parâmetros para classificação da formulação a base de fungo quanto ao tempo de umectação. Mas um tempo menor de umectação está associado a qualidade.

#### **4.2.4 Viabilidade**

A determinação da viabilidade através do UFC foi realizada utilizando a metodologia descrita pela Embrapa. Pesou-se 1g do produto base em tubo falcon e completou-se com 9 mL de água (corresponde a diluição -1). Homogeneizou-se o conteúdo em agitador de tubo, colocando e tirando três vezes do aparelho até ser observado o turbilhonamento da superfície da suspensão. Transferiu-se 1mL da suspensão contida no falcon (-1) com auxílio de micropipeta com ponteira esterilizada para outro falcon contendo 9,0 mL de água (-2) e homogeneizou-se. Descartou-se a ponteira em seguida. Procedeu-se repetidamente esse processo de diluição até alcançar a diluição apropriada para contagem dos conídios (EMBRAPA, 2013).

Transferiu-se de cada diluição, com uma micropipeta estéril, 100  $\mu$ L para a superfície de placas de petri com o meio PDA e fez-se o espalhamento sobre a superfície do meio com uma alça de Drigalski esterilizada, imediatamente após a transferência. Incubou-se as placas a 25°C por 4 dias e contou-se o número de colônias crescidas. O ideal é que a placa a ser contada tenha de 30 a 300 colônias. O número de unidades formadora de colônia foi calculado multiplicando o número de colônias encontrado pela diluição da placa escolhida para contagem

vezes 10 (refere-se ao fato de terem sido plaqueados apenas 100  $\mu\text{L}$  da suspensão) (EMBRAPA, 2013).

#### **4.2.5 Germinação**

Uma suspensão na concentração de  $10^6$  conídios/mL foi utilizada para pipetar três amostras de 20  $\mu\text{L}$  que foram depositadas em pontos equidistantes de uma placa de petri contendo meio PDA, sem espalhar a amostra as placas foram incubadas a 25°C. Após 20 horas, foi colocado o corante de azul de lactofenol em cada ponto e avaliou-se a viabilidade usando microscópio óptico no aumento de 400 $\times$ . Contou-se 100 conídios, entre conídios viáveis e não viáveis nos 3 pontos. O conídio é considerado viável quando estiver ativo ou germinado, ou seja, tiver o dobro do tamanho do conídio. O resultado foi expresso em porcentagem correspondendo a razão entre a média do número de conídios viáveis e o total de conídios (EMBRAPA, 2013).

#### **4.2.6 Tensão superficial**

A tensão superficial foi determinada pelo método do anel do Noüy usando um tensiômetro de força (K6, Krüss GmbH, Hamburgo, Alemanha), previamente calibrado com álcool etílico a 99,7% (Tropea, 2007). Os pós (0,3 g) foram suspensos em 50 mL de água destilada para análise.

#### **4.2.7 Índice biológico**

O diâmetro das colônias, a taxa de esporulação e a taxa de germinação foram determinados de acordo com Martins, Alves e Mamprim (2016) em triplicata. Resumidamente, uma suspensão de  $5,25 \times 10^6$  conídios/mL foi semeada em PDA contendo o surfactante e incubada por 15 dias a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . O diâmetro das colônias, a esporulação e a germinação foram determinados e utilizados para o cálculo do índice biológico (IB) dos surfactantes, de acordo com a Eq. (3). A esporulação foi determinada retirando um disco central (4mm) da colônia após os 15 dias para quantificação da produção de conídios em câmara de Neubauer (ARAUJO,

2009; PINTO et al., 2012; MONTEIRO et al., 2014). O tratamento controle consistiu na inoculação do fungo em meio de cultura isento de tensoativo.

$$BI = [47(D) + 43(S) + 10(G)] \div 100 \quad (3)$$

onde D é o diâmetro da colônia, S é a taxa de esporulação e G é a taxa de germinação. Os parâmetros são relativos ao controle.

Os valores de IB foram utilizados como uma medida de toxicidade ou compatibilidade de surfactantes (Alves et al., 2007). Os surfactantes foram classificados em tóxico ( $IB < 42$ ), moderadamente tóxico ( $42 \leq IB \leq 66$ ) e compatível ( $IB > 66$ ) (Araujo, 2009; Pinto et al., 2012; Monteiro et al., 2014).

### 4.3 Resultados e Discussão

Os dados das análises microbiológicas (germinação e viabilidade) para cada experimento do DCCR são apresentados na tabela 9. Como pode ser observado, a avaliação inicial em todos os experimentos, a germinação foi igual ou superior a 77%. Após 60 dias os melhores valores de germinação foram obtidos nos experimentos do ponto central (9, 10 e 11), média de 80%. Enquanto a germinação do controle (conídios) aos 60 dias foi de apenas 51%. Esse resultado indica que a combinação dos dois tensoativos em determinadas concentrações teve efeito positivo na viabilidade do fungo.

Resultados semelhantes foram encontrados por Alves et al. (1996), conídios de *B. bassiana* sobreviveram por apenas 60 dias à temperatura ambiente (15–38 °C) e formulações de pó molháveis começaram a perder viabilidade após 60–150 dias. Kruger et al. (2014) avaliaram a viabilidade de pós molháveis de *B. bassiana* e descobriram que a germinação de esporos foi reduzida para 20 e 5% após 50 e 100 dias de armazenamento a 20°C, respectivamente.

Tabela 9: Resultados da avaliação microbiológicas taxa de germinação e UFC das formulações.

| Exp.             | Surfom D / Emulsogen | Germinação (%) |               |               | UFC ( $\times 10^9$ )* |                 |                 |                |
|------------------|----------------------|----------------|---------------|---------------|------------------------|-----------------|-----------------|----------------|
|                  |                      | 1 dias         | 30 dias       | 60 dias       | 1 dia                  | 30 dias         | 60 dias         | 90 dias        |
| Cont. (Conídios) |                      | 87 $\pm$ 2,1   | 78 $\pm$ 3,7  | 51 $\pm$ 9,8  | 59,7 $\pm$ 8,5         | 43,9 $\pm$ 5,3  | 33,1 $\pm$ 5,4  | 8,3 $\pm$ 0,61 |
| 1                | 1% / 1%              | 77 $\pm$ 6,35  | 70 $\pm$ 4,25 | 63 $\pm$ 9,87 | 18,6 $\pm$ 0,56        | 12,1 $\pm$ 3,1  | 8,75 $\pm$ 0,07 | 14 $\pm$ 0,43  |
| 2                | 5% / 1%              | 77 $\pm$ 4,16  | 80 $\pm$ 4,50 | 55 $\pm$ 6,56 | 12,6 $\pm$ 0,55        | 11,7 $\pm$ 1,84 | 10,5 $\pm$ 0,07 | 8,7 $\pm$ 0,47 |
| 3                | 1% / 5%              | 89 $\pm$ 3,61  | 76 $\pm$ 3,45 | 59 $\pm$ 8,08 | 16,1 $\pm$ 0,33        | 9,8 $\pm$ 1,53  | 10,3 $\pm$ 1,9  | 6,0 $\pm$ 0,55 |
| 4                | 5% / 5%              | 83 $\pm$ 3,06  | 80 $\pm$ 3,73 | 64 $\pm$ 2,00 | 12,1 $\pm$ 0,15        | 10,9 $\pm$ 1,14 | 10,7 $\pm$ 0,50 | 6,0 $\pm$ 0,55 |
| 5                | 0,18% / 3%           | 86 $\pm$ 3,06  | 84 $\pm$ 2,80 | 49 $\pm$ 1,41 | 12,3 $\pm$ 0,14        | 11,7 $\pm$ 2,34 | 9,0 $\pm$ 0,82  | 9,0 $\pm$ 0,60 |
| 6                | 5,82 % / 3%          | 83 $\pm$ 4,24  | 80 $\pm$ 4,00 | 60 $\pm$ 2,32 | 12,0 $\pm$ 0,044       | 11,2 $\pm$ 0,97 | 9,6 $\pm$ 0,89  | 8,7 $\pm$ 0,25 |
| 7                | 3% / 0,18%           | 77 $\pm$ 8,19  | 69 $\pm$ 5,40 | 71 $\pm$ 3,06 | 16,3 $\pm$ 0,25        | 1,03 $\pm$ 1,62 | 9,6 $\pm$ 1,70  | 5,0 $\pm$ 0,95 |

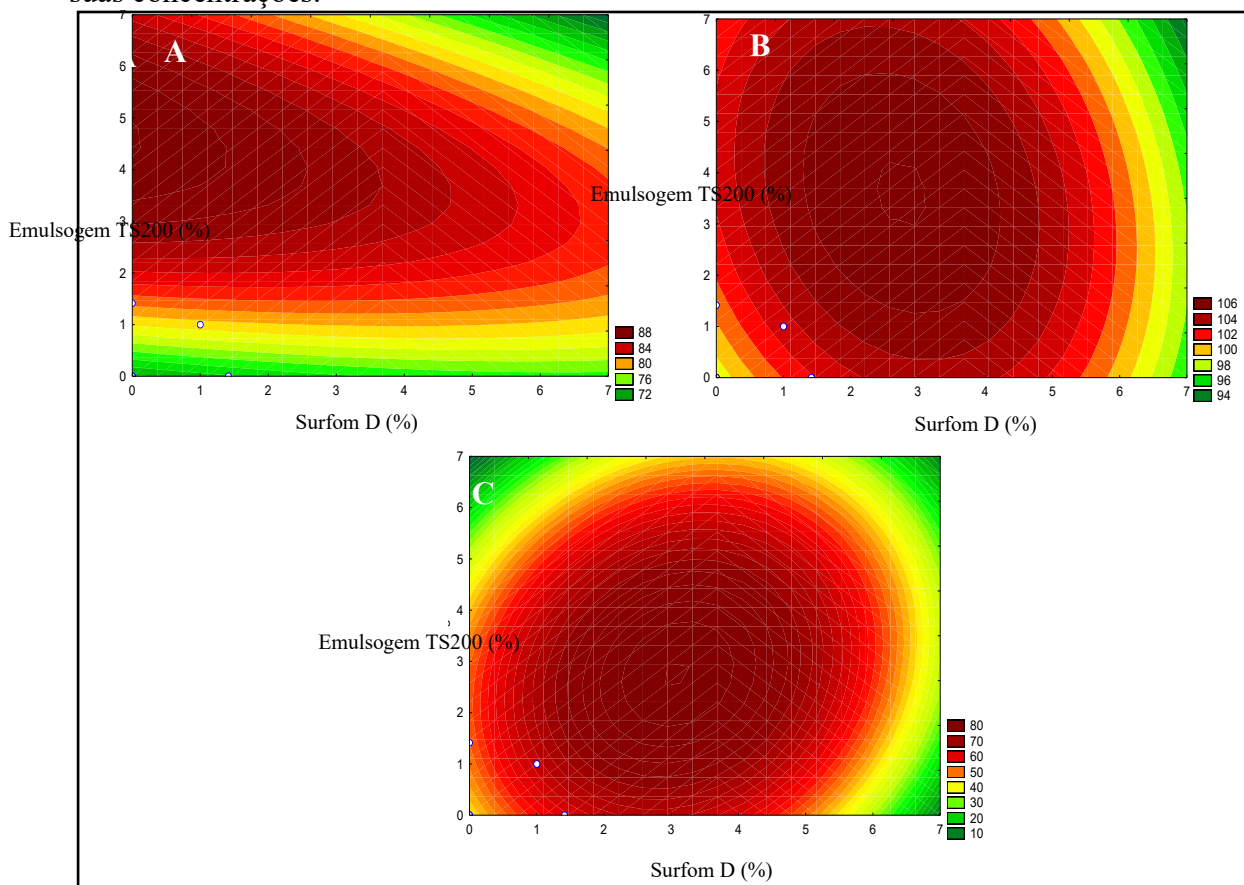
|    |             |           |           |           |             |             |             |            |
|----|-------------|-----------|-----------|-----------|-------------|-------------|-------------|------------|
| 8  | 3% / 5,82 % | 80 ± 5,51 | 75 ± 3,75 | 55 ± 1,15 | 12,8 ± 0,01 | 9,81 ± 1,04 | 7,54 ± 2,40 | 7,9 ± 0,90 |
| 9  | 3% / 3%     | 85 ± 4,93 | 76 ± 6,45 | 78 ± 5,66 | 12,0 ± 0,13 | 10,0 ± 2,37 | 14,3 ± 3,90 | 7,5 ± 0,84 |
| 10 | 3% / 3%     | 85 ± 6,08 | 79 ± 4,75 | 82 ± 5,66 | 16,8 ± 0,23 | 10,8 ± 2,03 | 13,9 ± 1,50 | 7,8 ± 0,76 |
| 11 | 3% / 3%     | 85 ± 7,00 | 81 ± 3,76 | 80 ± 1,41 | 14,1 ± 0,25 | 11,2 ± 2,32 | 19,0 ± 2,00 | 13 ± 0,15  |

\*A concentração inicial das formulações com base em cálculos e de  $10 \times 10^9$ .

Em relação as unidades formadoras de colônias (UFC), os conídios de *B. bassiana* da formulação controle mantiveram 55% da viabilidade após os 60 dias, enquanto em todos os experimentos do DCCR observou-se mais de 50% de viabilidade, com exceção do experimento 1, sendo o menor 59% para o experimento 7 e os maiores (próximos a 100%) obtidos nos experimentos do ponto central 9, 10 e 11.

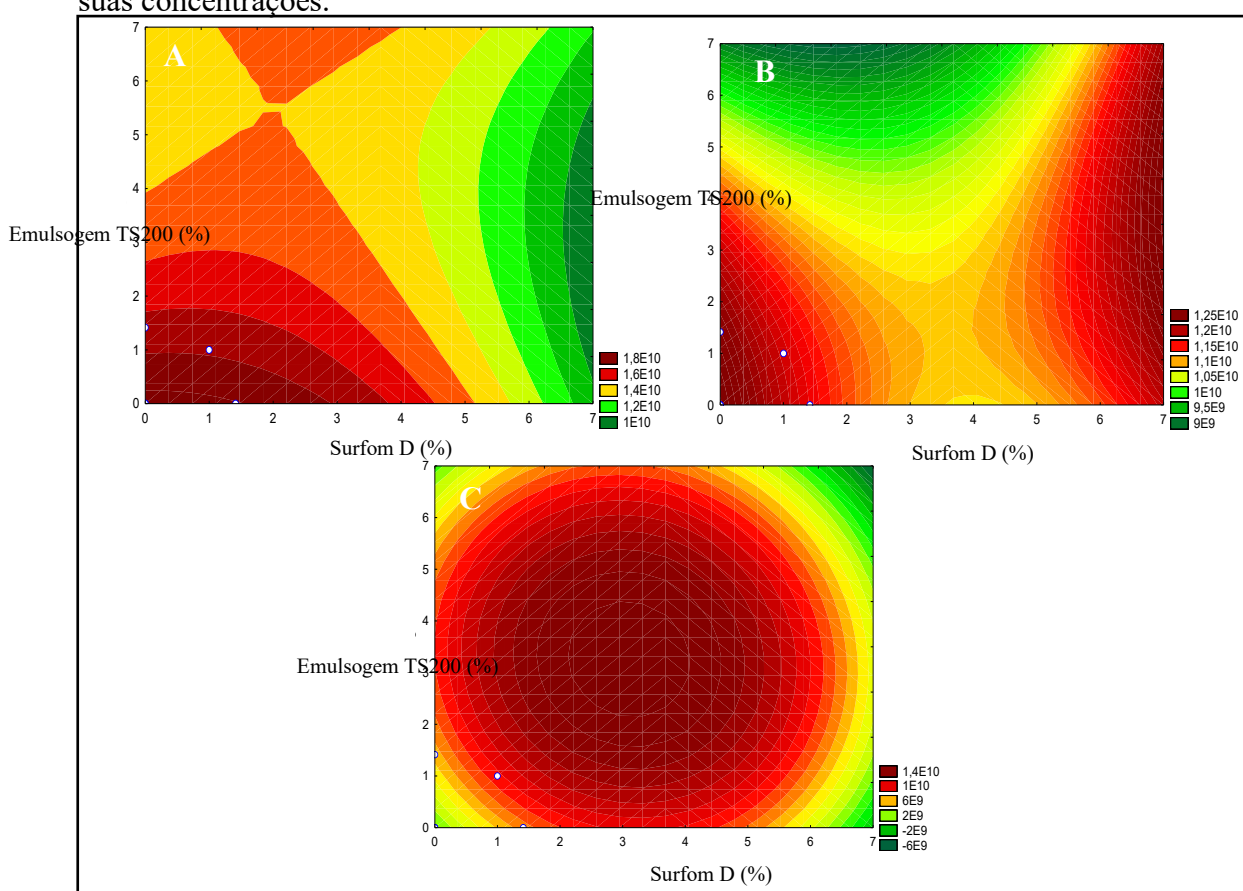
Na Figura 5 está apresentada a superfície de contorno para a germinação das formulações WP de *B. bassiana* em função das concentrações dos tensoativos Emulsogen TS200 e Surfom D em relação ao tempo de preparo. Verifica-se pela superfície de contorno que os melhores valores de germinação, após 30 e 60 dias de preparo das formulações, foram obtidos nas concentrações em torno de 3% para ambos os tensoativos.

Figura 5: Curvas de contorno para a germinação após 1 dia (A), 30 dias (B) e 60 dias (C) das formulações WP de *B. bassiana* em função dos tensoativos Emulsogen TS200 e Surfom D e suas concentrações.



As superfícies de contorno para a variável UFC é mostrada na Figura 6. Um ponto interessante observado na avaliação gráfica é a interação entre tensoativo e tempo de armazenamento, ou seja, há uma alteração da região ótima. Na avaliação inicial a superfície de contorno mostra concentrações próximas a 1% como a mais adequada, enquanto na avaliação com 60 dias, a região ótima se desloca, para próxima a concentração de 3% para ambos os tensoativos.

Figura 6: Curvas de contorno para a variável UFC após 1 dia (A), 30 dias (B) e 60 dias (C) das formulações WP de *B. bassiana* em função dos tensoativos Emulsogen TS200 e Surfom D e suas concentrações.



Na Tabela 10 estão apresentadas as médias das respostas para tempo de umectação e tensão superficial para os experimentos do DCCR. O tempo de umectação dos conídios puros de *B. bassiana* na avaliação inicial (1 dia) e após 30 dias foi de 30 minutos, mas esse tempo foi reduzido para 15 minutos após 60 dias de preparo do controle. Essa redução do tempo de umectação também foi relatada por Singh et al. (2004) que observaram o efeito do aumento da idade da cultura na diminuição da hidrofobicidade, da superfície celular e na carga eletrostática da superfície celular em três isolados do *Coniothyrium minitans*.

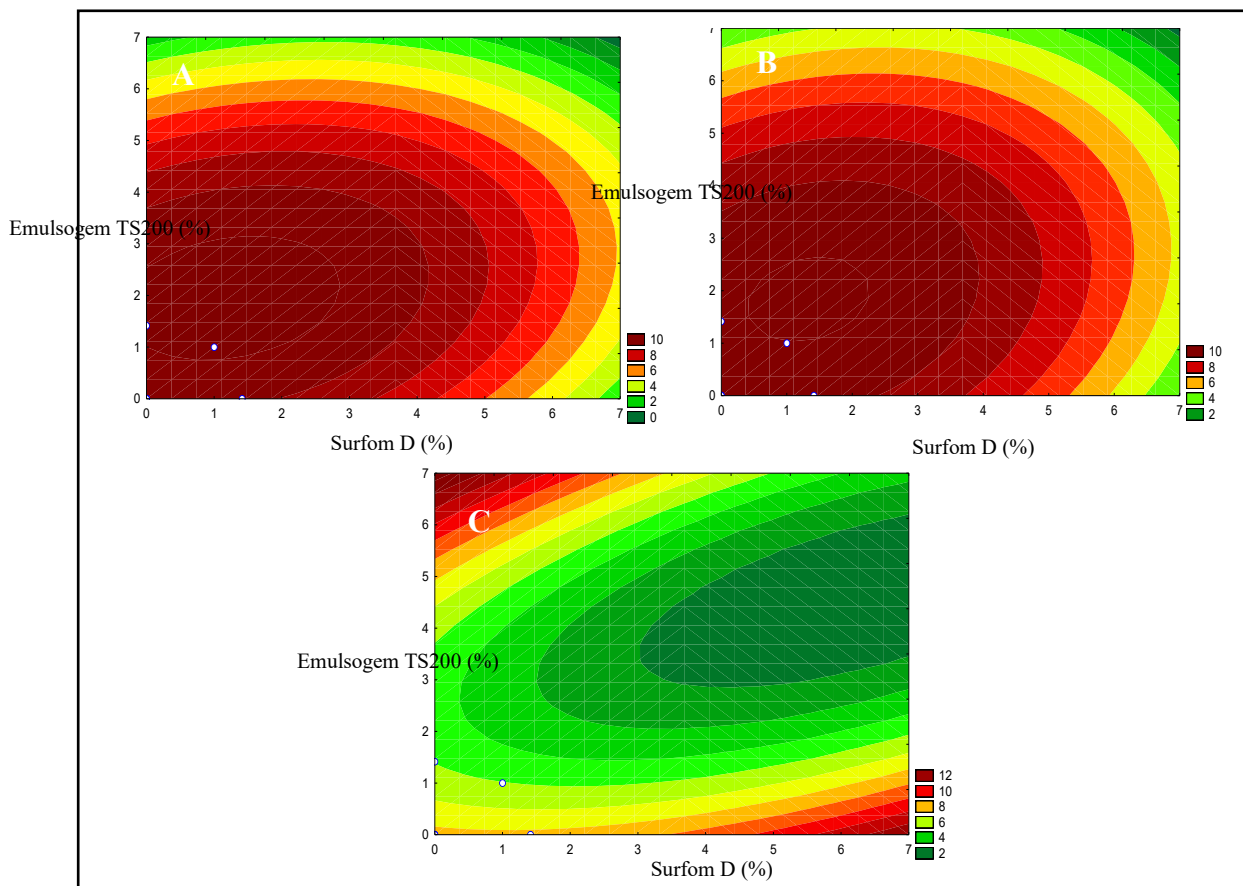
No presente trabalho, a redução da hidrofobicidade da *B. bassiana* só foi observada pelo teste de umectação nos experimentos do DCCR, uma vez que a tensão superficial foi constante na análise inicial e após 60 dias.

Tabela 10: Resultados da avaliação do tempo de umectação e tensão superficial das formulações nos experimentos do DCCR.

| Exp.                    | Surfom / Emulsogem | Tempo de umectação (min) |              |             |             | Tensão superficial (mN/m) |           |
|-------------------------|--------------------|--------------------------|--------------|-------------|-------------|---------------------------|-----------|
|                         |                    | 1 dia                    | 30 dias      | 60 dias     | 90 dias     | 1 dia                     | 60 dias   |
| <b>Cont. (Conídios)</b> |                    | 30,0 ± 0,00              | 30,0 ± 0,00  | 15,0 ± 0,00 | 10 ± 0,00   | 55 ± 1,30                 | 39 ± 1,45 |
| <b>1</b>                | 1% / 1%            | 8,92 ± 0,54              | 8,64 ± 0,33  | 5,34 ± 0,25 | 3,21 ± 0,17 | 47 ± 1,20                 | 47 ± 0,51 |
| <b>2</b>                | 5% / 1%            | 9,34 ± 0,13              | 9,29 ± 0,21  | 9,23 ± 0,32 | 1,43 ± 0,13 | 53 ± 1,65                 | 50 ± 0,58 |
| <b>3</b>                | 1% / 5%            | 3,64 ± 0,32              | 3,46 ± 0,11  | 2,60 ± 0,36 | 5,52 ± 0,98 | 42 ± 0,46                 | 41 ± 0,00 |
| <b>4</b>                | 5% / 5%            | 5,66 ± 0,51              | 5,41 ± 0,35  | 1,65 ± 0,33 | 0,91 ± 0,31 | 43 ± 0,36                 | 41 ± 0,29 |
| <b>5</b>                | 0,18% / 3%         | 8,95 ± 0,67              | 8,85 ± 0,92  | 1,50 ± 0,21 | 1,12 ± 0,17 | 43 ± 0,53                 | 43 ± 2,08 |
| <b>6</b>                | 5,82 % / 3%        | 9,50 ± 0,71              | 9,72 ± 0,25  | 4,42 ± 0,08 | 2,31 ± 0,15 | 47 ± 0,85                 | 44 ± 1,41 |
| <b>7</b>                | 3% / 0,18%         | 11,70 ± 0,44             | 12,03 ± 0,55 | 9,41 ± 0,19 | 5,64 ± 0,39 | 57 ± 2,47                 | 61 ± 0,76 |
| <b>8</b>                | 3% / 5,82 %        | 4,46 ± 0,09              | 5,60 ± 0,08  | 1,87 ± 0,49 | 0,51 ± 0,07 | 43 ± 0,29                 | 42 ± 0,58 |
| <b>9</b>                | 3% / 3%            | 9,52 ± 0,47              | 9,34 ± 0,67  | 2,35 ± 0,31 | 1,44 ± 0,20 | 44 ± 1,32                 | 43 ± 0,58 |
| <b>10</b>               | 3% / 3%            | 9,28 ± 0,83              | 9,62 ± 1,11  | 2,42 ± 0,12 | 1,19 ± 0,04 | 44 ± 1,15                 | 44 ± 0,58 |
| <b>11</b>               | 3% / 3%            | 10,41 ± 0,74             | 9,55 ± 0,60  | 1,61 ± 0,03 | 1,08 ± 0,09 | 44 ± 1,04                 | 45 ± 3,21 |

Assim como os conídios puros sofreram influência do tempo de armazenamento, as formulações também tiveram o tempo de umectação afetado. Isso justifica as superfícies de contorno encontradas na Figura 7. Nas duas avaliações iniciais, o gráfico mostrou a necessidade de concentrações maiores dos tensoativo para diminuir o tempo de umectação, enquanto nas avaliações com 60 dias, a quantidade de tensoativo requerida foi significativamente menor.

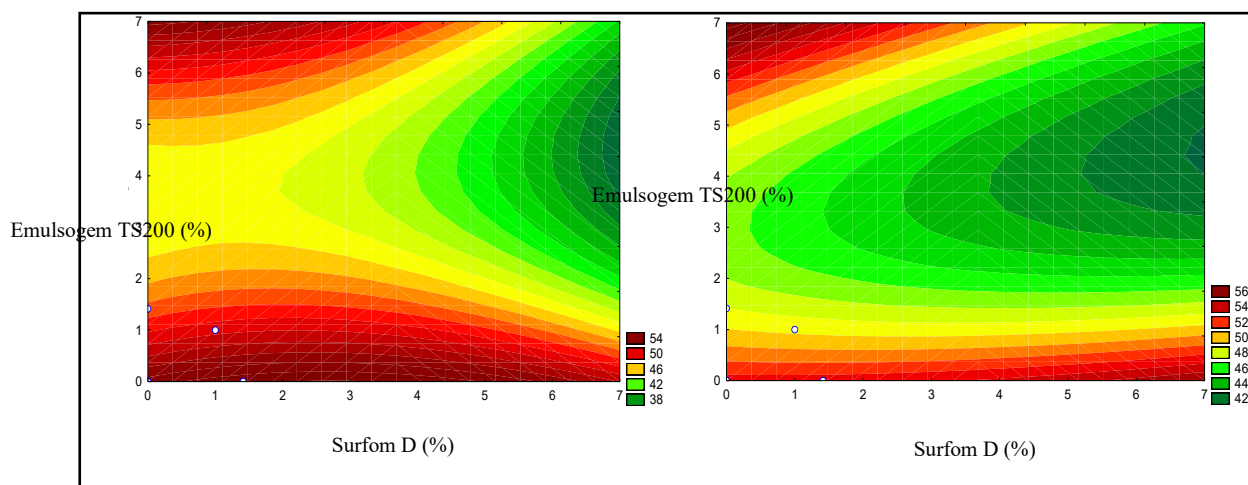
Figura 7: Curvas de contorno para a variável tempo de umectação após 1 dia (A), 30 dias (B) e 60 dias (C) das formulações WP de *B. bassiana* em função da concentração dos tensoativos Emulsogen TS200 (%) e Surfom D (%) e suas concentrações.



As superfícies de contorno obtidas para a tensão superficial (Figura 8) mostraram que foram necessárias maiores concentrações de Surfom D (próximo a 7%) e concentrações baixas de Emulsogen TS200 (4%) para diminuir a tensão superficial da formulação. A maior tensão superficial 57 mN/m foi com a menor concentração de Emulsogen TS200 (0,18%) e o Surfom D a 3%, valor esse muito próximo a tensão superficial dos conídios da formulação controle de *B. bassiana* 55 mN/m. Diferente do tempo de umectação a tensão superficial foi pouco influenciada pelo tempo de armazenamento.

A baixa concentração do Emulsogen TS200 requerida para diminuir a tensão superficial se deve a baixa concentração micelar crítica (CMC -  $0,034 \pm 2,1$  g/L). A formulação continha quase 10 vezes mais que o CMC. Portanto, é provável que os fungos tenham se estabilizado dentro das micelas, levando a um tempo de umidificação e tensão superficial reduzidos (Daltin, 2011).

Figura 8: Curvas de contorno para a variável tensão superficial 1 dia (A) e após 90 dias (B) formulações WP de *B. bassiana* em função dos tensoativos Emulsogen TS200 e Surfom D e suas concentrações.



Com objetivo de encontrar a região do DCCR com uma maior resposta de germinação e UFC e menores tempo de umectação e tensão superficial reuniu-se as curvas de contorno dos resultados dos experimentos do DCCR com ajuda do software *Matlab*. Na Figura 9 está mostrada a interação entre taxa de germinação e UFC/g, e na Figura 10 a interação do tempo de umectação e da tensão superficial.

Figura 9: Curvas de contorno para o percentual de germinação e UFC/g obtidas com o DCCR em função da concentração dos tensoativos.

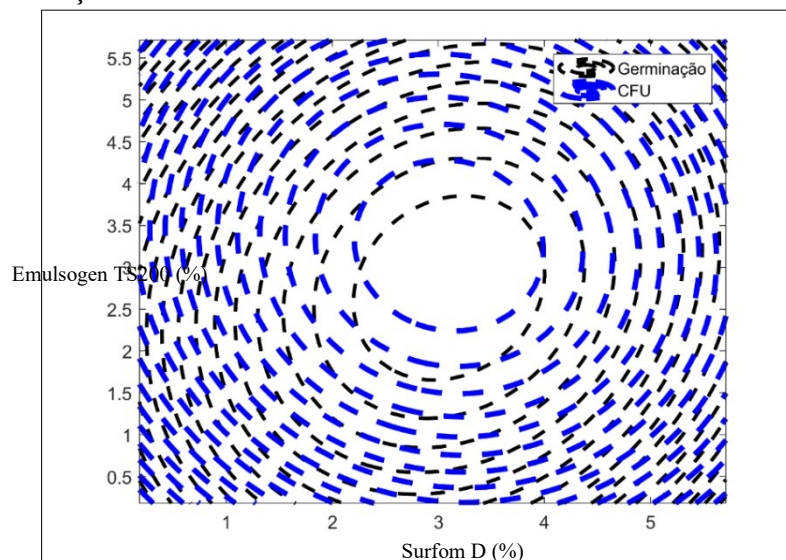
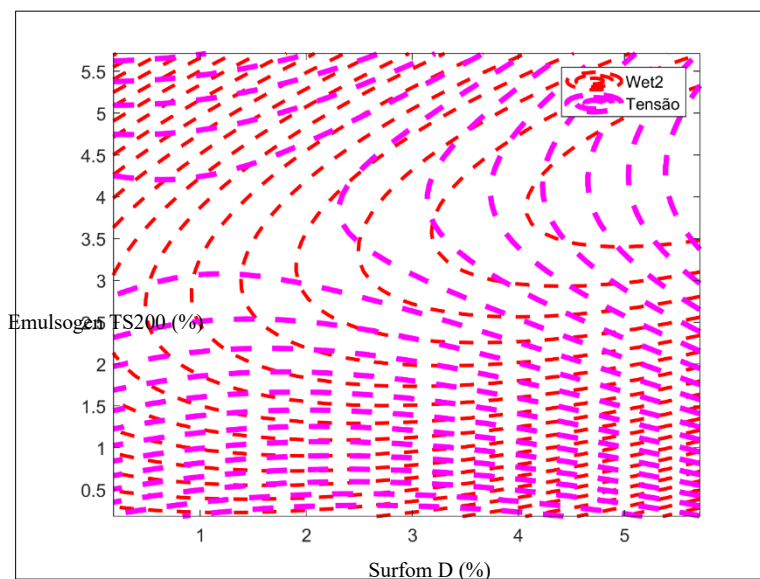




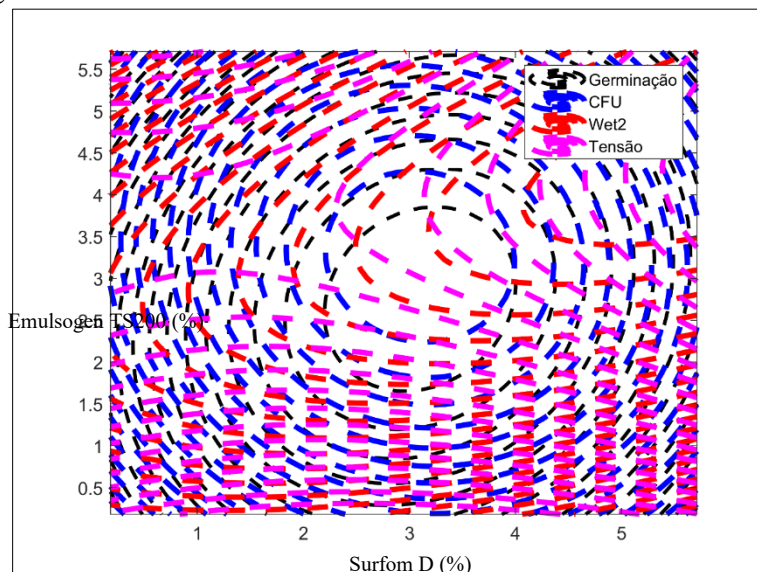
Figura 10: Curvas de contorno para o tempo de umectação e tensão superficial obtidas com o DCCR.



A região ótima quando avaliado as variáveis germinação e UFC foi entre 2,25% e 4% tanto para o Emulsogen TS 200 quanto para o Surfom D. A região ótima para as variáveis tempo de umectação e tensão superficial foi entre 3,5% e 5% para o Emulsogen TS 200 e acima de 5% para o Surfom D. Considerando o fato que o Surfom D não teve um efeito significativo no tempo de umectação e tensão superficial é esperado que a superfície de resposta mostrasse a necessidade de concentrações mais elevadas deste. O Surfom D não forma micelas, assim, a tensão superficial não se altera com a concentração do surfactante (Oxiten, 2018). Provavelmente, isso se deve ao grande tamanho das moléculas de Surfom D e explica por que a tensão superficial foi a mesma que a do controle.

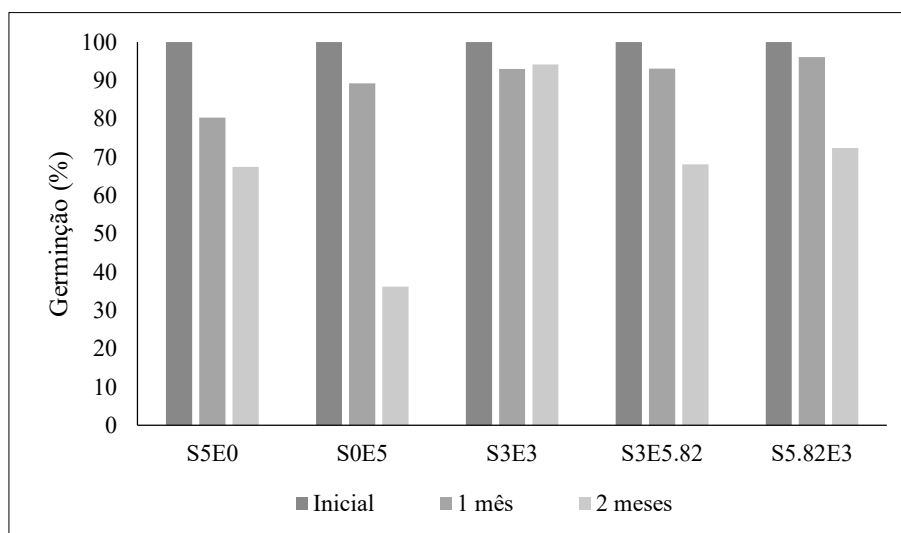
Através das análises da superfície de resposta verificou-se que região ótima para todas as respostas analisadas no DCCR foi entre 2,25% e 5% para os dois tensoativos estudados, apresentado na Figura 11.

Figura 11: Curvas de contorno para o tempo de umectação, tensão superficial, percentual de germinação e UFC/g obtidas com o DCCR.



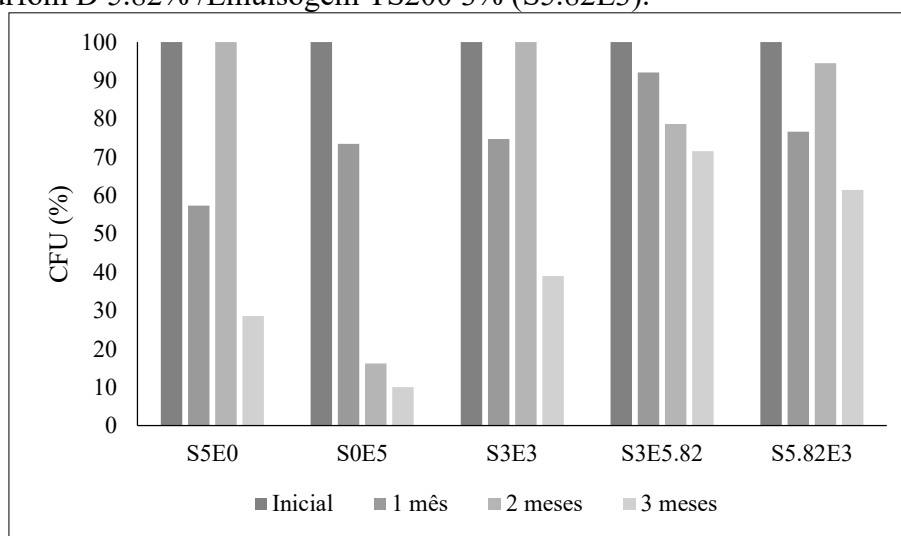
A fim de confirmar que o uso da combinação dos dois tensoativos na formulação WP foi melhor que o uso dos tensoativos isolados na mesma formulação, foi comparado o efeito isolado do tensoativo na concentração de 5% e a associação de tensoativos nas respostas de germinação, UFC, tensão superficial e tempo de umectação para os tempos de formulação imediata e após 1 e 2 meses de armazenamento. Nas Figura 12 e 13 estão mostrados os resultados de germinação e UFC, respectivamente.

Figura 12: Germinação das formulações de *B. bassiana* com Surform D 5% (S5E0), Emulsogem TS200 5% (S0E5) e suas combinações, Surform D 3%/Emulsogem TS200 3% (S3E3), Surform D 3%/Emulsogem TS200 5.82% (S3E5.82) e Surform D 5.82% /Emulsogem TS200 3% (S5.82E3).



Os melhores resultados de germinação durante as avaliações foram para a combinação de 3% de ambos os tensoativos, que resultaram em 94% de germinação após 2 meses. Enquanto o uso do Emulsogem TS200 isolado na concentração máxima (5%), reduziu a germinação para 36% após 2 meses. Já a formulação com o isolado de Surfom a 5% teve 67% de germinação.

Figura 13: Unidade formadora de colônia expresso em porcentagem das formulações de *B. bassiana* com Surfom D 5% (S5E0), Emulsogem TS200 5% (S0E5) e suas combinações, Surfom D 3%/Emulsogem TS200 3% (S3E3), Surfom D 3%/Emulsogem TS200 5.82% (S3E5.82) e Surfom D 5.82% /Emulsogem TS200 3% (S5.82E3).



No parâmetro UFC o uso dos tensoativos isolados na formulação WP também tiveram menor viabilidade que a associação deles. Esses resultados indicam que, tanto a germinação como UFC/g, o D Surfom ajudou a manter a viabilidade do fungo, apesar de não ter um efeito significativo na redução da tensão superficial.

A comparação dos tensoativos sozinhos e combinados para tempo de umectação e tensão superficial são apresentados nas Figuras 14 e 15, respectivamente.

Figura 14: Tempo de umectação expresso em porcentagem das formulações de *B. bassiana* com Surfom D 5% (S5E0), Emulsogem TS200 5% (S0E5) e suas combinações, Surfom D 3%/Emulsogem TS200 3% (S3E3), Surfom D 3%/Emulsogem TS200 5.82% (S3E5.82) e Surfom D 5.82% /Emulsogem TS200 3% (S5.82E3).

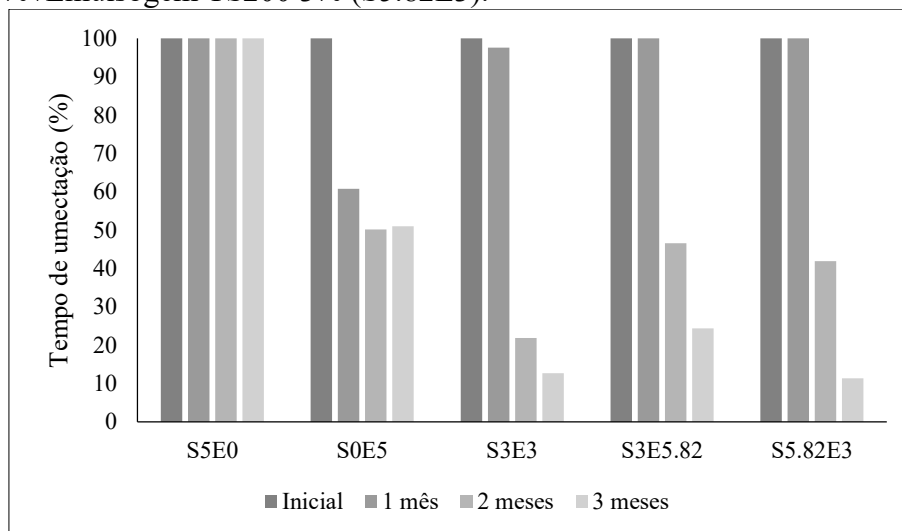
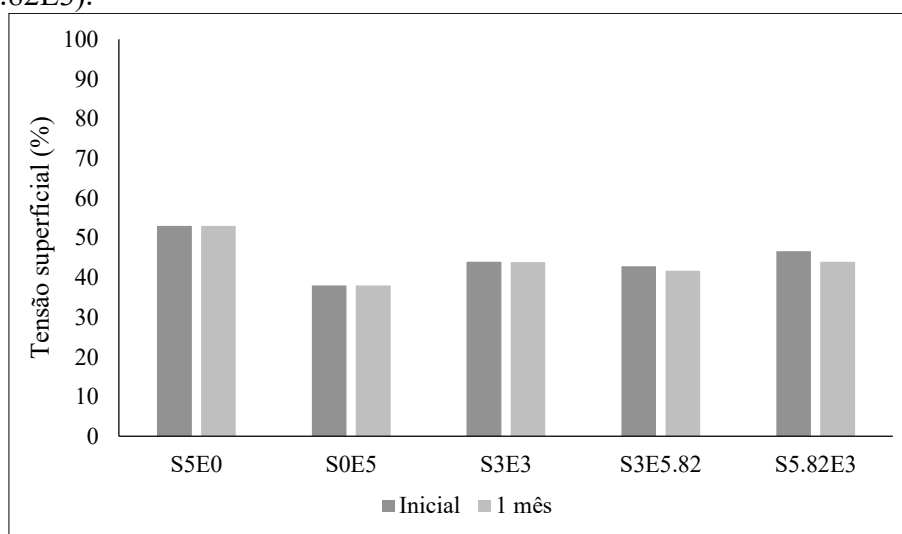


Figura 15: Tensão superficial das formulações de *B. bassiana* com Surfom D 5% (S5E0), Emulsogem TS200 5% (S0E5) e suas combinações, Surfom D 3%/Emulsogem TS200 3% (S3E3), Surfom D 3%/Emulsogem TS200 5.82% (S3E5.82) e Surfom D 5.82% /Emulsogem TS200 3% (S5.82E3).



O Surfom D quando utilizado isolado no preparo das formulações não diminuiu o tempo de umectação, mas quando associado ao Emulsogem TS200 apresentou uma melhor resposta. Assim como o tempo de umectação, a menor tensão superficial foi obtida apenas com Emulsogem TS200, apesar da associação com o Surfom D não ter alterado de forma expressiva esse valor.

Adicionalmente, além das análises da viabilidade do fungo na composição de uma formulação, foi realizado o índice biológico, considerando-se o crescimento de fungos na

presença do surfactante inserido no meio de cultura, onde houve contato direto e permanente entre surfactante e microrganismo para o seu desenvolvimento. Na Tabela 11 estão mostradas a classificação do surfactante no crescimento de *B. bassiana* no meio de cultura PDA com as combinações de Emulsogen TS 200 e Surfom D.

Tabela 11: Efeito dos tensoativos adicionado ao meio de cultura sobre o crescimento micelial, esporulação e germinação de *Beauveria bassiana* na concentração de  $5,25 \times 10^6$  conídios ml<sup>-1</sup> após 15 dias de incubação a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , e classificação da toxicidade pelo IB (Índice Biológico).

| Emulsogen TS 200 | Surfom D | Diâmetro das colônias (cm) | Esporulação ( $\times 10^8/\text{mL}$ ) | Germinação (%) | Índice Biológico | Classificação* |
|------------------|----------|----------------------------|-----------------------------------------|----------------|------------------|----------------|
| 0%               | 0%       | $3,58 \pm 0,25$            | $3,84 \pm 3,35$                         | $90 \pm 2,00$  | -                | -              |
| 5%               | 0%       | $4,60 \pm 0,66$            | $1,5 \pm 0,27$                          | $78 \pm 3,79$  | 98               | C              |
| 0                | 5%       | $4,63 \pm 0,35$            | $1,0 \pm 0,35$                          | $87 \pm 2,08$  | 78               | C              |
| 3%               | 3%       | $3,08 \pm 0,33$            | $11,0 \pm 5,01$                         | $86 \pm 1,00$  | 93               | C              |
| 5.82%            | 3%       | $3,65 \pm 0,07$            | $15,0 \pm 4,62$                         | $96 \pm 4,41$  | 100              | C              |
| 3%               | 5.82%    | $1,97 \pm 0,18$            | $4,80 \pm 0,69$                         | $96 \pm 4,04$  | 79               | C              |

\* Classificação de toxicidade- IB: 0-41 (tóxico - T), 42-66 (moderadamente tóxico -MT) e 66 (compatível - C) (ARAUJO, 2009; PINTO et al., 2012; MONTEIRO et al., 2014)

Todas as combinações avaliadas foram compatíveis com *B. bassiana*. Entretanto, foi observado uma menor esporulação quando ambos os tensaoativos foram usados sozinhos. Ressalta-se que mesmo que compatíveis, houve um efeito negativo sobre a esporulação do fungo.

Devido ao constante contato entre o tensoativo e a célula metabolicamente ativa do fungo esse teste é considerado mais rigoroso. Isso fortalece os resultados desse trabalho pois corroboram com os experimentos anteriores e dão mais confiabilidade na classificação de compatibilidade e na aplicação dos tensoativos Emulsogen TS 200 e Surfom D em uma formulação em pó contendo o fungo *B. bassiana*.

#### 4.4 Conclusão

Esse trabalho permitiu determinar a concentração ótima dos tensoativos Emulsogen TS 200 e Surfom D compatíveis com o fungo entomopatogênico *B. bassiana* capaz de manter a viabilidade de uma formulação por 2 meses a temperatura ambiente. Uma formulação contendo 3% de cada um dos tensoativos permitiu reduzir a hidrofobicidade comprovada pela redução do tempo de umectação do fungo e manteve a viabilidade estável quando comparado a aplicação de apenas um dos tensoativos na formulação.

## 5 Conclusão final

Este estudo mostrou que a concentração e o tipo de surfactante influenciam a viabilidade do fungo *B. bassiana* na composição de uma formulação. Vinte e cinco surfactantes foram testados em 30 dias de armazenamento. Seis surfactantes produziram bons resultados e foram selecionados e reavaliados. Um segundo experimento foi realizado para avaliar a compatibilidade dos seis surfactantes com *B. bassiana* durante 3 meses de armazenamento. Surfom D e Emulsogen TS 200 proporcionaram os melhores resultados. A formulação contendo Surfom D a 5% apresentou alta taxa viabilidade durante o armazenamento, mas apresentou alta tensão superficial. O Emulsogen TS 200, por outro lado, levou a uma redução na tensão superficial e no tempo de umectação, mas também reduziu a viabilidade do conídio a zero após 2 meses de armazenamento. Diante desses resultados os tentativos Emulsogen TS 200 e Surfom D foram combinados para determinar a concentração ótima compatível com o fungo entomopatogênico *B. bassiana* e ao mesmo tempo capaz de manter a viabilidade de uma formulação por 2 meses a temperatura ambiente. Uma formulação contendo 3% de cada um dos tensoativos permitiu reduzir a hidrofobicidade do fungo e manter a viabilidade estável quando comparado a aplicação de apenas um dos tensoativos na formulação.

Estudos futuros devem investigar o uso de combinações de surfactantes em formulações de *B. bassiana* em pó para aumentar a molhabilidade e o prazo de validade. As condições de armazenamento (umidade, temperatura e embalagem) também podem ser avaliadas para avaliar seus efeitos na viabilidade da formulação. Além disso, é de suma importância avaliar a aplicação da formulação no controle de insetos pragas para garantir que os componentes da formulação não afetem negativamente a virulência e a eficácia do fungo.

## Referências

ALVES, R.T.; BETEMAN R.P.; GUNN J.; PRIOR C. e LEATHER S. Effects of different formulations on viability and medium-term storage of *Metarhizium anisopliae* conidia. **Neotropical Entomology**, [s.l.], v. 31, n. 1, p.91-99, mar. 2002. Springer Nature. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1519-566X2002000100013](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-566X2002000100013)>. Acesso em: 21 jul. 2018. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2002000100013>

ALVES, S.B.; PEREIRA R.M.; STIMAC J.L. e VIEIRA, S.A. Delayed Germination of *Beauveria bassiana* Conidia after Prolonged Storage at Low, Above - freezing Temperatures. **Biocontrol Science and Technology**, v. 6, p. 575–581, 1996. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2002000100013>

ARAUJO J.J.M.; MARQUES, E.J.; OLIVEIRA, J.V. Potencial de isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* e do óleo de Nim no controle do pulgão *Lipaphis erysimi* (Kalt.) (Hemiptera: Aphididae). **Neotropical Entomology**, [S.I.], v. 38, n. 4, p.520-525, ago. 2009. Springer Nature. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/s1519-566x2009000400014>>. Acesso em: 12 abr. 2018. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2009000400014>

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NRB 13242**: Determinação de molhabilidade. Rio de Janeiro, 2005.

BATISTA, D.P.C. **Avaliação de Nanocompósitos polimérico como matriz para formulações bioinseticidas**. 2014. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2014.

BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 7-14

BRAR, S.K.; VERMA, M.; TYAGI, R.D. and VALÉRO, J.R., Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. **Process Biochemistry**, [S.I.], v. 41, n. 2, p.323-342, fev. 2006. Elsevier BV. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2005.07.015>>. Acesso em: 11 maio 2018. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.07.015>

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Tipos de formulações para registro de produtos fitossanitários**. 2016. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/agroquimicos-fiscalizacao/publicacoes-agroquimicos/copia\\_de\\_7108f8c23f739060e040a8c075020f36.xls/view](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/agroquimicos-fiscalizacao/publicacoes-agroquimicos/copia_de_7108f8c23f739060e040a8c075020f36.xls/view)>. Acesso em: 7 abr. 2018.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**, AGROFIT. 2020. Disponível em:

<[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 19 FEV. 2020.

BOX, G.E.P.; HUNTER, H.G.; HUNTER, J.S. **Statistics for experiments**. New York: John Wiley Co., p. 310-530, 1978.

DALTIN, D. **Tensoativos**: química, propriedades e aplicações. São Paulo: Blucher, 2011. 59 p.

DEAN, H. (Org.). **Private Pesticide Applicator Safety Education Manual**. 19. ed. Minnesota: University Of Minnesota Extension. 2017. 12 p. Disponível em: <[https://www.extension.umn.edu/agriculture/pesticide-safety/ppat\\_manual/Intro.pdf](https://www.extension.umn.edu/agriculture/pesticide-safety/ppat_manual/Intro.pdf)>. Acesso em: 13 jun. 2018.

DUNLAP, C.A.; BEHLE, R.W.J.; Mark A. Compatibility of OMRI-certified surfactants with three entomopathogenic fungi. **Biocontrol Science and Technology**, [s.l.], v. 24, n. 4, p.436-447, 10 mar. 2014. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/09583157.2013.870532>. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/09583157.2013.870532>>. Acesso em: 14 dez. 2018. <https://doi.org/10.1080/09583157.2013.870532>

EMBRAPA. **Protocolo para Produção Massal de Fungos Entomopatogênicos I - *Beauveria bassiana* (Vuill.)**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2004. 27 p.

EMBRAPA. **Avaliação da qualidade de produtos a base de *Trichoderma***. Jáguaçu: Embrapa, 2013. 51 p.

FARIAS, K. V. **Influência de umectante aniônico na reologia e espessura do reboco de fluidos hidroargilosos**. 2005. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Curso de Mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2005.

FARIA, M.R.; WRIGHT, S.P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, [S.I.], v. 43, n. 3, p.237-256, dez. 2007. Elsevier BV.. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.08.001>>. Acesso em: 11 maio 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.08.001>

FENG, M.G.; POPRAWski, T.J.; KHACHATOURIANS, G.G. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. **Biocontrol Science and Technology**, [S.I.], v. 4, n. 1, p.3-34, jan. 1994. Informa UK Limited. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/09583159409355309>>. Acesso em: 11 maio 2018. <https://doi.org/10.1080/09583159409355309>

FERNANDES, É. K.K.; RANGEL D.E.; BRAGA G.U. e ROBERTS D.W. Tolerance of entomopathogenic fungi to ultraviolet radiation: a review on screening of strains and their formulation. **Current Genetics**, [S.I.], v. 61, n. 3, p.427-440, 19 maio 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00294-015-0492-z>. Disponível em: <



hub.tw/10.1007/s00294-015-0492-z>. Acesso em: 11 maio 2018.  
<https://doi.org/10.1007/s00294-015-0492-z>

HERRMANN, G. **A hora e a vez dos biológicos**: O amadurecimento do setor. 2014. Associação Brasileira de Controle Biológico. Disponível em: <[www.abcbio.org.br/download/?file=225](http://www.abcbio.org.br/download/?file=225)>. Acesso em: 10 jun. 2018.

HOLDER, D.J.; KIRLAND B.H.; LEWIS M.W. e KEYHANI N.O. Surface characteristics of the entomopathogenic fungus *Beauveria* (Cordyceps) *bassiana*. **Microbiology**, [s.l.], v. 153, n. 10, p.3448-3457, 1 out. 2007. Microbiology Society. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.2007/008524-0>>. Disponível em: 01/06/2018  
<https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/008524-0>

HORACZEK, A.; VIERNSTEIN, H. Comparison of three commonly used drying technologies with respect to activity and longevity of aerial conidia of *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. **Biological Control**, [s.l.], v. 31, n. 1, p.65-71, ago. 2004. Elsevier BV. Disponível em: <<https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.elsevier-58e3b303-b581-3e9b-a2c7-0dc91f718272>>. Acesso em: 28 nov. 2018.

JENSEN, S. **Emulsificantes com diferentes EHL (equilíbrio hidrofílico alipofílico) em filmes de amido de mandioca**. 2007. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007. Disponível em: <[livros01.livrosgratis.com.br/cp033333.pdf](http://livros01.livrosgratis.com.br/cp033333.pdf)>. Acesso em: 13 abr. 2018.

JIN, X.; UGINE, T.A.; CHEN, U.J. e STREETT A.D. Method for determining the best hydrophilic-lipophilic balance (HLB) number for a compatible non-ionic surfactant in formulation development for aerial conidia of *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). **Biocontrol Science and Technology**, [S.I.], v. 19, n. 3, p.341-347, mar. 2009. Informa UK Limited. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/09583150902725893>>. Acesso em: 22 fev. 2018. <https://doi.org/10.1080/09583150902725893>

JUNGES, A. **Metarhizium anisopliae**: expressão de proteína tóxica de origem vegetal e análise genômica de quitinases. 2010. 145 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/26609>>. Acesso em: 22 fev. 2018.

JUNGES, A. **As quitinases de Metarhizium anisopliae**: caracterização genômica e funcional. 2014. 122 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/117921>>. Acesso em: 22 fev. 2018.

KRUGER, R.D.; POSADAS J.B.; LEWYLLE M.A.; MINI J.I. E LECUONA R.E., 2014. Solid Substrate Production and Formulation of an Isolate of *Metarhizium anisopliae* for Biological Control of Stem Bug *Tibraca limbativentris*. **World Applied Sciences Journal**. S.l., p. 1242-1251. Disponível em: <[https://www.idosi.org/wasj/wasj32\(7\)14/8.pdf](https://www.idosi.org/wasj/wasj32(7)14/8.pdf)>. Acesso em: 12 dez 2019.

MASCARIN, G.M.; FERNANDES, E.K.K.; JACKSON, M.A. Harvesting the power of fungal entomopathogens for controlling arthropod pests in Brazil. International Congress of Entomology, [S.I.], p.1-3, 2016. **Entomological Society of America**. <http://dx.doi.org/10.1603/ice.2016.95029>. Disponível em: <file:///C:/Users/Morganna.FARROUPILHA/Downloads/HarvestingthepoweroffungalentomopathogensinBrazil-ICE2016.pdf>. Acesso em: 15 maio 2018.

MASCARIN, G.M.; JARONSKI, S.T. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S.I.], v. 32, n. 11, p.116-177, 15 set. 2016. Springer Nature. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1007/s11274-016-2131-3>>. Acesso em: 11 maio 2018. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2131-3>

MENDONÇA, C.G.; RAETANO, C.G.; MENDONÇA, C.G. Tensão superficial estática de soluções aquosas com óleos minerais e vegetais utilizados na agricultura. **Engenharia Agrícola**, v. 27, n. esp., p.16-23, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-69162007000200003>

MONTEIRO, A.C.; MOCHI, D.A.; CORRÊA, M.A. **Composições contendo o isolado JAB 68 do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* e uso das composições**. BR nº BR 102014004519-8 A2, 26 fev. 2014, 29 dez. 2015.

MONTEIRO, G. **Uso do controle biológico de pragas dispara no Brasil**. 2017. Disponível em: <<https://exame.abril.com.br/ciencia/uso-do-controle-biologico-dispara-no-brasil/>>. Acesso em: 24 maio. 2018.

MORA, M.A.E. **Fungos entomopatogênicos isolados de solos de um fragmento de mata atlântica**. 2015. 137 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2015. Disponível em: <<http://cursos.ufrrj.br/posgraduacao/ppgfba/files/2015/04/Dissertacao-FE-Mata-Atlantica-Final-1.pdf>>. Acesso em: 20 fev. 2018.

MORA, M.A.E.; CASTILHO, A.M.C.; FRAGA, M.E. Classification and infection mechanism of entomopathogenic fungi. **Agricultural Microbiology**, [s.l.], v. 84, p.1-10, 5 maio 2017.

MORAIS, C.O.P. **Combinação de fungos entomopatogênicos com o inseticida diflubenzuron e o encapsulamento de *Metarhizium anisopliae* visando o controle de larvas de *Aedes aegypti***. 2015. 108 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2015. Disponível em: <[http://uenf.br/posgraduacao/producao-vegetal/wp-content/uploads/sites/10/2015/10/Versão\\_final\\_tesecatia\\_2015.pdf](http://uenf.br/posgraduacao/producao-vegetal/wp-content/uploads/sites/10/2015/10/Versão_final_tesecatia_2015.pdf)>. Acesso em: 22 fev. 2018.

MWAMBURI, L.A.; LAING, M.D.; MILLER, R M. Effect of surfactants and temperature on germination and vegetative growth of *Beauveria bassiana*. **Brazilian Journal of Microbiology**, [S.I.], v. 46, n. 1, p.67-74, maio 2015. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1517-83822015000100067](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822015000100067)>. Acesso em: 25 mar. 2018. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246120131077>

NUGROHO, I.; IBRAHIM, Y.B. Efficacy of laboratory prepared wettable powder formulation of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* against the polyphagotarsonemus latus (bank) (acari: tarsonemidae) (broad mite) on capsicum annum (chilli). **Jurnal biosains**, S.i, p. 1-11. 10 jan. 2007.

PINTO, A.P.F.; FILHO A.B.; ALMEIDA J.E.M.A. E WENZEL I.M., 2012. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* ao psílideo DaypHorina citri e compatibilidade do fungus com products fitossanitários. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [S.I.], v. 47, n. 12, p.1673-1680. Fap UNIFESP (SciELO). Disponível em: < <http://doi.org/10.1590/s0100-204x2012001200001>>. Acesso em 17 fev. 2018. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2012001200001>

SANTOS, P.S. **Seleção de surfactantes e fotoprotetores para a formulação de *Beauveria bassiana* visando o controle de *Dactylopius opuntiae* em palma Forrageira**. 2009. 76 f. Tese (Doutorado) - Curso de Microbiologia Agropecuária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009. Disponível em: <[https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/94899/santos\\_ps\\_me\\_jabo.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/94899/santos_ps_me_jabo.pdf?sequence=1&isAllowed=y)>. Acesso em: 17 fev. 2018.

SAHAYARAJ, K. e Namasivayam, S.K.R. 2008. Mass production of entomopathogenic fungi using agricultural products and by products. **African Journal of Biotechnology**. v. 7, p.1907-1910, 17 jun 2008. Disponível em: <<https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/58854/47173>>. Acesso em: 17 jan. 2020. <https://doi.org/10.5897/AJB07.778>

SILVA, C.A.D. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* patogênicos ao bicudo-do-algodoeiro. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 36, p.243-247, 10 fev. 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pab/v36n2/a05v36n2>>. Acesso em: 05 jan. 2019. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2001000200005>

SILVA, R.Z. **Formulação e armazenamento de conídios de *Beauveria bassiana* (BALS.) vuill.** 2006. 87 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006. Disponível em: <<http://www.dominiopublico.gov.br/download/texto/cp031135.PDF>>. Acesso em: 17 maio 2018.

SIMKOVA, J. Influence of different storage conditions on vitality and virulence of *Beauveria bassiana* spores. **Journal of Agrobiology**. S.i, p. 75-81. 15 fev. 2009. Disponível em: <[https://www.zf.jcu.cz/dokumenty/dokumenty-journal-of-agrobiology/2009-number-2/3\\_Simkova.pdf](https://www.zf.jcu.cz/dokumenty/dokumenty-journal-of-agrobiology/2009-number-2/3_Simkova.pdf)>. Acesso em: 17 maio 2018.

SINGH, T.; SAIKIA R.; JANA T.E ARORA D.K., 2004 Hydrophobicity and surface electrostatic charge of conidia of the mycoparasite *Coniothyrium minitans*. **Mycological Progress**. v. 3, p219- 228. <https://doi.org/10.1007/s11557-006-0092-x>

TANZINI, M.R.; ALVES S.B.; SETTEN A. e AUGUSTO N.T, 2001. Compatibilidad de agentes tensoactivos con *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. **Manejo Integrado de**

**Pragas**, [s.l.], v. 59, p.15-18. Disponível: <<http://www.sidalc.net/repdoc/A1741E/A1741E.PDF>>. Acesso em: 25 nov. 2019.

UHRY, K.F. **Aspectos do controle biológico de pragas no brasil por meio de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.** 2007. 45 f. Monografia (Especialização) - Curso de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007. Disponível em: <[https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/31722/Monografia\\_Kaline\\_Feldmann\\_Uhry.pdf?sequence=1](https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/31722/Monografia_Kaline_Feldmann_Uhry.pdf?sequence=1)>. Acesso em: 22 abr. 2018.

VALE, T.Y.F. **Desenvolvimento de tensoativos e sistemas microemulsionados para a recuperação de petróleo.** 2009. 135 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009. Disponível em: <[http://www.nupeg.ufrn.br/documentos\\_finais/teses\\_de\\_doutorado/tulio.pdf](http://www.nupeg.ufrn.br/documentos_finais/teses_de_doutorado/tulio.pdf)>. Acesso em: 7 abr. 2018.

## ANEXO - NORMAS DA REVISTA BIOLOGICAL CONTROL

### GUIDE FOR AUTHORS

#### INTRODUCTION

Biological Control promotes the science and technology of biological control through publication of original research articles and reviews of research and theory. The focus includes new and emerging trends in this field. Biological control is defined as the reduction or mitigation of pests and pest effects through the use of natural enemies. Biotechnologies dealing with the elucidation and use of genes or gene products for the enhancement of biological control agents are also of interest. The journal encompasses biological control of viral, microbial, nematode, insect, mite, weed, and other invertebrate and vertebrate pests in agricultural, aquatic, forest, natural resource, stored products, and urban environments. Biological control of arthropod pests of human and domestic animals is also included. Ecological, behavioral, molecular, and biotechnological approaches to advancing the understanding of biological control agents are welcome.

The "rules of 6"

The Editors and Editorial Board have developed the "Rules of 6" for publishing in BCON. We have produced six clear criteria that each author needs to think about before submitting a manuscript and setting the whole process of editing and reviewing at work. Click [here](#).

Types of paper

The following types of original papers only will be considered.

**Regular research papers** are hypothesis-driven projects in biological control as defined above under the "Subject areas of the journal". These papers constitute the majority of the articles published in the journal. However, papers which report on routine results of host specificity studies on new biological control agents, surveys for known or unknown biological control agents, or screening of natural enemies against a pest species will not be considered for publication unless the account describes unusual circumstances or novel methods, or unless the study is placed in a broader perspective. Research papers should have the following sections: a brief Abstract that contains a concise statement of the results obtained; Keywords listed immediately after the Abstract; Introduction; Materials and Methods; Results; Discussion; Acknowledgments; and References. Further details are provided below under "Preparation of manuscript".

**Perspectives papers** provide the authors with a forum for discussing topics and trends in biological control. These articles should raise interesting or unanswered questions, present arguments about the significance of recent findings, describe the application and limitations of

new methods and technologies, or consider potential interfaces between biological control and other disciplines in the sciences. These manuscripts should include the format as listed for the **Regular research papers** or may deviate by having the following sections: Abstract, Introduction, appropriate headings, Conclusion, and References.

**Review articles** are intended to reach a broad audience of readers from investigators in the field to new graduate students learning the material for the first time. Review articles are subject to the same review process as original papers. Manuscripts should be prepared according to the general guidelines given below. The Materials and Methods, Results, and Discussion sections may be replaced with appropriate alternatives; an Abstract is still required. The editors invite inquiries and suggestions for timely and provocative review articles. In some cases, there may be a number of review articles (e.g., a symposium topic) in which case a special issue of the journal may be published. The special issue may include an invited "editor(s)" who invites the authors and selects the topics, provides the guidelines to the authors, sets deadlines, etc., and submits the manuscripts to the journal. The journal editor then handles the manuscripts following normal protocols. Biological Control does not publish Short Communications or Research Notes.

### **Contact details for submission**

Manuscripts should be written in grammatically correct English and should be submitted through the Web site at <http://ees.elsevier.com/bcon>.

### **Submission checklist**

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- All necessary files have been uploaded: Manuscript:
- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print
- Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)
- Supplemental files (where applicable)

### **Further considerations**

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our Support Center.

## **BEFORE YOU BEGIN**

### **Ethics in publishing**

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

### **Policy and ethics**

**Ethics.** Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright holder. Written authorization may be required at the discretion of the editors. Articles and any other material published in Biological Control represent the opinions of the authors and should not be construed to reflect the opinions of the editors or the publisher. A submitted paper will be considered in violation of Elsevier's Ethics Guidelines, and thus potentially subject to rejection or retraction, in the event of the following: the study results are inaccurately or deceptively reported, the data from the study results cannot be produced, the paper submitted is not an original work or it has plagiarized (by copying or paraphrasing) another work, the paper has been submitted concurrently to another journal or is elsewhere published, other works discussed in the paper are improperly cited or un-cited, the list of co-authors is incomplete or contains those who have not contributed substantially to the work, any experiments involving human or animal subjects or hazardous chemicals are not ensured in the paper as having been conducted according to the appropriate guidelines, or financial or otherwise conflicts of interest are not disclosed. For a comprehensive explanation of Elsevier's Ethics Guidelines, please visit <https://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Should questions of probity arise under extraordinary and controversial situations, the editors will reserve the right to subject the authors' data to independent scientific evaluation. Upon acceptance of an article, authors will be asked to sign a Journal Publishing Agreement. (for more information on this and copyright see <https://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail (or letter) will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a "Journal Publishing Agreement" form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <https://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <https://www.elsevier.com/permissions>.

### **Declaration of interest**

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. More information.

### **Submission declaration and verification**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service Crossref Similarity Check.

### **Preprints**

Please note that preprints can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's sharing policy. Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information).

### **Use of inclusive language**

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

### **Author contributions**

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. More details and an example



## **Changes to authorship**

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors before submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only before the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the corresponding author: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors after the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum

## **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of user license.

## **Author rights**

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

## **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

## Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the gold open access publication fee. Details of existing agreements are available online. **Open access**

This journal offers authors a choice in publishing their research:

### Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs.
- No open access publication fee payable by authors.
- The Author is entitled to post the accepted manuscript in their institution's repository and make this public after an embargo period (known as green Open Access). The published journal article cannot be shared publicly, for example on ResearchGate or Academia.edu, to ensure the sustainability of peerreviewed research in journal publications. The embargo period for this journal can be found below.

### Gold open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- A gold open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For gold open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

#### Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

#### Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The gold open access publication fee for this journal is USD 3000, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

#### Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. Find out more.

This journal has an embargo period of 12 months.

#### Elsevier Researcher Academy

Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

#### Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's Author Services. **Submission**

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

## PREPARATION

#### Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

## **Article structure**

### **Subdivision - numbered sections**

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

#### **Introduction**

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

## **Material and methods**

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

## **Theory/calculation**

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

## **Results**

Results should be clear and concise. Discussion This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

## **Conclusions**

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

## **Appendices**

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

### **Essential title page information**

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

## **Highlights**

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

## **Graphical abstract**

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site. Authors can make use of Elsevier's Illustration Services to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

## **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and',

'of). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### **Abbreviations**

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Consult the latest edition of the CBE Style Manual, Council of Biology Editors, Inc., for standard abbreviations, names, and symbols for units, as well as for informative suggestions about grammar, style, and usage. Nonstandard abbreviations should be minimal and should be defined at first mention. Follow the latest edition of "Webster's New International Dictionary" for spelling and division of words. Use numerals with standard units of measurement and for any number above nine. For the sake of consistency, the journal will use U.S. English. Manuscripts should be typed with the language set to U.S. English.

**Acknowledgements** Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### **Formatting of funding sources**

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

**Funding:** This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### **Units**

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

### **Nomenclature and units**

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUPAC: Nomenclature of Organic Chemistry for further information.

For organisms, the complete taxonomic name including the authority must be given at first mention in the text. For exceptions to this rule, such as names of bacteria, consult the editor. The names of insects will be in accordance with the Entomological Society of America. Wherever a common name for a pesticide exists, it should be used. The chemical name of the pesticide must be included in parentheses following the first mention of the common name. Most common names may be found in Guide to the Chemicals Used in Crop Protection by E.Y. Spencer, Agriculture Canada, 7th ed., 1982, and more recent entries are found in The Pesticide Manual-A World Compendium (C.R. Worthington, Ed.; S.B. Walker, Asst. Ed.), 8th ed., British Crop Protection Council, Binfield, Bracknell, Berks RG 125QE, England. In addition, common names of insecticides are listed from time to time by the Entomological Society of America; of herbicides, by the Weed Science Society of America; and of fungicides, by the American Phytopathological Society. For weed names, use the terminology approved by the Weed Science Society of America [Weed Science 32 (Suppl. 2), 1-137, 1984]. For enzymes, the systematic name and number given by the Enzyme Commission (EC) should be included at the first point of mention for each enzyme of importance in the paper. For EC numbers, consult Recommendations (1984) of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry, 1984, Enzyme Nomenclature, Academic Press

Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. An error in a letter or number can result in a dead link. Note that in the final version of the electronic copy, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article.

## Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

## Artwork

### Electronic artwork General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

#### Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

#### Illustration services

Elsevier's Author Services offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

#### Figure captions



Ensure that each illustration has a caption. Supply captions on separate page(s) at the end of the manuscript. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

## **Tables**

Please submit tables as editable text and not as images. Supply table captions on separate page(s) at the end of the manuscript. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

## **References**

### **Citation in text**

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

### **Reference links**

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

### **Web references**

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list

### **Data references**

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

#### References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

#### Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/biological-control>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

#### Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/ book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

#### Reference style Text:

All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references can be

listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa. Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999).... Or, as demonstrated (Jones, 1999; Allan, 2000)... Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. J. Sci. Commun. 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. Heliyon. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. The Elements of Style, fourth ed. Longman, New York. Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), Introduction to the Electronic Age. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

## **Data visualization**

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions here to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

## **Supplementary material**

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

## **Research data**

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

## **Data linking**

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page.

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

## **Mendeley Data**

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission

process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to Mendeley Data. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

### **Data in Brief**

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for Data in Brief as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to Data in Brief where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, Data in Brief. Please note an open access fee of 600 USD is payable for publication in Data in Brief. Full details can be found on the Data in Brief website. Please use this template to write your Data in Brief.

### **Data statement**

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.

## **AFTER ACCEPTANCE**

### **Online proof correction**

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

### **Offprints**

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Author Services. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link. **AUTHOR INQUIRIES**

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published