



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
ESCOLA DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DIOGO PORPINO CORDEIRO BATISTA

**AVALIAÇÃO DE NANOCOMPÓSITO POLIMÉRICO COMO MATRIZ PARA
FORMULAÇÕES BIOINSETICIDAS**

Maceió

2014

DIOGO PORPINO CORDEIRO BATISTA

**AVALIAÇÃO DE NANOCOMPÓSITO POLIMÉRICO COMO MATRIZ PARA
FORMULAÇÕES BIOINSETICIDAS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Professora Dr.^a. Camila Braga
Dornelas

Co-orientador: Professor Dr. Luciano
Aparecido Meireles Grillo

Maceió

2014

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico Bibliotecária
Bibliotecário: Valter dos Santos Andrade

- B333a Batista, Diogo Porpino Cordeiro.
Avaliação de nanocompósito polimérico como matriz para formulações bioinseticidas /
Diogo Porpino Cordeiro Batista. – 2014.
[93] f. : il., graf., tab.
- Orientadora: Camila Braga Dornelas.
Co-orientador: Luciano Aparecido Meireles Grillo.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alagoas.
Escola de Enfermagem e Farmácia. Maceió, 2014.
- Bibliografia: f. 74-80.
Anexos: f. 81-[93].
1. *Rhynchophorus palmarum*. 2. *Beauveria bassiana*. 3. Bioinseticida. 4. Matrizes poliméricas. 5. Nanocompósitos (Materiais). I. Título.

CDU: 615.285

Folha de Aprovação

DIOGO PORPINO CORDEIRO BATISTA

AVALIAÇÃO DE NANOCOMPÓSITO POLIMÉRICO COMO MATRIZ PARA FORMULAÇÕES BIOINSETICIDAS

Dissertação submetida ao corpo docente do programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 21/08/2014.

Dra. Camila Braga Dornelas – UFAL (Orientadora)

Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo – UFAL (Co-orientador)

Banca Examinadora

Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana – UFAL (Titular Interno)

Dr. José Guedes de Sena Filho – EMBRAPA (Titular Externo)

Dr. Irinaldo Diniz Basílio Júnior – UFAL (Suplente Interno)

Dra. Maria Anilda dos Santos Araújo – HUPAA – UFAL (Suplente Externo)

*Dedico este trabalho a meus pais
Márcia Porpino e Pedro Bezerra, a meu irmão
Douglas Porpino, que estiveram sempre ao
meu lado, me apoiando e me incentivando a
buscar sempre novas conquistas. A meus filhos
Pedro e Júlia e a minha esposa Elizabeth, meu
porto seguro, que está todos os dias ao meu
lado. A minha tia Nevinha (in memoriam),
importantíssima na minha formação, tanto
pessoal quanto profissional.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que me presenteou com a vida, bem maior. E como se não bastasse, ainda colocou pessoas maravilhosas ao meu redor.

Agradeço a meus pais, por terem me educado e me ensinado quais caminhos seguir, proporcionando-me amor incondicional em todos os momentos da minha vida. A meu irmão Douglas. Agradeço a toda minha família pelo apoio.

À minha esposa Elizabeth por estar sempre ao meu lado e torcer tanto por mim, sempre me dando muito amor e ficando acordada comigo até 4 da madrugada enquanto eu estudava. A meus filhos Júlia e Pedro Neto por existirem em minha vida.

A todos os meus amigos de faculdade e de laboratório que tanto me ajudaram nesta caminhada.

Aos meus amigos pessoais que estão sempre por perto pra o que der e vier.

Agradeço a todos os professores, que me deram o embasamento intelectual para que eu me tornasse um profissional competente. Especialmente a meus orientadores Camila Braga e Luciano Meireles por terem acreditado em mim, depositando confiança no meu potencial.

Ao CNPq a CAPES e a FAPEAL pelo apoio financeiro e aos parceiros de pesquisa que fizeram tornaram este trabalho possível, professores: Eduardo (OptMA - Física), Emiliano (ICBS), Ticiano (ESENFAR), Cristina Delgado (FANUT) e Luiz Carlos (IQB). Agradeço a Jailma (IQB), Abner (ESENFAR), Ana (IF), Carla (EMBRAPA) e em especial a minha grande parceira Anilda (HU), que teve muita paciência e boa vontade em me ajudar.

À Universidade Federal de Alagoas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade a mim concedida.

RESUMO

A importância da cultura do coco (*Cocos nucifera* L) merece destaque por diversos fatores, dentre eles: econômicos, sociais e ambientais. A incidência de infestações da broca-do-olho-do-coqueiro *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: *Curculionidae*), prejudica os agrossistemas que cultivam esta palmácea. O único produto utilizado no Brasil para o controle desta praga é o feromônio sintético de agregação, Rincoforol. Uma estratégia recente que vem sendo utilizada com sucesso é o uso de agentes entomopatogênicos como o fungo *Beauveria bassiana*. O encapsulamento deste bioinseticida em matrizes poliméricas pode proteger o material fúngico de fatores deletérios, além de garantir maior aderência do produto no inseto e/ou no coqueiro, proporcionando maior eficiência na aplicação e maior estabilidade por um longo período. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar um nanocompósito polimérico como matriz para este bioinseticida. *Beads* foram formados por técnicas de gelificação ionotrópica, sendo testadas diferentes concentrações de conídios e de silicato lamelar. A matriz foi avaliada por difração de raios X e espectroscopia de infravermelho; os produtos foram avaliados quanto ao rendimento, eficiência de encapsulação, distribuição dos conídios nos *beads*, índice de intumescimento, distribuição do tamanho e índice de polidispersão, morfologia, estudos de liberação *in vitro*, estabilidade e custo de produção. Os resultados demonstraram que esta matriz possui capacidade de encapsular grande quantidade de conídios, sem que haja interferência no seu processo de germinação. Análises de DRX mostraram que não houve intercalação, mas a interação entre os compostos foi elucidada por FTIR. Conídios na matriz foram visualizados por técnicas de fluorescência. Foi visto que a adição da argila resultou melhoria do rendimento e também maior eficiência de encapsulação, ao passo que reduziu o índice de intumescimento dos *beads*. Além disso, todos os produtos apresentaram homogeneidade de tamanho, resultado da estreita faixa de polidispersão e o aumento da concentração de bentonita pareceu ser acompanhado por uma esferização dos *beads*. As concentrações mais altas do argilomineral (4 e 6%) propiciaram perfis de liberação modificados do fungo, havendo retardo tanto do início da germinação quanto de seu desenvolvimento. O produto da concentração mais alta de bentonita avaliada por 10 meses (AB4) manteve-se estável, com germinação miceliana normal, por todo o período quando sob refrigeração, ou por 5 meses quando em temperatura ambiente.

Palavras-chave: *Rhynchophorus palmarum*; *Beauveria bassiana*; polímeros; argila, *beads*.

ABSTRACT

The importance of the culture of coconut (*Cocos nucifera* L) is noteworthy for several factors, including: economic, social and environmental. The incidence of infestations of the borer-eye-of-coconut *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: *Curculionidae*), affect agroecosystems that cultivate this palmacea. The only product used in Brazil to control this pest is the synthetic aggregation pheromone, Rincoforol. A recent strategy that has been successfully used is the use of agents such as entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. The encapsulation of the biopesticide in polymer matrices can protect fungal material deleterious factors, and can ensure greater adherence of the product in the insect and/or coconut palm, providing greater efficiency and increased stability in the application so it can be stored for a long period. Thus, the aim of this study was to evaluate a polymer nanocomposite as the matrix for this biopesticide. Beads were formed by ionotropic gelation techniques, with different tested conidia and layered silicate concentrations. The matrix was evaluated by X-ray diffraction and infrared spectroscopy; Products were evaluated for yield, encapsulation efficiency, distribution of conidia on the beads, swelling index, size distribution and polydispersity, morphology, *in vitro* release studies, stability and production cost. The results show that this matrix is capable of encapsulating large amounts of spores, without interfering with the process of germination. XRD analysis showed no intercalation, but the interactions between the compounds were elucidated by FTIR. Conidia in the matrix were visualized by fluorescence techniques. It was found that clay addition resulting improved performance as well as higher encapsulation efficiency, while reducing the swelling index of the beads. Furthermore, all products were homogeneous in size, a result of the narrow range of polydispersity and increasing concentration of bentonite appeared to be accompanied by a spherize of beads. Higher concentrations of the clay mineral (4 and 6%) have provided the fungus modified release profiles, both having retardation of germination and early in its development. The product of the highest concentration of bentonite evaluated for 10 months (AB4) remained stable, with normal germination mycelia, over the entire period when refrigerated, or when for 5 months at room temperature.

Keywords: *Rhynchophorus palmarum*, *Beauveria bassiana*, polymers; clay; beads.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Avanço do cultivo de coqueiros nos estados brasileiros.....	19
Figura 2 – Ciclo de desenvolvimento e reprodução do <i>R. palmarum</i>	21
Figura 3 – Dimorfismo sexual do <i>Rhynchophorus palmarum</i>	23
Figura 4 – a) <i>Bursaphelenchus cocophilus</i> ; b) anel vermelho; c) coqueiro acometido.....	24
Figura 5 – Esquema de armadilhas tipo alçapão: a) balde; b) garrafa PET.....	28
Figura 6 – Adultos de <i>Rhynchophorus palmarum</i> parasitados pelo fungo <i>B. bassiana</i>	32
Figura 7 – Unidades monoméricas do alginato.....	35
Figura 8 – Formação do alginato de cálcio: a) homopolímeros de ácido gulurônico em solução. b) Ligação do cálcio. c) cadeias poliméricas.....	36
Figura 9 – Diagrama esquemático geral das argilas tipo esmectita.....	39
Figura 10 – Fluxograma com as etapas da metodologia.....	42
Figura 11 – Diagrama esquemático de obtenção das formulações.....	44
Figura 12 – Aspecto macroscópico (a) e microscópico (b) de <i>B. bassiana</i>	52
Figura 13 – Microscopia óptica dos conídios em BDA. a) Conídios recém-semeados. b) conídios germinados (após 16 horas). c) Detalhe dos conídios germinados.....	53
Figura 14 – Produtos da gelificação ionotrópica.....	54
Figura 15 – Espectros de DRX do alginato, da bentonita e de AB4 (branco).....	55
Figura 16 – Espectros de FTIR do alginato, da bentonita e de AB4 (branco).....	57
Figura 17 – Micrografias: a) bead seco sob luz comum; b) bead seco sob luz UV; c) bead intumescido sob luz comum; d) bead intumescido sob luz UV; e) bead (branco) sob luz comum; f) bead (branco) sob luz UV.....	58

Figura 18 – Lâmina contendo conídios de <i>B. bassiana</i> fixados: a) sob luz comum; b) sob luz UV.....	59
Figura 19 – Índice de intumescimento das formulações.....	61
Figura 20 – Tamanho de partícula dos <i>beads</i> secos com diferentes concentrações de bentonita.....	63
Figura 21 – Morfologia dos <i>beads</i> por MEV a-b-c: AB0 branco (60, 500 e 1000x); d-e-f: AB0 (45, 1000 e 3000x); g-h-i: AB4 (53, 100 e 3000x).....	65
Figura 22 – MEV da secção de um <i>bead</i> AB6.....	65
Figura 23 – Liberação <i>in vitro</i> de <i>B. bassiana</i> dos <i>beads</i> de AB2 a-d: fotografias; e-h: estereoscopias; i-l: MEV: secas (a/e); intumescidas (b/f); após 24 horas (c/g); após 48 horas (d/h); do <i>bead</i> seco - 53x (i); modificação da superfície – 16 horas – 3000x (j); crescimento hifal – 22 horas – 150x (k) e recobrimento miceliano – 24 horas 500x.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produção e área colhida dos principais países produtores de coco, em 2008.....	18
Tabela 2 – Evolução do rendimento e dos percentuais de participação regional na produção e área colhida com coco.....	20
Tabela 3 – Produtos registrados no Agrofit para controle comportamental de <i>R. palmarum</i> ..	27
Tabela 4 – Pragas agrícolas susceptíveis a <i>B. bassiana</i> e principais culturas afetadas.....	31
Tabela 5 – Pragas domésticas susceptíveis a <i>B. bassiana</i>	31
Tabela 6 – Equipamentos e instrumentos componentes do custo fixo de produção de conídios de <i>Beauveria bassiana</i>	49
Tabela 7 – Materiais utilizados como componentes do custo fixo de produção de pré-formulações de pó molhável contendo conídios de <i>B. bassiana</i>	50
Tabela 8 – Materiais utilizados como componentes do custo fixo de produção de formulações nanoestruturadas contendo conídios de <i>B. bassiana</i>	50
Tabela 9 – Insumos e tarifas componentes do custo variável de produção de pré-formulações de pó molhável contendo conídios de <i>B. bassiana</i>	51
Tabela 10 – Insumos, tarifas componentes do custo variável de produção de formulações nanoestruturadas contendo conídios de <i>B. bassiana</i>	51
Tabela 11 – Percentual de germinação das suspensões.....	53
Tabela 12 – Rendimento (Y%) e Eficiência de encapsulação (EE%) dos produtos obtidos...60	
Tabela 13 – Distribuição do tamanho de partículas (DTP) e Índice de polidispersão (IP) dos produtos obtidos.....	63
Tabela 14 – Estabilidade dos conídios fúngicos encapsulados, armazenados a diferentes temperaturas.....	69
Tabela 15 – Custo fixo discriminado para a produção de pré-formulações de pó molhável contendo conídios de <i>B. bassiana</i>	70

Tabela 16 – Custo fixo discriminado para a produção de formulações nanoestruturadas contendo conídios de <i>B. bassiana</i>	71
Tabela 17 – Custo variável de produção de pré-formulações de pó molhável contendo conídios de <i>B. bassiana</i>	71
Tabela 18 – Custo variável de produção de formulações nanoestruturadas contendo conídios de <i>B. bassiana</i>	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MIP	Manejo Integrado de Pragas
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
pH	Potencial hidrogeniônico
t	tonelada
ha	hectares
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
PAM	Produção Agrícola Municipal
mm	milímetros
cm	centímetros
PET	politereftalato de etileno
con/mL	conídios por mililitro
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
°C	graus Celsius
PLN	<i>polymer-layered silicate nanocomposite</i>
nm	nanômetro
µm	micrometro
BDA	Batata-Dextrose-Ágar
mL	mililitro
rpm	rotações por minuto
M	molar
DRX	difração de raios X
FTIR	espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier
g	grama
v	volume
Y%	rendimento
EE%	Eficiência de encapsulação
Ii%	Índice de intumescimento
DTP	Distribuição do tamanho de partículas
IP	índice de polidispersão
UV	ultravioleta
MMT	Montimorilonita

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	Coqueiro	16
2.2	<i>Rhynchophorus palmarum</i>	21
2.2.1	Formas de controle de pragas.....	24
2.2.1.1	Controle químico.....	25
2.2.1.2	Controle comportamental.....	26
2.2.1.3	Controle biológico.....	28
2.2.2	Fungos entomopatogênicos.....	29
2.2.2.1	<i>Beauveria bassiana</i>	30
2.2.3	Formulações bioinseticidas.....	33
2.2.4	Alginato.....	35
2.2.5	Nanocompósitos poliméricos.....	37
2.2.5.1	Nanocompósitos polímero – silicato lamelar.....	38
2.2.6	Bentonita.....	39
3	OBJETIVOS	40
3.1	Objetivo geral	40
3.2	Objetivos específicos	40
4	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	Material	41
4.2	Métodos	41
4.2.1	Microrganismo e meio de cultura.....	43
4.2.2	Viabilidade das suspensões.....	43
4.2.3	Preparação das formulações.....	43
4.2.4	Interação entre os componentes dos <i>beads</i>	45
4.2.4.1	Difração de raios X.....	45
4.2.4.2	Infravermelho (FTIR).....	45
4.2.5	Distribuição dos conídios nos <i>beads</i>	45
4.2.6	Rendimento (Y%).....	46
4.2.7	Eficiência de encapsulação (EE%).....	46
4.2.8	Índice de intumescimento (Ii%).....	46

4.2.9	Distribuição do tamanho de partícula (DTP).....	47
4.2.10	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	47
4.2.11	Teste de liberação <i>in vitro</i>	48
4.2.12	Teste de estabilidade.....	48
4.2.13	Custo de produção de conídios por diferentes tecnologias.....	48
4.2.14	Análise estatística.....	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1	Microrganismo e meio de cultura	52
5.2	Viabilidade das suspensões	52
5.3	Preparação das Formulações	54
5.4	Interação entre os componentes dos <i>beads</i>	55
5.4.1	Difração de raios X (DRX).....	55
5.4.2	Infravermelho (FTIR).....	56
5.5	Distribuição dos conídios nos <i>beads</i>	57
5.6	Rendimento (Y%)	59
5.7	Eficiência de encapsulação (EE%)	59
5.8	Índice de intumescimento (Ii%)	60
5.9	Distribuição do tamanho de partícula (DTP)	62
5.10	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	64
5.11	Teste de liberação <i>in vitro</i>	66
5.12	Teste de estabilidade	68
5.13	Custo de produção de conídios por diferentes tecnologias	70
6	CONCLUSÕES	72
	REFERÊNCIAS	74
	ANEXOS	81

1 INTRODUÇÃO

A cultura do coco (*Cocos nucifera* L) se destaca por inúmeros fatores, como pelos diversos produtos derivados desta frutífera, que podem ser explorados de diversas formas, e por possibilitar a associação com culturas alternativas, a exemplo das culturas de subsistência, incentivando a fixação do homem do campo nos locais de cultivo do coqueiro. De uma forma ou de outra, é capaz de promover significativa contribuição econômica e social local (FONTENELE, 2005; MARTINS & JESUS JÚNIOR, 2011).

Mundialmente, cerca de 90 países possuem culturas de coco como agronegócio, sendo, em ordem, Filipinas, Indonésia, Índia e Brasil os maiores produtores. Mas este panorama podia ser melhor, visto que os pequenos produtores são os principais detentores das culturas de coqueiro e grande parte da produção nacional é proveniente de sistemas semi-extrativistas. Ou seja, a falta de acesso a novas tecnologias, decorrente dos limitados recursos financeiros; aliada a condições inadequadas de irrigação, adubação e controle fitossanitário, impedem o melhor aproveitamento das áreas de cultivo e reduzem drasticamente a produtividade (NEGRISOLI JÚNIOR et al., 2011). Soma-se a isso, o aumento da incidência de infestações por pragas, como a broca-do-olho-do-coqueiro *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: *Curculionidae*), a qual já foi relatada em aproximadamente 13 estados brasileiros, incluindo Alagoas. Esta coleobroca causa dano mecânico ao tecido vegetal e pode, ainda, atuar como vetor do nematoide *Bursaphelenchus cocophilus*, causador da doença-do-anel-vermelho (FERREIRA, 2002a).

As tentativas de diminuição populacional desta praga consistem basicamente em estratégias de controle comportamental, através de sua captura com auxílio do feromônio sintético de agregação Rincoforol. O sistema de consulta pública Agrofit (Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), indica que este é o único ativo registrado para tal aplicação (AGROFIT, 2014).

Uma prática recente que vem sendo utilizada com sucesso no Manejo Integrado de Pragas (MIP) e cada vez mais incentivada pelo MAPA é o uso de agentes entomopatogênicos no combate de insetos-praga, geralmente designados por inseticidas biológicos, ou bioinseticidas (VALICENTE, 2009). Algumas espécies já são amplamente utilizadas, a exemplo da *Beauveria bassiana*, que possui aplicabilidade bastante difundida no controle de

coleópteros (GÜERRI-AGULLÓ et al., 2010). Além disso, apresenta virulência comprovada sobre *R. palmarum*, confirmada em um estudo de campo realizado pela Embrapa Tabuleiros Costeiros do estado de Sergipe, onde insetos foram inoculados com a cepa CPATC032 isolada de exemplares infectados naturalmente, o que resultou em diminuição populacional durante o período de teste (FERREIRA, 2002b).

Contudo, os conídios fúngicos são muito sensíveis a fatores externos (abióticos), como calor, radiação, umidade, variações de pH, o que limitam sua comercialização. Assim, a fim de proteger a matriz fúngica desses fatores e aumentar sua estabilidade, seu encapsulamento desponta como uma importante estratégia, podendo, ainda, garantir maior aderência do produto no inseto e/ou no coqueiro, proporcionando maior eficiência na aplicação (ARICA et al., 2001; CALERO et al., 2008).

Assim, dados: (i) a importância da cultura de coco no contexto nacional e, especialmente, regional; (ii) o destaque da colebroca *R. palmarum* contra a cultura do coco; (iii) a existência de somente um ativo com esta indicação, Rincoforol[®] (AGROFIT, 2014); (iv) a importância do gênero *Beauveria spp.* no parasitismo de coleópteros (GÜERRI-AGULLÓ et al., 2010); (v) a atividade comprovada do fungo entomopatogênico *B. bassiana* contra o *R. palmarum* (FERREIRA, 2002b), o presente trabalho propõe o desenvolvimento de bioinseticida de *B. bassiana* sob a forma de *beads* de alginato/bentonita como materiais de núcleo para investigação contra *R. palmarum*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Coqueiro

O coqueiro, *Cocos nucifera* L. é a única espécie do gênero *Cocos* (*Arecaceae*), pertencente à subfamília *Cocoideae*. É uma monocotiledônea lenhosa e com características típicas das palmeiras, grupo vegetal com morfologia bastante peculiar e facilmente reconhecível. Esta espécie apresenta duas variedades bastante utilizadas comercialmente, a variedade anã (*Nana*) e gigante (*Typica*), existindo ainda os híbridos resultantes de cruzamentos entre estas (SODRÉ, 2005; LOIOLA, 2009).

Segundo dados da *Food and Agriculture Organization* (FAO, 2011), o coqueiro está distribuído em uma área total de cerca de 12 milhões de hectares e difundido em aproximadamente 200 países, dos quais cerca de 90 realizam a exploração comercial desta cultura, despontando como uma das 20 espécies vegetais de maior importância para humanidade. Este fato se deve às condições climáticas e características geológicas de cada local, tendo estes países, geralmente, condições ideais, como incidência de radiação solar intensa, terrenos predominantemente arenosos, boa umidade do ar e níveis de precipitação relativamente bons (MARTINS & JESUS JÚNIOR, 2011).

O coqueiro é uma frutífera essencialmente de clima tropical (FONTENELLE, 2005). O continente asiático, além de ser o provável ponto de origem ainda destaca-se como principal região produtora, com aproximadamente 72% da produção mundial (FAO, 2011). O fruto é o produto de maior importância, dele pode-se extrair subprodutos para, desde o consumo humano, como a água, o óleo e a polpa, como também para finalidades diversas, a exemplo da fibra proveniente do mesocarpo do coco, que representa importância comercial crescente, podendo ser utilizada na fabricação de cordas, esteiras e diversos outros produtos semelhantes. O endossarão, popularmente conhecido como “quenga do coco”, é a camada pétrea que envolve a parte comestível, é bastante utilizada em artesanato como matéria-prima para inúmeros objetos de arte que são vendidos em pontos turísticos (FERREIRA et al., 1998). Outro subproduto do coco que vem chamando atenção nos últimos anos devido ao seu alto valor agregado é o endosperma líquido envasado (água-de-coco), que passa por diversas etapas de processamento para garantir a sua conservação. Outras partes do coqueiro também representam matéria-prima de importância econômica, a exemplo do estipe (tronco), folhas e raízes, que podem ser usados em artesanato e na construção civil (FONTENELLE, 2005).

O Brasil desponta no cenário mundial como 4º colocado em termos de produtividade (Tabela 1), salto bastante considerável já que no ano de 1990 o país se encontrava na 10ª posição com uma produtividade de 477 mil toneladas de fruto (FAO, 2011). Contudo, a área colhida é bastante reduzida, se for levado em consideração o extenso território nacional plantado com coqueirais. Esta situação ocorre principalmente pelo abandono dos coqueirais por parte dos proprietários, que muitas vezes se encontram desestimulados com o mercado do coco (MARTINS & JESUS JÚNIOR, 2011).

Tabela 1 – Produção e área colhida dos principais países produtores de coco, em 2008.

País	Produção (1.000t)	Área colhida (ha)
Indonésia	19.500.000	2.950.00
Filipinas	15.319.000	3.379.740
Índia	10.894.000	1.940.000
Brasil	2.759.044	287.016
Sri Lanka	2.210.800	394.840
Tailândia	1.483.927	245.725
México	1.246.400	178.500
Vietnã	1.086.000	138.300
Papua Nova Guiné	677.000	203.000
Malásia	455.408	174.000
Outros	5.081.057	1.339.505
Mundo	60.713.136	11.230.656

Fonte: FAO, 2011 (Adaptado).

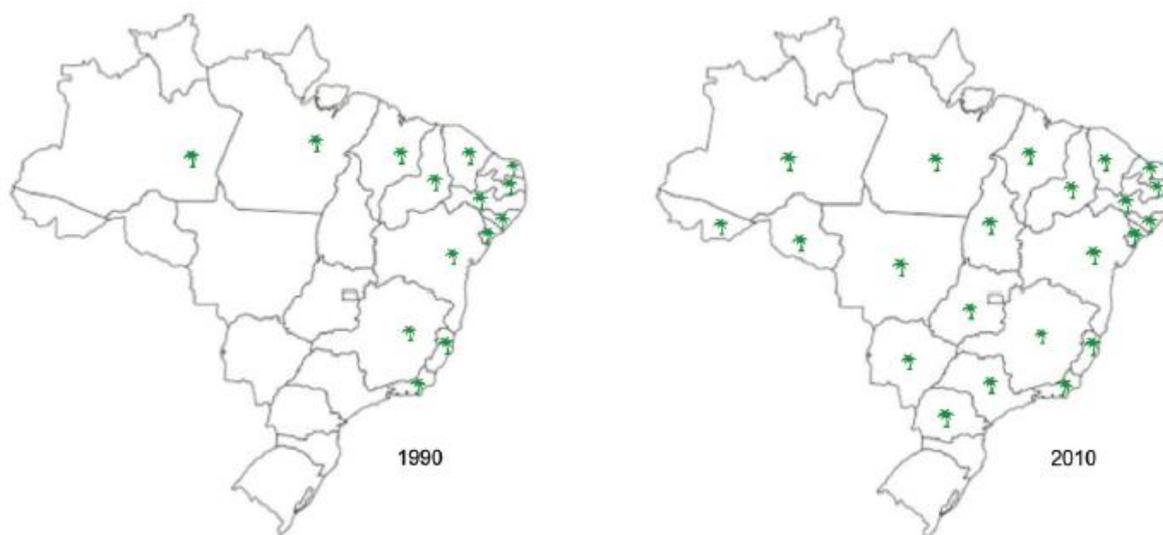
A cultura do coco foi inserida pela primeira vez em território nacional no ano de 1553 no estado da Bahia. A espécie importada foi da variedade gigante procedente da república africana de Cabo Verde. O cruzamento da espécie gigante com o coqueiro anão, que foi introduzido em meados do século XX, resulta no surgimento de híbridos denominados intervarietais, que são bastante cultivados e representam uma tendência atual no Brasil, podendo ser utilizados tanto para o consumo *in natura* quanto para produção industrial (LOIOLA, 2009). A introdução e adaptabilidade do coqueiro em regiões costeiras do litoral brasileiro acarretou um fenômeno ocupacional de um ecossistema pouco explorado em relação ao comércio do agronegócio, principalmente pela dificuldade de estabelecimento de outros tipos de cultura. Este fenômeno propiciou fixação de uma nova classe produtora nesta região, representando um grande avanço social (SIQUEIRA et al., 2002).

Um banco ativo de germoplasma de coco é mantido pela Embrapa Tabuleiros Costeiro do estado de Sergipe desde 1982, momento em que os primeiros acessos de coco foram importados da Costa do marfim. Este banco de dados realiza a manutenção da variabilidade genética através da conservação de 35 acessos de coqueiro Anão e Gigante, além de realizar o manejo do germoplasma referente à introdução, intercâmbio, regeneração, coleta, caracterização, avaliação e documentação dos acessos (RAMOS et al., 2009).

No período entre 1990 e 2010, foi constatada uma expansão da cultura do coqueiro das regiões tradicionalmente mais cultivadas, sobretudo o nordeste, para as outras regiões

brasileiras, inclusive para o próprio semiárido nordestino (MARTINS & JESUS JÚNIOR, 2011). Esta expansão está ilustrada na figura 1.

Figura 1 – Avanço do cultivo de coqueiros nos estados brasileiros.



Fonte: Martins & Jesus Júnior, 2011.

Pouco mais de 259 mil hectares de solo brasileiro foram destinados ao cultivo de coqueiro no ano de 2012, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) – Produção Agrícola Municipal (PAM), gerando uma produção de 1.954.354 toneladas de fruto. Dentre as culturas pesquisadas, o coco foi o quarto produto frutícola com maior área colhida (257.000 ha), ficando atrás somente da castanha-de-caju (756.846 ha), da laranja (729.583 ha) e da banana (481.116 ha). Levando-se em consideração a quantidade de frutos colhidos, os três maiores produtores do Brasil estão localizados na região nordeste, em ordem: Bahia (553.759 t), Ceará (272.060 t) e Sergipe (242.852 t). Estes números são condizentes com a distribuição geográfica das culturas no território nacional, ou seja, ao longo de toda extensão do litoral nordestino (NEGRISOLI JÚNIOR et al., 2011). Contudo, as regiões norte, centro oeste, sudeste e até mesmo a região sul vêm expandindo suas áreas produtivas nos últimos anos, devido principalmente a ações governamentais de fomento a cultura e também de projetos privados de apoio a culturas agrícolas alternativas. Este avanço possibilita o aumento da renda dos produtores através da aplicação adequada das tecnologias e

também da maior proximidade dos grandes centros consumidores (FAO, 2011). Esta expansão pode ser verificada na tabela 2.

Tabela 2 – Evolução do rendimento e dos percentuais de participação regional na produção e área colhida com coco.

Região	Produção (%)		Área colhida (%)		Rendimento (ha)	
	1985	2001	1985	2001	1985	2001
Nordeste	94,4	71,2	96,2	87,6	3.354	4.070
Norte	3,8	14,8	2,3	7,7	5.642	9.692
Sudeste	1,8	14,0	1,5	4,7	4.207	14.869

Fonte: IBGE, 2012.

O coco é parte integrante do ecossistema agrícola produtivo de Alagoas e fomenta indústrias de seus derivados com matéria-prima, levando a melhoria da qualidade de vida dos produtores através da geração de renda (ARAGÃO, 2002). No entanto, a falta de acesso a novas tecnologias e a recursos financeiros por parte dos produtores locais compromete o agronegócio no estado. Limitações produtivas são causadas também pela alta incidência de organismos-praga, que impedem o melhor aproveitamento das áreas de cultivo e reduzem drasticamente a produtividade (NEGRISOLI JÚNIOR et al., 2011). Nestas condições, a taxa de produção dos coqueirais se encontra abaixo do verdadeiro potencial desta frutífera, que na atualidade está na faixa de 30 frutos por planta a cada ano, visto que é possível se chegar a uma produtividade de 60 a 80 frutos/planta/ano quando as condições agroecológicas são ideais. Isto evidencia a necessidade imediata de aprimoramento desta atividade agrícola com o objetivo de suprir a crescente demanda de coco (FONTENELLE, 2005; FERREIRA, 2002a).

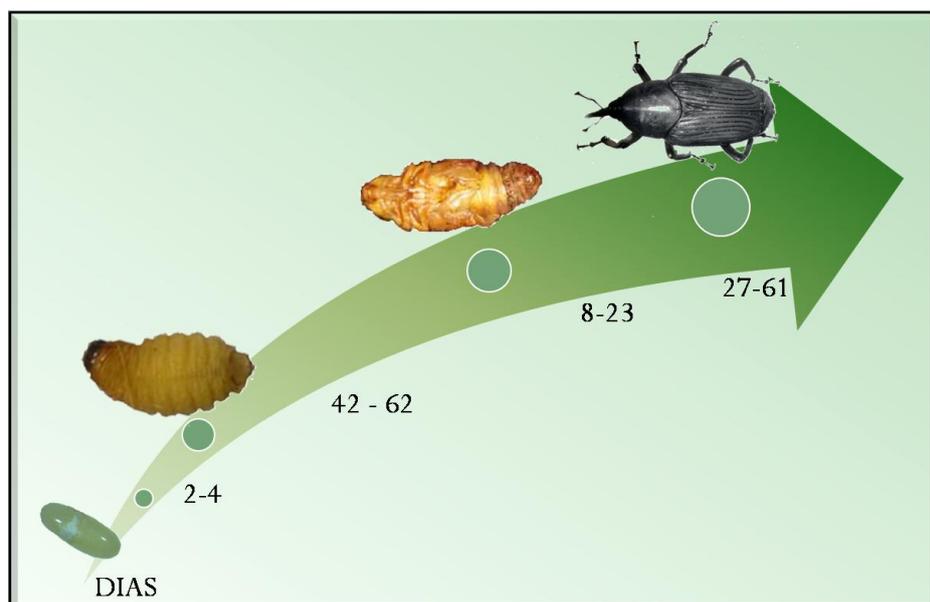
Organismos-praga são definidos como agentes capazes de reduzir a produção ou prejudicar a qualidade de produtos agrícolas de agrossistemas afetados, seja pelo próprio ataque da praga, seja pela transmissão de doenças (PICANÇO, 2010). Diversas espécies podem atacar as culturas causando danos durante todo o período de desenvolvimento da planta. Estes danos podem acarretar enormes prejuízos, tanto ambientais quanto econômicos, pois estas pragas podem agir em diversas etapas cronológicas das espécies vegetais, resultando em declínio do desenvolvimento vegetativo e ocasionando atraso no período produtivo inicial (FERREIRA, 2002a; MOLIN & BARRETO, 2012).

2.2 *Rhynchophorus palmarum*

O *Rhynchophorus palmarum* é um inseto-praga da ordem *Coleoptera* pertencente à família *Curculionidae*, que é formada por insetos popularmente conhecidos como gorgulhos. A ordem *Coleoptera* é reconhecida como sendo a maior em número de espécies, seus exemplares possuem como característica comum a presença de um par de asas endurecidas, chamadas de élitros, sobrepondo ao par de asas membranosas, utilizadas no voo. Estas asas endurecidas são chamadas de élitros e servem de proteção ao inseto. A família *Curculionidae* caracteriza-se pela presença de uma probóscide comprida, chamada de rostró. O *R. palmarum* é conhecido popularmente como broca-do-olho-do-coqueiro, aramanbaia, broca-do-coqueiro, bicudo, elefante, etc (EMBRAPA, 2010).

Insetos de *R. palmarum* sofrem metamorfose completa durante seu ciclo de vida, ilustrado na figura 2, iniciando pela fase de ovo. Cerca de 250 ovos (média de 5 por dia) podem ser ovopositados por uma fêmea durante um ciclo de vida, que dura, aproximadamente, 120 dias. Estes ovos permanecem incubados por um período de 2 a 4 dias até o momento em que eclodem e dão origem as larvas. Eles possuem formato cilíndrico, coloração branco-amarelada e aspecto brilhante, apresentam comprimento de cerca de 2 a 2,5 mm e largura de 1,25 a 1,35 mm. As larvas podem atravessar entre 6 e 10 instares durante seu período de desenvolvimento, que dura entre 42 e 62 dias (OEPP, 2005; EMBRAPA, 2010).

Figura 2: Ciclo de desenvolvimento e reprodução do *R. palmarum*.



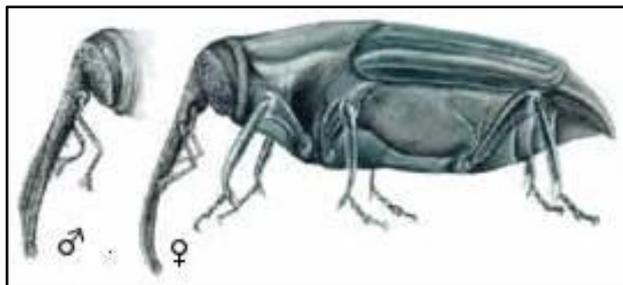
Fonte: Autor, 2014.

As larvas são ápodas e apresentam entre 9 a 12 instares durante o ciclo, que dura entre 42 e 62 dias, possuem coloração branco-creme sendo a cabeça castanho-escura, seu corpo é recurvado e com 13 anéis rugosos, sendo os da porção mediana mais calibrosos que os anteriores e posteriores, o que lhes confere uma morfologia mais afilada nas extremidades e mais volumosa no centro. Durante seu desenvolvimento, as larvas se alimentam ativamente do tecido vegetativo do coqueiro, especialmente na gema apical (palmito), nas inflorescências, no pecíolo das folhas novas e na região mole do estipe, e rapidamente surgem galerias em toda extensão dessa área e consequente destruição dos tecidos que conduzem a seiva, o que pode acarretar a sua morte. Após o seu total desenvolvimento, as larvas utilizam as fibras do tecido vegetal do coqueiro para a produção do casulo que irá protegê-las durante o período de metamorfose, apresentando, geralmente, um comprimento de 9 cm e largura de 3,5 cm (FERREIRA, 2002a; EMBRAPA, 2010, MOLIN & BARRETO, 2012).

Ao final do estágio larval, inicia-se a fase de pré-pupa (4 a 7 dias), onde as larvas já se encontram dentro do casulo e se transformam em pupa, estado em que vão permanecer, aproximadamente, por mais 4 a 16 dias. A pupa sofrerá a etapa final de metamorfose completa dando origem ao inseto adulto, que mesmo depois de formado, ainda se mantém no interior do casulo por cerca de 8 dias, momento em que emerge e pode dar continuidade ao ciclo (OEPP, 2005; EMBRAPA, 2010).

A forma adulta do inseto possui cor característica preto-opaco aveludada, medindo aproximadamente 3,5 a 6 cm de comprimento e 1,5 a 1,8 cm de largura, possui asas anteriores externas endurecidas com oito estrias longitudinais, os élitros, que são relativamente curtos e deixam a parte posterior do abdômen a mostra, apresentam aparelho bucal em forma de rostro, com 1 a 1,2 cm de comprimento, em formato recurvado e muito forte. Apresentam dimorfismo sexual (Figura 3), sendo o macho diferenciável da fêmea por apresentar pêlos rígidos semelhantes a uma escova na face superior da probóscide; já as fêmeas apresentam ausência destes pêlos e rostro ligeiramente mais curto. Vivem entre 27 e 61 dias, sendo que a fêmea tem uma longevidade um pouco menor que o macho. Geralmente são mais ativos durante o dia e são guiados por aromas fermentados que as palmeiras feridas, doentes ou mortas liberam no ambiente (FERREIRA, 2002a; EMBRAPA, 2010).

Figura 3 – Dimorfismo sexual do *Rhynchophorus palmarum*.



Fonte: FERREIRA, 2002b (Adaptado).

Estes coleópteros são predominantemente fitófagos, ou seja, se alimentam de tecido vegetal, estando ele vivo ou morto (MOLIN & BARRETO, 2012). O *R. palmarum* utiliza os tecidos tenros da coroa foliar do coqueiro para sua alimentação, causando danos nesta região e podendo levar a planta a morte (SILVA et al., 2000). A fêmea adulta pode tanto se alimentar, quanto depositar seus ovos na região do meristema apical, local rico em células que promovem o crescimento e desenvolvimento do coqueiro. Estas células são responsáveis também pela síntese dos hormônios auxina e giberelina, essenciais para o bom desenvolvimento da planta (BENETTI & PAGOTTO, 2006).

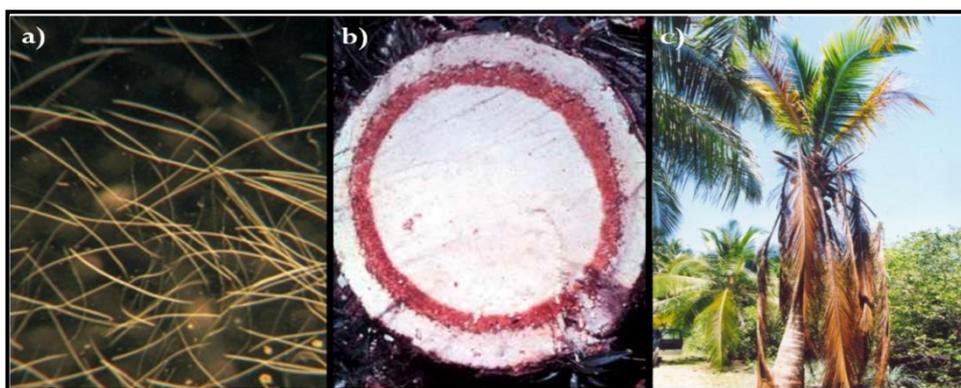
Além do dano físico causado pelo *R. palmarum* ao coqueiro, este pode, ainda, no momento de sua alimentação, se infectar em palmeiras doentes com o nematoide *Bursaphelenchus cocophilus* (Figura 4a) que é o patógeno responsável pela doença-do-anel-vermelho. Os adultos infectados agem como vetor deste nematoide e acabam por disseminar a doença para outras plantas. O anel-vermelho é letal e, quando associado ao dano mecânico causado no estipe, diminui drasticamente a vida útil do espécime, que pode ser levado à morte num período de 3 a 4 meses (FERREIRA, 2002b; AGROLINK, 2014). No Brasil, o *B. cocophilus* foi relatado pela primeira vez em São Paulo, município de Barretos, encontrando-se disseminado nos dias de hoje em praticamente todos os estados produtores de coco (CASTRO et al., 2009).

O mecanismo ação pela qual o *B. cocophilus* acomete o coqueiro é através do seu metabolismo no interior do estipe, mais precisamente na região do floema, situado aproximadamente entre 3 e 5 cm da periferia do tronco (Figura 4b) (CASTRO et al., 2009). O dano causado ao floema impede que a seiva elaborada chegue até a raiz da planta, o que afeta diretamente seu desenvolvimento. A fermentação dos tecidos vegetais resulta na produção de compostos voláteis com odores característicos, que atraem ainda mais coleobrocas para o

local de infecção. O sinergismo entre o feromônio de agregação produzido pelo macho e os compostos fermentados tornam o local da planta um foco reprodutivo para *R. palmarum* (BENETTI & PAGOTTO, 2006).

Coqueiros com 3 a 4 anos já são susceptíveis ao ataque dos coleópteros. Os sintomas perceptíveis de um coqueiro infectado por *B. cocophilus* variam de acordo com a idade, variedade e as condições ambientais no qual a planta está inserida. A copa do coqueiro adquire coloração amarelo-ouro quase que totalmente, excetuando-se a parte central, que mesmo continuando com coloração esverdeada (Figura 4c), tem sua estrutura enfraquecida, ocorrendo a quebra, indicando a morte da planta (CASTRO et al., 2009).

Figura 4 – a) *Bursaphelenchus cocophilus*; b) anel vermelho; c) coqueiro acometido.



Fontes: CASTRO et al., 2009; Agrolink, 2014 (Adaptado).

2.2.1 Formas de controle de pragas

As características climáticas do Brasil são bastante diversificadas e acarretam no surgimento de microrregiões climáticas, fenômeno ideal para o estabelecimento de pragas de forma endêmica em diversos agrossistemas. Estes se constituem de ecossistemas modificados com a finalidade de possibilitar a produção de alimentos ou de qualquer outra matéria-prima que possua valor agregado para agroindústrias alimentícias, cosméticas, têxteis, farmacêuticas, mobiliárias e de construção civil (LOIOLA, 2009). A prevalência e a disseminação de qualquer espécie em determinado ecossistema, estão intimamente ligadas à ocorrência ativa de seus antagonistas naturais (patógenos, predadores e parasitoides). Em ecossistemas naturais, esta relação tende a ser muito mais ativa, controlando os níveis

populacionais das espécies. Fato que ocorre em menor intensidade quando se trata de agrossistemas, resultando em desequilíbrio e consequente estabelecimento de pragas que constituem risco eminente às lavouras ali implantadas. Corroborando com esta situação, está o uso indiscriminado de agrotóxicos, utilizados pelo homem numa tentativa súbita de controlar a proliferação de pragas (FERREIRA, 2002a).

O desenvolvimento de qualquer unidade produtiva é dependente de técnicas pré-cultivo como o equilíbrio da adubação, correto manejo do solo, rotação de culturas, entre outros. Estas práticas fazem parte do controle natural, que ajudam a minimizar o surgimento de pragas. Contudo, outras estratégias surgem principalmente como táticas pós-cultivo no MIP, que consiste na combinação de diversas formas de controle, dentre eles: químico, comportamental e biológico (EMBRAPA, 2005).

Apesar de serem reconhecidas como principais pragas do coqueiro há vários anos, métodos eficazes e aceitáveis no controle das coleobrocas de *R. palmarum* ainda não são totalmente eficazes. A ecologia química deste inseto-praga tem sido estudada com o objetivo de encontrar métodos alternativos aos agrotóxicos (SAÏD et al., 2003).

O enfrentamento de problemas causados pela infestação de lavouras por insetos-praga é um grande desafio para os produtores, principalmente em culturas onde há predomínio da variedade gigante. A falta de opções no mercado de produtos registrados eficientes para o tipo cultura em questão, somada ao elevado porte que estas espécies atingem, dificultam a aplicação de qualquer tipo de produto na copa do coqueiro e limitam as possibilidades de manutenção da lavoura (FERREIRA, 2002a).

2.2.1.1 Controle químico

Produtos fitossanitários, pesticidas, defensivos agrícolas, agroquímicos ou mais comumente, agrotóxicos, são produtos químicos utilizados nas lavouras com o intuito de controlar o número de pragas nocivas à cultura. Geralmente são aplicados por meio de técnicas como a pulverização, a fumigação, o pincelamento e a nebulização, dentre outros (EMBRAPA, 2005).

O controle químico ainda é uma das formas de controle mais utilizadas para o tratamento das lavouras, geralmente fazendo-se uso de inseticidas de amplo espectro e que

acarretam problemas agroecológicos (FERREIRA, 2002a). O termo inseticida é utilizado de forma geral para designar produtos que tenham por objetivo a morte, controle ou inibição do desenvolvimento de organismos-praga em um agrossistema. São produtos que possuem mecanismos de ação diversos, mas que atuam genericamente mediando interferências em processos essenciais à vida da espécie-praga, a exemplo os processos respiratórios, alimentares, reprodutivos e de crescimento e desenvolvimento (COUTINHO et al., 2010).

Uma estratégia que vem sendo utilizada e que pode minimizar os problemas associados ao uso de produtos químicos, é a substituição dos agrotóxicos convencionais por produtos de origem vegetal, geralmente derivados de extratos vegetais com ação inseticida relatada. No entanto, geralmente são produzidos e utilizados com base no conhecimento popular, o que torna necessária comprovação científica da sua eficácia para que seja empregado nos programas de MIP (PICANÇO, 2010).

Na atualidade, produtos com maior especificidade e que causam menos impactos negativos ao meio ambiente estão aparecendo como substitutos dos agrotóxicos de amplo espectro. Além disso, em muitos casos a utilização nem sempre se faz necessária, bastando a aplicação de práticas culturais ou mesmo métodos alternativos e biológicos (EMBRAPA, 2005). Não existe inseticida químico específico para *R. palmarum* registrado no sistema Agrofit (AGROFIT, 2014). Alguns agrotóxicos têm sido investigados com o objetivo de avaliar o efeito deletério a esta coleobroca, inclusive em associação com agentes de controle biológico, tanto para testar uma possível compatibilidade quanto o aumento da virulência nos insetos (ALMEIDA et al., 2010).

2.2.1.2 Controle comportamental

O controle comportamental baseia-se essencialmente na aplicação de semioquímicos, que são substâncias químicas utilizadas em diversos tipos de comunicação entre seres vivos de espécies diferentes, denominados aleloquímicos, ou entre indivíduos de uma mesma espécie, os chamados feromônios (PICANÇO, 2010). É uma estratégia que possibilita o manejo de agrossistemas, diminuindo-se, ou até mesmo evitando-se, o uso de agrotóxicos, reduzindo os riscos ao meio ambiente, aos trabalhadores do campo e aos consumidores finais.

Os sistemas de interação entre indivíduos do gênero *Rhynchophorus* estão intimamente relacionados à produção de hormônios, como os kairomones, produzidos pelas

plantas, e os próprios feromônios produzidos pelos insetos. Tanto os tecidos vegetais doentes ou com feridas, quanto outros tipos de cultura, como a do mamão, da cana ou do abacaxi, que apresentam capacidade fermentativa, exalam produtos voláteis no ambiente que agem como atrativos para insetos adultos (FERREIRA, 2002a). A redução das populações de *R. palmarum* por meio da utilização de armadilhas atrativas contendo o feromônio sintético de agregação associado a algum alimento vegetal fermentativo que sirva como isca para o inseto, é um método eficiente de captura e ajuda a reduzir os danos causados por esta coleobroca. O feromônio sintético de agregação é o Rincoforol, que possui a mesma ação do feromônio natural produzido pelo macho da espécie (FERREIRA, 2007). O rincoforol é o único produto registrado no Agrofite para ser utilizado no controle desta coleobroca. Ele está disponível em 3 apresentações comerciais, classificadas toxicológica e ambientalmente como pouco tóxicas (classe IV) e pouco perigosas ao meio ambiente (classe IV), como pode ser conferido pela tabela 3 (AGROFIT, 2014).

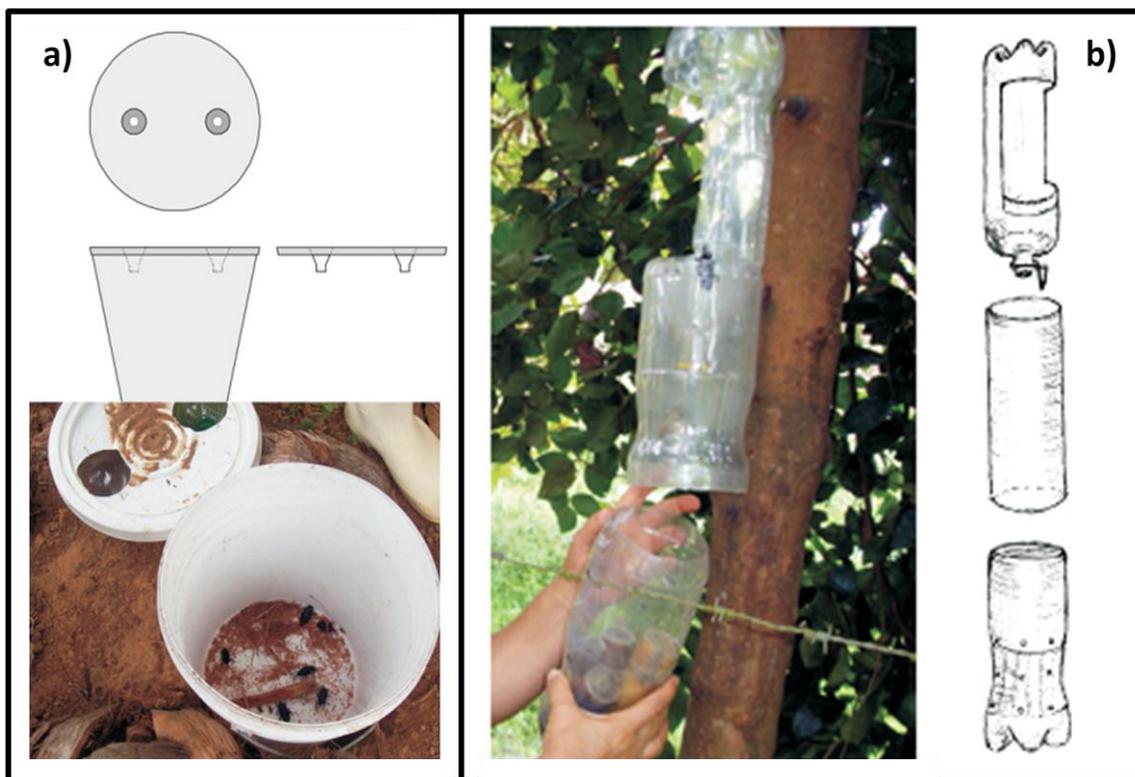
Tabela 3 – Produtos registrados no Agrofite para controle comportamental de *R. palmarum*.

Produto	Ingrediente Ativo (grupo químico)	Titular de Registro	Formulação	Classificação	
				Toxicológica	Ambiental
Bio Rhinchoforus	Rincoforol (álcool alifático)	Bio Controle – Métodos de controle de pragas LTDA	GE – gerador de gás	IV	IV
Rincoforol	Rincoforol (álcool alifático)	Interacta Química LTDA	LI - Líquido	IV	IV
RMD-1	Rincoforol (álcool alifático)	Bio Controle – Métodos de controle de pragas LTDA	GE – gerador de gás	IV	IV

Fonte: Agrofite, 2014 (Adaptado).

As armadilhas geralmente utilizam estes mecanismos para a captura, elas são feitas na maioria das vezes com auxílio de um balde com tampa, que funciona como alçapão (Figura 5a). A tampa possui um furo central que serve para entrada do inseto e para a liberação dos odores liberados pelo feromônio e pelo material fermentado ali presente, dentre eles o mais utilizado é a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) (DUARTE et al., 2003; EMBRAPA, 2010). Um modelo alternativo foi desenvolvido pela Embrapa Tabuleiros Costeiros de Aracaju – SE. A armadilha consiste de garrafas de politereftalato de etileno (PET) que apresentam o mesmo fundamento das armadilhas tipo balde (Figura 5b) (FERREIRA, 2007).

Figura 5 – Esquema de armadilhas tipo alçapão: a) balde; b) garrafa PET.



Fonte: FERREIRA, 2007; CASTRO et al., 2009; (Adaptado).

2.2.1.3 Controle biológico

O controle biológico consiste em um sistema que visa à manutenção ou elevação do número de indivíduos antagonistas naturais das espécies consideradas pragas, ou seja, seus fatores de mortalidade. O MIP utiliza informações técnicas, ecológicas, econômicas e sociológicas para planejamento de métodos integrados de controle e o biológico constitui um deles (PICANÇO, 2010).

Observa-se nos dias atuais uma crescente conscientização entre agricultores e gestores públicos a respeito de métodos ecologicamente sustentáveis de manejo de pragas (RANASINGH, 2007). O MAPA incentiva cada vez mais o uso de inseticidas biológicos, também chamados de biopesticidas ou bioinseticidas, no combate às pragas nas lavouras. O Agrofit não tem registro de nenhum bioinseticida contra *R. palmarum* (AGROFIT, 2014).

O conceito ecologicamente sustentável surgiu na década de 50, tendo como fundamento alternativas diversificadas de estratégia de controle de pragas. A aplicação de entomopatógenos para controle biológico define-se como a utilização de bactérias, vírus,

nematóides, protozoários e fungos no manejo de insetos considerados pragas. O mecanismo de ação das bactérias depende geralmente da ingestão por parte do inseto, havendo liberação de toxinas no trato digestivo que podem ocasionar sua morte. O gênero *Bacillus* é o principal grupo de bactérias utilizadas como entomopatógenos (FERREIRA, 2002a). A ingestão também é a principal rota de infecção de insetos por vírus, havendo penetração das células do intestino médio e consequente propagação. Espécies do grupo baculovirus são os vírus mais comumente e utilizados e estudados, por apresentarem grande potencial de aplicação no controle biológico (VALICENTE et al., 1998). O uso de nematóides é feito quase que exclusivamente no controle de pragas presentes no solo, geralmente relacionados à agricultura, contudo, estudos desta aplicação em outras áreas vêm acontecendo nos últimos anos. O uso de protozoários é mais limitado ainda, pois poucas espécies apresentam grau de virulência alto ou ação rápida sobre insetos. Eles geralmente provocam uma infecção crônica e que acarreta debilidade e morte lenta do hospedeiro (FERREIRA, 2002a). Em contrapartida, os fungos são os entomopatógenos mais versáteis no MIP, principalmente devido à diversidade de mecanismos de ação que possuem e também pela capacidade de infectar diversos tipos de inseto, frequentemente causando epizootias, que se caracteriza pelo contágio rápido de diversas espécies, ao mesmo tempo e em uma mesma região (ALVES et al., 2008).

2.2.2 Fungos Entomopatogênicos

Fungos entomopatogênicos são organismos capazes de parasitar insetos, podendo infectar um grande número de pragas, inclusive que apresentam importância socioeconômica (GÜERRI-AGULLÓ et al., 2010). São bastante utilizados na produção de bioinseticidas, pois, como muitos outros princípios ativos de inseticidas químicos, agem por contato com o tegumento (cutícula) da praga alvo. Os testes iniciais de infectividade de fungos entomopatogênicos datam do século XIX, quando o russo Metschnikoff testou a atividade do fungo *Metarhizium anisopliae* contra besouros. Resultados práticos só foram observados cerca de um século após o início dos experimentos, sendo comum nos dias de hoje a utilização destes micoinseticidas (FARIA & MAGALHÃES, 2001).

Após a colonização da cutícula, os fungos penetram no corpo do inseto e se multiplicam muito rápido, disseminando-se por todo corpo, o que resulta em destruição tecidual e morte (FERREIRA, 2002a). A utilização de fungos entomopatogênicos como

agentes de controle biológico vem aumentando enormemente nos últimos anos, este fenômeno vem sendo impulsionado pelas inúmeras descobertas e elucidações dos mecanismos de ação envolvidos. Dentre os principais fungos entomopatogênicos estudados, destaca-se a espécie *Beauveria bassiana* (PICANÇO, 2010).

2.2.2.1 *Beauveria bassiana*

É um fungo da ordem *Hypocreales*, família *Cordycipitaceae*. Seu nome é derivado de seu descobridor, o italiano Agostino Bassi, entomologista que associou, no ano de 1835, uma doença do bicho-da-seda à infecção por *B. bassiana*. É um fungo patógeno de coleópteros e um importante agente de controle biológico utilizado no MIP (GÜERRI-AGULLÓ et al., 2010). É uma espécie capaz de infectar uma ampla gama de hospedeiros de insetos (Tabelas 4 e 5) e vários produtos biopesticidas têm sido desenvolvidos para utilização na horticultura e agricultura (BARBARIN et al., 2012). A principal forma de infecção de coleópteros por *B. bassiana* é o contato com a cutícula do inseto, possibilitando a adesão e consequente penetração através de processos enzimáticos de degradação cuticular e também por ação mecânica, que ocorrem aproximadamente após 12 horas da exposição (BORGES, 2007).

A Embrapa Tabuleiros Costeiros do estado de Sergipe, vem estudando o fungo *B. bassiana* e sua atividade contra a coleobroca de *R. palmarum* desde 1991, a partir da descoberta do fungo pela pesquisadora Joana Maria Santos Ferreira, quando adultos parasitados foram identificados em culturas de coqueiro do estado. Desde então, estudos laboratoriais e de campo têm sido realizados com o objetivo de viabilizar a aplicação da cepa denominada CPATC032 como bioativo no MIP.

Tabela 4 – Pragas agrícolas susceptíveis a *B. bassiana* e principais culturas afetadas.

Praga agrícola	Nome científico	Principal Cultura	Referência
Escaravelho-vermelho	<i>Rhynchophorus ferrugineus</i>	Palmeiras	GÜERRI-AGULLÓ et al., 2010 DEMBILIO et al., 2010
Broca-do-coqueiro	<i>Rhynchophorus palmarum</i>	Coqueiro	FERREIRA, 2002b
Traça-do-amendoim	<i>Aproaerema modicella</i>	Amendoim	SENTHILRAJA et al., 2010
Broca-maior-dos-cereais	<i>Prostephanus truncatus</i>	Cereais	SMITH et al., 1999
Broca-do-café	<i>Hypothenemus hampei</i>	Café	ANTIA et al., 1992 JIMENEZ et al., 1989 VARELA & MORALES, 1996
Percevejo-da-planta manchada	<i>Lygus lineolaris</i>	Algodão	UGINE, 2011
Besouro-da-ambrósia	<i>Xylosandrus germanus</i>	Coníferas	CASTRILLO et al., 2011
Formiga-de-fogo	<i>Solenopsis invicta</i>	Quiabo, milho, soja, batata e amendoim	BEXTINE & THORVILSON, 2002
Broca-do-tronco	<i>Apriona germari</i>	Amora	LI et al., 2011

Fonte: Autor, 2014.

Tabela 5 – Pragas domésticas susceptíveis a *B. bassiana*.

Praga doméstica	Nome científico	Principal Cultura	Referência
Percevejo-da-cama	<i>Cimex lectularius</i>	Ser humano (hematófago)	BARBARIN et al., 2012
Pernilongo	<i>Culex tarsalis</i>	Ser humano (hematófago)	CLARK et al., 1968
Mosca tsé-tsé	<i>Glossina morsitans morsitans</i>	Ser humano (hematófago)	KAAYA et al., 1991
Barbeiro	<i>Rhodnius prolixus</i>	Ser humano (hematófago)	ROMANÁ & FARGUES, 1992
Mosquito comum	<i>Culex pipiens</i>	Aves domésticas e selvagens (hematófago)	SIERRA et al., 1995
Mosquito-da-dengue	<i>Aedes aegypti</i>	Ser humano (hematófago)	SIERRA et al., 1995
Mosquito-palha	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Ser humano (hematófago)	WARBURG et al., 1991 AMÓRA et al., 2009
Mosca-doméstica	<i>Musca domestica</i>	Ser humano (matéria orgânica)	MISHRA et al., 2013

Fonte: Autor, 2014.

Machos de *R. palmarum* foram inoculados com suspensões contendo 10^9 conídios por mililitro (con/mL) em experimentos realizados pela Embrapa. Os indivíduos foram então liberados quinzenalmente em um período de 3 anos, resultando em uma diminuição de 58, 38 e 69% da população nativa da praga, respectivamente no primeiro, segundo e terceiro ano. Estes números indicaram que os machos são bons transmissores do parasita a outros

indivíduos, visto que houve uma menor redução no número de indivíduos (23 e 19%) no período pós-liberação (FERREIRA, 2002b). Adultos parasitados por CPATC032 são mostrados na figura 6.

Figura 6 – Adultos de *R. palmarum* parasitados pelo fungo *B. bassiana*.



Fonte: FERREIRA, 2002b.

Um estudo realizado por Güerri-Agulló et al. (2010) utilizando suspensões conídios fúngicos em diferentes concentrações contra coleobrocas do gênero *Rhynchophorus*, constatou através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) o início da multiplicação dos conídios na cutícula do inseto a partir do segundo dia de inoculação, surgindo sinais de infecção no terceiro dia. A capacidade de adesão à cutícula foi atribuída a formação de estruturas denominadas apressórios, que também são responsáveis pelo início do processo de penetração, juntamente com processos de anastomose das hifas, onde há formação de mucilagens que facilitam a penetração. Também foi relatado que estruturas mais delgadas ou regiões com sulcos ou espículas são mais propícias à penetração (GÜERRI-AGULLÓ et al. 2010). Outra hipótese que tem sido levantada é que a adesão pode ser promovida pela diminuição de forças eletrostáticas da cutícula do inseto pela presença de íons divalentes, como Ca^{+2} e Mg^{+2} , o que favoreceria a penetração do fungo. A alta umidade também favorece a germinação miceliana através de hidratos de carbono que estão presentes na cutícula (LAZO, 2012).

Bioinseticidas à base de *B. bassiana* já são amplamente utilizados no controle microbiano, mas os conídios fúngicos são muito sensíveis a fatores externos (abióticos), como calor, radiação, umidade, variações de pH (ALVES et al., 2008). A germinação dos conídios é bastante influenciada pela temperatura, uma faixa entre 20 e 30°C é o ideal para esta espécie. Condição que também influencia os níveis de esporulação e crescimento vegetativo desta espécie e regula seus processos fisiológicos, sendo assim, diretamente relacionados com a sua capacidade infectante (CONSTANSKI et al., 2011).

2.2.3 Formulações bioinseticidas

Os métodos produtivos de fungos entomopatogênicos que foram criados em meados do século passado começaram a ser comercializados no Brasil nos anos 60. As técnicas de obtenção são baseadas na utilização de cereais, como o arroz, agindo como substrato para o crescimento fúngico, onde ocorre fermentação bifásica após a inoculação por um fermentado inicialmente produzido em meio líquido. Os conídios colonizam toda massa do arroz, podendo ser vendidos desta forma, sendo necessária uma pré-lavagem no momento da utilização para a retirada dos esporos; ou esta mistura pode ser triturada e vendida sob a forma de pó-molhável. A grande maioria dos produtos utilizados no campo é proveniente de produção artesanal, por associações de produtores ou em centros de pesquisa federais, sendo a qualidade do fungo obtido muito variável (ALVES et al., 2008).

A falta de praticidade dos produtos à base de fungos entomopatogênicos disponíveis no mercado brasileiro, associada a sua reduzida vida de prateleira, que chega a um máximo de 30 dias, dificultam a comercialização e restringem o potencial destes agentes microbiológicos no MIP. A necessidade de pré-lavagem no momento da aplicação, a possibilidade de entupimento dos equipamentos pulverizadores pela presença elevada de material inerte e pequena sobrevivência dos esporos neste material, revelam a urgente necessidade de modernização desta prática, através de formulações que possibilitem contornar estes problemas (FARIA & MAGALHÃES, 2001). No entanto, a formulação de bioinseticidas é complexa, porque a natureza biológica dos agentes pode ser afetada por substâncias normalmente utilizadas na formulação de produtos biopesticidas. Os agentes microbianos podem sofrer perda de viabilidade durante o armazenamento e após a sua aplicação no ambiente. Ambos os fatores bióticos e abióticos são responsáveis pelas perdas na atividade de

vários agentes de controle microbiano. A formulação é um passo crucial no desenvolvimento de pesticidas microbianos (ALVES et al., 1996).

A disseminação do controle microbiano em agrossistemas é favorecida pela facilidade de implementação da prática, visto que, são sistemas de custo reduzido e de processos relativamente simples. No entanto, a inserção de produtos formulados no mercado encontra alguns desafios, já que existe certa resistência por parte das empresas do setor, bem como a carência de informação acerca dos benefícios propiciados pelos produtos formulados, que apresentam alto nível tecnológico e maior eficiência. A insegurança dos empresários que comercializam fungos entomopatogênicos com relação a adesão dos produtores a novas tecnologias, inibe o investimento em modernização e aquisição de novos equipamentos e mão-de-obra especializada (ALMEIDA et al., 2008). De acordo com Batista Filho (1998), produtos que contenham princípios ativos utilizados no controle microbiano de pragas devem propiciar facilidade de aplicação, liberação do agente de forma satisfatória e apropriada e proporcionar alta eficiência da formulação, sendo, adicionalmente, de baixo custo.

Foi relatado por Alves (2003), que a produção de uma formulação bioinseticida abrange ou requer ensaios que atestem: a possibilidade de estocagem do produto em prateleiras, inclusive com a possibilidade de armazenamento a temperatura ambiente; a utilização de compostos compatíveis com o agente ativo; o melhoramento da capacidade de adesão/espalhamento na superfície da carpaça dos insetos ou mesmo sobre as regiões hidrofóbicas dos tecidos vegetais; a potencialização da eficiência do micoinseticida quando em comparação a um produto anterior; a concentração ideal dos formulantes, evidenciada por meio de testes com proporções diferentes destes e a facilidade na aplicação do produto por parte do produtor (ALVES, 2003).

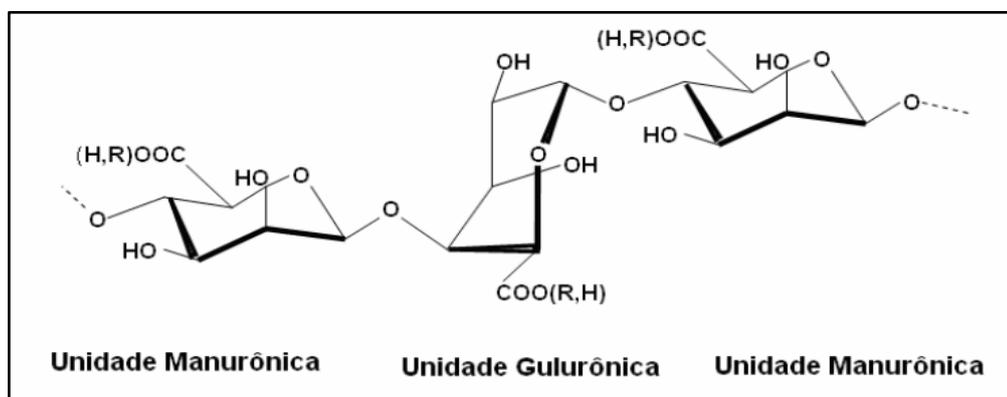
A encapsulação de princípios ativos surge como uma boa estratégia, a fim de protegê-lo de fatores deletérios, mantendo suas principais características (ALVES, 1998). Além disto, pode vir a garantir maior aderência do produto no inseto e/ou no coqueiro, proporcionando maior eficácia na aplicação e maior estabilidade para que possa ser armazenado por um tempo maior (ALVES, 2003). A encapsulação de bioativos utilizados como agentes de controle biológico em matrizes poliméricas é uma prática que agrega valor ao ativo. Formulações deste tipo apresentam propriedades superiores a de produtos não formulados e são de essencial importância na manutenção da viabilidade dos microrganismos. Neste sentido, os polímeros vêm ganhando cada vez mais destaque no meio científico (WU et al., 2012).

Os agentes poliméricos mais utilizados como matrizes hidrofílicas são: polímeros do ácido acrílico (a exemplo dos carbômeros); polímeros derivados da celulose (a exemplo da hidroxi-propilmetilcelulose) e os não-celulósicos, naturais ou semi-sintéticos (gomas, ágar-ágar, quitosana e alginatos) (BURI & DOELKER, 1980).

2.2.4 Alginato

O alginato é um polissacarídeo de origem natural extraído da parede celular de várias espécies de algas pertencentes à família *Phaeophyceae* (algas marrons). O alginato de sódio se apresenta como polímero glicuronano linear, de caráter aniônico e que possui em sua estrutura unidades monoméricas de β -D-manuronila e α -L-guluronila ligadas através de ligações glicosídicas (1-4), organizadas em blocos ao longo da cadeia (Figura 7) (SILVA et al., 2010; KAMINSKI et al., 2010). Geralmente apresentam boa solubilidade em água, formando gel ou então uma solução coloidal bastante viscosa. Possuem a capacidade de melhorar as características reológicas de formulações, agindo, a depender das condições, como agente tixotrópico, provocando bastante interesse como excipiente na área farmacêutica (LEONE & BARBUCCI, 2009). Dependendo das espécies e das partes da alga marinha utilizada na produção, a composição do alginato será determinada, contudo, outros parâmetros, como o peso molecular e o tipo de sal, podem ser definidos no processamento (CABALLERO, 2014).

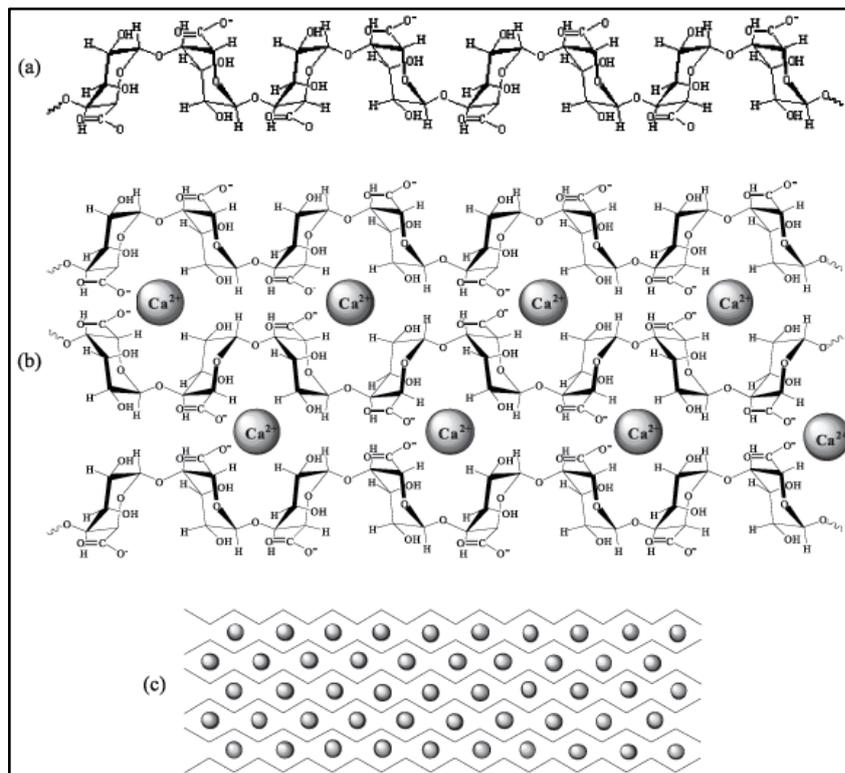
Figura 7 – Unidades monoméricas do alginato.



Fonte: Bressel, 2007.

A sequência dos monômeros e o peso molecular são importantes fatores determinantes das propriedades físicas do gel formado. Uma das propriedades que fazem o alginato bastante útil, principalmente na área farmacêutica, é sua capacidade de formar géis termoestáveis de forma bastante simples, através da troca de íons de sódio do monômero α -L-gulurônico com cátions divalentes, tais como Ca^{2+} (Figura 8), Ba^{2+} , Sr^{2+} , Zn^{2+} , reação chamada de gelificação ionotrópica. Os cátions ficam aprisionados em cavidades eletronegativas, formando redes tridimensionais complexas denominadas *egg-box*.

Figura 8 – Formação do alginato de cálcio: a) homopolímeros de ácido gulurônico em solução. b) Ligação do cálcio. c) cadeias poliméricas.



Fonte: Kawaguti & Sato, 2008.

Diversos estudos utilizaram o alginato como matriz na encapsulação de princípios ativos. De Jaeger et al. (2011), preparou *beads* contendo *Trichoderma harzianum* e *Glomus* sp. visando testar a compatibilidade e aplicabilidade deste complexo e os impactos no ciclo de vida do fungo *Micorriza arbuscular*, importante para raízes de plantas absorverem nutrientes. Resultados positivos de compatibilidade e de crescimento foram obtidos. O fungo *Trametes*

versicolor também foi encapsulado da mesma forma por Arica et al. (2001), que encontrou resultados positivos como agente de biossorção e remoção de íons de cádmio de meios aquosos. Outro fungo encapsulado com sucesso em *beads* de alginato foi o *Saccharomyces cerevisiae*, estudo que resultou em aumento do rendimento de produção de etanol de 88 para 100% utilizando-se o microrganismo imobilizado (LEE et al., 2011). Estudos recentes atestaram a capacidade do alginato em modificar o perfil de liberação de ibuprofeno quando encapsulado em *beads* com diferentes proporções do polímero, gerando gastrorresistência da formulação e retardo na liberação do fármaco (CABALLERO et al., 2014).

O processo simples de gelificação resulta numa matriz com característica hidrofílica e inerte (JAN, 2002). No entanto, a matriz possui resistência mecânica relativamente baixa e é altamente porosa, o que pode resultar em índices altos de difusão dos princípios ativos incorporados na estrutura e, a depender do objetivo da encapsulação, pode representar um problema. Adicionalmente, os íons de cálcio que são responsáveis pela reticulação das cadeias poliméricas, podem ser removidos na presença de íons monovalentes, desestabilizando e rompendo o hidrogel (WU et al., 2012). Assim, a associação do alginato a outros materiais (cargas) pode culminar no melhoramento de suas propriedades, ampliando sua aplicabilidade.

2.2.5 Nanocompósitos poliméricos

Quando se utiliza apenas o termo nanocompósito polimérico, sem referenciar um material em particular, geralmente refere-se a combinações de um polímero qualquer, com algum outro material que apresente em sua constituição ao menos uma de suas dimensões na escala nanométrica. A dispersão do último no constituinte polimérico leva à formação de um material distinto, um híbrido, com duas fases características inter-relacionadas (WANG, 2001; PAIVA & MORALES, 2006). Diversos setores industriais têm dedicado enorme atenção a estes sistemas híbridos, destacando-se a indústria farmacêutica, com vários estudos de liberação controlada de princípios ativos e com vários produtos já disponíveis no mercado. Dentre as vantagens geralmente agregadas a este tipo de material estão: estabilidades física, biológica, química e mecânica aprimoradas em relação aos seus constituintes isolados, e preparação relativamente simples e reprodutível (SILVA et al., 2010).

Nanocompósitos poliméricos que apresentam em sua composição polímeros hidrofílicos, a exemplo dos alginatos, possuem grande capacidade de captação de água. O comportamento de inchamento (“swelling”) pode ser explicado pela tendência do material em absorver água com o objetivo de preencher os espaços vazios que permanecem desidratados em sua rede polimérica. O fenômeno é mantido por diferenças de pressão osmótica, que resultam em relaxamento da estrutura polimérica do nanocompósito até o momento em que se alcança equilíbrio dinâmico. Sistemas matriciais, ao entrarem em contato com meios de dissolução, podem apresentar capacidade de captação de água alterada, tanto por mudanças na taxa de difusão, quanto por modificações do arcabouço estrutural do nanocompósito (CAVALCANTI et al., 2002; GROVER et al., 2012).

2.2.5.1 Nanocompósitos polímero – silicato lamelar

O termo nanocompósitos polímero – silicato lamelar é derivado do inglês *polymer-layered silicate nanocomposite* (PLN), que se refere aos nanocompósitos que apresentam em sua composição argilas filossilicatadas associadas a uma matriz polimérica. A lamela se apresenta como a unidade nanométrica destas argilas, apresentando diâmetro médio variando entre 100 a 200 nm e espessura de aproximadamente 1 nm. Íons intercalados nestas lamelas resultam na formação de grandes agregados irregulares que apresentam diâmetro variando entre 0,1 e 10 µm. Aglomerados de argilas possuem de cinco a dez lamelas associadas e são responsáveis pela formação da sua estrutura estratificada (ALEXANDRE & DUBOIS 2000; RAY & BOUSMINA, 2005). A inserção de espécies hóspedes móveis em uma estrutura cristalina hospedeira é designada como intercalação, e ocorre dependentemente do hospedeiro possuir sítios livres para a acomodação do hóspede. O complexo formado apresenta-se como um sistema nanoestruturado capaz de carrear moléculas bioativas (KEVADIYA et al, 2009; YUXIN et al., 2012).

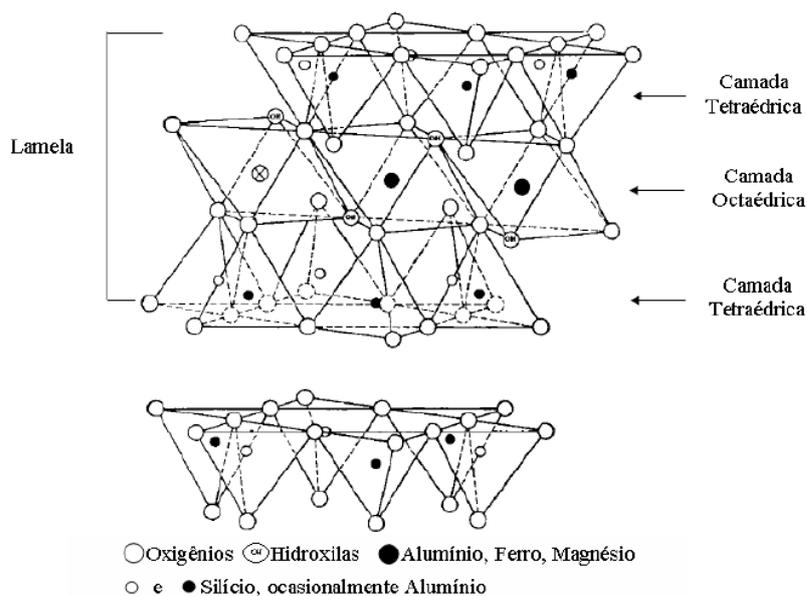
Em termos gerais, as argilas podem ser classicamente definidas como material terroso, natural, de fina granulação e de relativa plasticidade quando hidratadas. As argilas esmectíticas (a exemplo da bentonita) estão entre os compostos inorgânicos de maior aplicabilidade na produção de nanocompósitos (ANADÃO et al., 2011).

2.2.6 Bentonita

A bentonita é proveniente de processos de desvitrificação de cinzas vulcânicas (MENEZES et al., 2009). Tem recebido considerável atenção nos últimos anos no campo da agricultura como um carreador de pesticidas, drogas e fertilizantes, devido ao seu alto poder adsorvivo e inocuidade em relação ao meio ambiente e animais (YUXIN et al., 2012). A montmorilonita (MMT), seu constituinte majoritário, é um material inorgânico promissor como composto hospedeiro. As lamelas são formadas a partir de átomos de silício tetraedricamente coordenados fundidos em um plano comum octaédrico de alumínio (Al^{3+}) e magnésio (Mg^{2+}). Não é apenas inofensiva, mas também muito estável frente a diferentes pHs (KEVADIYA et al., 2009).

Uma representação geral destas argilas está ilustrada na figura 9. A nomenclatura dos tipos de lamelas (camadas) das argilas é dada pela relação entre as folhas tetraédricas e octaédricas das argilas. Desta forma, argilominerais que possuem em sua estrutura uma folha tetraédrica e uma octaédrica, apresentam relação 1:1, da mesma forma, nas que existem duas folhas tetraédricas externas a uma octaédrica são denominadas do tipo 2:1 (NEUMANN et al., 2000).

Figura 9 – Diagrama esquemático geral das argilas tipo esmectita.



Fonte: Neumann et al., 2002 (Adaptado).

Átomos de sílica (Si^{4+}) presentes nas camadas tetraédricas são passíveis de troca por átomos de Al^{3+} , causando distorção nas folhas dos argilominerais, que são consequência da alta carga negativa gerada nas lamelas. Tais substituições são chamadas de isomórficas e propiciam elevado grau de possibilidade de troca catiônica, já que existem entre as lamelas cátions intercambiáveis. Esta capacidade de troca é considerada uma propriedade marcante das argilas e, a partir daí, compostos de intercalação podem ser gerados (ROSETO et al., 2009).

A bentonita tem sido incorporada com sucesso em formulações para encapsulamento de diversos tipos de compostos ativos. Controle de liberação de herbicidas foi alcançado com a utilização de *beads* compostos de alginato e bentonita por Fernández-Péres et al. (2000) e por Céspedes et al. (2013), ressaltando a capacidade de ocorrência de um relativo efeito de barreira deste argilomineral em associação com o biopolímero. A remoção de contaminantes de meios aquosos também tem sido alvo de compósitos deste tipo. Swawky (2010) conseguiu verificar potencialização da adsorção de chumbo de águas fluviais que recebem resíduos de industriais. Mais recentemente, Tan & Ting (2014) relataram a eficácia de *beads* alginato/bentonita na remoção de cobre de águas residuais de indústrias e de agrotóxicos. Kevadiya et al. (2009), intercalou as vitaminas tiamina (B_1) e piridoxina (B_6), comparando as formulações compostas somente do polímero com outras formadas pelo nanocompósito polímero silicatado. Os resultados também demonstraram controle de liberação destas vitaminas.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver formulações tipo *beads* do nanocompósito polimérico alginato/bentonita como matriz para conídios *Beauveria bassiana*.

3.2 Objetivos Específicos

- Preparar *beads* de alginato/bentonita;

- Testar concentrações variáveis de bentonita;
- Testar concentrações variáveis de conídios;
- Caracterizar o produto formulado;
- Determinar a distribuição dos conídios no interior dos *beads*;
- Avaliar a liberação *in vitro* dos conídios intercalados;
- Estudar a morfologia dos *beads*;
- Investigar a estabilidade das formulações frente a temperaturas diferentes;
- Definir o custo de produção do produto final.

4 MATERIAL E MÉTODOS

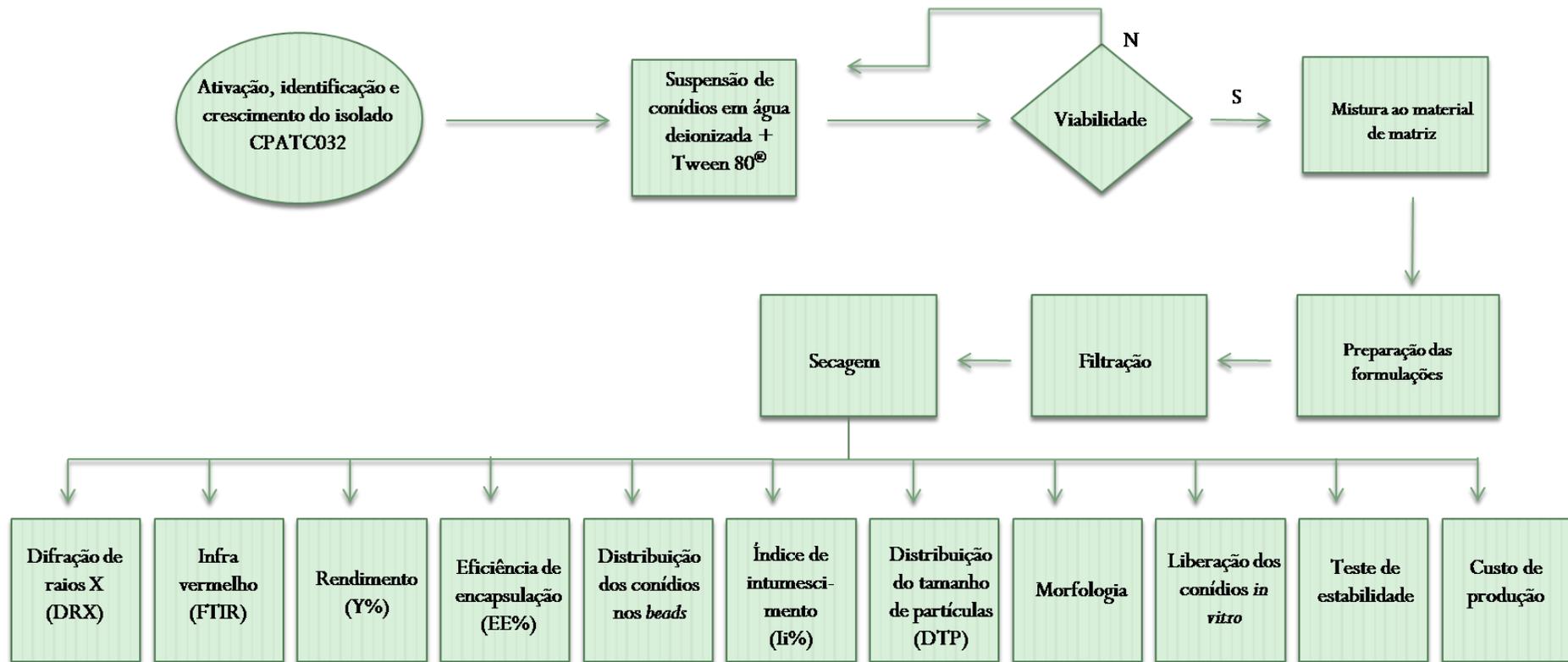
4.1 Material

Alginato de sódio (Sigma-Aldrich, Alemanha), bentonita sódica (Bentec Laviosa Chimica Mineraria S.p.A., Itália) e cloreto de cálcio (CaCl_2) (Vetec, Brasil), foram adquiridos comercialmente e utilizados na preparação das formulações. O isolado de conídios de *Beauveria bassiana*, cepa CPATC032 foi gentilmente cedido pela Embrapa Tabuleiros Costeiros e usado como agente bioativo das formulações. O meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar – BDA (Himedia, Índia) foi utilizado como substrato para crescimento fúngico. O agente tensoativo não-iônico Tween 80[®] (Sigma-Aldrich, Alemanha) foi adquirido comercialmente e utilizado como espalhante adesivo para preparo das suspensões fúngicas.

4.2 Métodos

Os métodos utilizados estão apresentados na figura 10 e são descritos a seguir.

Figura 10 – Fluxograma com as etapas da metodologia.



Fonte: Autor, 2014.

4.2.1 Microrganismo e meio de cultura

Colônias puras de *B.bassiana* foram obtidas através de semeio da cepa CPATC032 em placas tipo Petri contendo meio de cultura BDA (LI et al., 2011). As placas foram mantidas em estufa (Solab, Brasil) a 28°C(±1°C) e fotofase de 12 horas por um período de 14 dias (ALVES et al., 1996). Após este período de ativação, suspensões foram preparadas através de inoculação de raspados das colônias em água destilada contendo Tween 80[®] a 0,02% como espalhante adesivo (GÜERRI-AGULLÓ et al, 2010). Estas suspensões foram filtradas em gaze estéril para retirada das demais estruturas fúngicas, como hifas, conidióforos e fiáides (ALVES et al., 1996). A determinação da concentração dos conídios na biomassa foi realizada através de contagem em câmara de Neubauer (Hemacitômetro) (New Optik, Brasil) em microscópio óptico (MetrimpaxHungary/PZO-Labimex, Polônia).

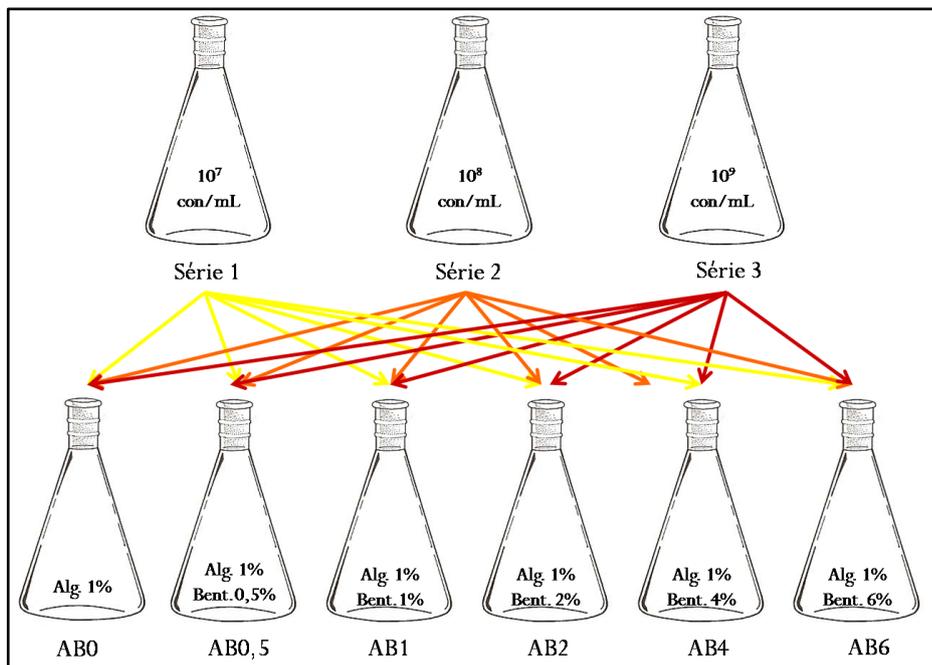
4.2.2 Viabilidade das suspensões

A viabilidade das suspensões obtidas foi verificada através do semeio de alíquotas de 150 µL em placas de Petri contendo 5mL de meio de cultura BDA e incubadas em estufa a 28°C (±1°C) e fotofase de 12 horas. Após um período de 17 horas, as placas foram retiradas e os conídios observados com o auxílio de um microscópio óptico com objetiva de 40x. A viabilidade destes foi determinada contando-se um total de 200 conídios por placa, determinando-os como viáveis ou não (OLIVEIRA, 2009). Foram considerados viáveis os conídios que apresentaram tubo germinativo com comprimento igual ou maior ao próprio diâmetro do conídio (VIEIRA et al., 2009).

4.2.3 Preparação das formulações

Uma solução matricial aquosa de alginato de sódio foi preparada com concentração fixa de 1% para todas as formulações. A esta foram adicionados biomassa fúngica (agente bioativo) ou não (branco) e bentonita (agente de carga) em concentrações variáveis na forma como segue: quando da adição de biomassa, resultando em três séries, 1, 2 e 3, que possuem 10⁷, 10⁸ e 10⁹ conídios/mL, respectivamente. Quando da adição de bentonita, foram testadas 6 concentrações diferentes: 0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 6,0% para cada série, denominadas de AB0; AB0,5; AB1; AB2; AB4 e AB6 respectivamente, em um total de 18 formulações (Figura 11).

Figura 11 – Diagrama esquemático de obtenção das formulações.



Fonte: Autor, 2014.

Estas misturas foram extrudidas através de micropipetas automáticas (LabMate – 100 – 1000 μ L) por processo de gotejamento em uma solução de cloreto de cálcio 0,25M mantido sob agitação magnética branda (40 rpm). Os *beads* resultantes foram deixados em solução por um período de 1 hora para estabilização da estrutura. Após, os *beads* foram filtrados em tamis (Bronzinox) lavados com água deionizada e colocados para secar em capela de fluxo laminar vertical (Filterflux) a temperatura ambiente por 24 horas. Os produtos foram utilizados para análises imediatamente ou então estocadas em ambiente refrigerado para análises posteriores. Estes experimentos foram realizados em triplicata (CALERO et al., 2007; MOEBUS et al., 2009).

4.2.4 Interação entre os componentes dos *beads*

4.2.4.1 Difração de raios X (DRX).

As análises de difração de raios X foram realizadas através de um difratômetro DRX 3000 Shimadzu (Kyoto, Japão) com uma fonte de cobre a 25°C. Aproximadamente 0,1g da amostra triturada foi colocada no porta amostras e analisados com as seguintes condições: 30 kV, 30 mA CuK α ($\lambda = 0,15406$ nm). As amostras na forma de pó foram analisadas em intervalos de 0,02° (2 θ) na faixa de 3 a 90°. As amostras trituradas foram analisadas por DRX. Um pó fino e homogêneo foi utilizado objetivando-se a orientação dos minúsculos cristais do material em todas as direções possíveis. O pó obtido foi inserido em um porta-amostra e o resultado das difrações após a incidência da radiação atenderam a lei de Bragg, que relaciona este espalhamento das ondas (HOLLER et al., 2009).

4.2.4.2 Infravermelho (FTIR)

Os espectros de infravermelho foram obtidos com o auxílio de um espectrômetro Shimadzu (SSU-8000) no modo de reflexão difusa, utilizando-se para análise a amostra na forma de pó. Através da medida de energia absorvida pela vibração de cada uma das ligações químicas presentes nos materiais analisados, pode-se caracterizar o composto em análise, sendo possível determinar e identificar seus grupamentos funcionais (BOTTAN et al., 2011).

4.2.5 Distribuição dos conídios nos *beads*

Para realização do método de fluorescência, foi utilizado o fluorocromo C6G3SUB2 sintetizado no Laboratório de Química Medicinal da Universidade Federal de Alagoas, pelo mestrando em ciências farmacêuticas Edeildo Ferreira da Silva Júnior. Este composto não teve sua estrutura química totalmente elucidada e ainda permanece sob estudo. Objetivando a localização dos conídios no interior dos *beads*, a suspensão fúngica contendo 10⁸ con/mL foi misturada ao corante na proporção de 1:1 (v/v) e adicionada a matriz polímero/argila antes do gotejamento, sendo utilizado como branco formulação idêntica sem o agente bioativo. Para

observação dos conídios não intercalados corados, foram preparadas lâminas de microscopia de esfregaço direto. Alíquotas de 50 μL da biomassa fermentada foram espalhadas na superfície de lâminas limpas e fixadas por evaporação lenta com auxílio de um bico de bunsen. A região fixada foi então inundada com corante e deixada em repouso por 3 minutos. Foi feita uma lavagem com água deionizada para retirada do excesso do cromógeno e secagem em capela de fluxo laminar. O campo de visualização foi coberto com uma lamínula e vedado nas laterais para realização da microscopia.

4.2.6 Rendimento (Y%)

Os testes de rendimento foram realizados a partir da massa inicial, que é a massa total dos constituintes de cada formulação isoladamente, e a massa final, que é obtida após a secagem de todos os *beads* de cada formulação pesados em balança analítica (Bel Engineering) (WU et al., 2012).

4.2.7 Eficiência de encapsulação (EE%)

O número de conídios intercalados após a formação dos *beads* foi determinado por quantificação direta. Amostras de 10 mg de *beads* foram imersas em 20 mL de tampão fosfato 0,1M (pH 7,4) e mantidos sob agitação magnética durante 12 horas até rompimento total. A porcentagem de conídios viáveis intercalados nos *beads* foi determinada através de semeio de alíquotas de 100 μL do produto do rompimento em placas contendo 5 mL de BDA para contagem e visualização da germinação dos conídios (WU et al., 2012)

4.2.8 Índice de intumescimento (Ii%)

50 *beads* secos de cada formulação foram separados e pesados (peso seco) para obtenção do peso médio. Em seguida, esta mesma amostra foi imersa em água deionizada por um período de 12 horas, seca suavemente para retirada da água superficial e repesada para obtenção do peso intumescido (peso intumescido) (GROVER et al., 2012). O índice de intumescimento (Ii%) foi calculado através da equação (CAVALCANTI et al., 2002):

$$li\% = \frac{W_i - W_s}{W_s} \times 100 \quad (1)$$

onde W_i é o peso dos *beads* intumescidos e W_s o peso das *beads* secos.

4.2.9 Distribuição do tamanho de partículas (DTP)

A avaliação do tamanho dos *beads* foi executada através de análise digital de imagem, utilizando-se microscópio óptico (Olympus bx51) com objetiva de 10x, acoplado com uma câmera para digitalização das imagens, que foram analisadas pelo *software DP2-BSW*. Foram contados 300 *beads* secos para obtenção das curvas e da distribuição granulométrica em função da frequência acumulada percentual. Esta análise granulométrica foi executada por meio da medida do diâmetro de Feret. Este corresponde a maior distância entre duas linhas paralelas tangenciais aos limites externos da partícula (SAUSEN, 2007).

Dos resultados obtidos foram determinados os índices de polidispersão das amostras, por cálculo baseado na seguinte equação 3 (VIJAYAN et al., 2010):

$$IP = \frac{D_{0,9} - D_{0,1}}{D_{0,5}} \quad (3)$$

onde $D_{0,9}$, $D_{0,1}$ e $D_{0,5}$, são respectivamente a distribuição dos *beads* correspondente a 90, 10 e 50% de cada amostra.

4.2.10 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise morfológica da superfície dos *beads* foi realizada com o auxílio de um microscópio eletrônico de varredura modelo Shimadzu SSX-550 Superscan. Os *beads* secos foram recobertos por ouro no metalizador Sanyu Electron, modelo QuickCoater SC-701, com corrente de 10mA durante 8 minutos.

4.2.11 Teste de liberação *in vitro*

10 *beads* de cada amostra foram cultivados em meio de cultura BDA e acompanhados até o início da germinação miceliana (MOEBUS et al., 2009; MELO & COSTA, 2005). As observações foram feitas de três formas: a olho nu, observação direta com o auxílio de um estereoscópio binocular (Meije) e por MEV. Para esta última as amostras foram secas em papel filtro pouco antes da metalização. Foram observados *beads* após 16, 18, 20, 22 e 24 horas do cultivo no meio de cultura.

4.2.12 Teste de estabilidade

Amostras de *beads* de cada formulação foram estocadas a temperatura ambiente e refrigerada ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) por um período de 10 meses. A viabilidade dos conídios intercalados foi verificada mensalmente através do semeio de 10 *beads* em meio de cultura. Para avaliar o grau de germinação de cada formulação, o crescimento hifal foi comparado ao dos *beads* recém-produzidos, considerados como padrão. Desta forma, se a visualização da formação do micélio ao redor do *bead* foi possível no intervalo de tempo do padrão, esta formulação recebeu três cruzeiros (+++). Amostras que tiveram retardo de aproximadamente 24 horas na germinação foram classificadas com duas cruzeiros (++) e as que só apresentaram crescimento após 48 horas do intervalo normal e crescimento deficiente com uma cruz (+). A não germinação nos períodos estipulados, ou seja, acima de 72 horas após a formulação padrão, classificou as amostras como inviáveis (-).

4.2.13 Custo de produção de conídios por diferentes tecnologias

O custo relativo a produção de um bem é a soma dos valores do total de insumos (recursos) utilizados e os serviços (operações) requeridos durante o processo de produção de determinada atividade (serviço ou produto) (REIS, 2004). O custo fixo (CF) faz referência aos recursos utilizados no processo de produção que têm duração superior ao período produtivo, considerado curto quanto ao tempo de crescimento do fungo e a obtenção das formulações (MENDES, 2004). Os equipamentos e instrumentos necessários e suas devidas

finalidades durante o processo, podem ser visualizados na tabela 6, já os materiais que correspondem ao custo fixo de produção estão relacionados nas tabelas 7 e 8.

TABELA 6 – Equipamentos e instrumentos componentes do custo de produção de conídios de *Beauveria bassiana*.

Equipamentos e Instrumentos	Unidade	Quantidade	Finalidade
Balança analítica (B.O.D.)	unidade	1	Pesagem de compostos
Deionizador	unidade	1	Manutenção da temperatura e umidade
Autoclave	unidade	1	Fornecimento de água deionizada
Microscópio óptico	unidade	1	Esterilização de materiais e vidraria
Bico de Bunsen	unidade	1	Contagem de conídios
Botijão de gás	unidade	1	Manipulação asséptica do material biológico
Válvula de gás + mangueira	unidade	1	Alimentação da chama
Capela de fluxo laminar	unidade	1	Alimentação da chama
Agitador magnético	unidade	2	Obtenção de ambiente estéril
			Mistura de substâncias

Fonte: Autor, 2014.

Para produção de conídios em arroz, o substrato é cozido por cerca de 15 minutos e depois colocado em bandejas até resfriamento. O arroz é então colocado em sacos de polipropileno (35x22 cm), lacrados, autoclavados e resfriados em temperatura ambiente. Uma suspensão de conídios preparada a partir de uma cultura inicialmente germinada em placas contendo BDA é injetada no interior do saco com o auxílio de uma seringa, incubando-os em câmara climatizada à temperatura de 25 ($\pm 1^\circ\text{C}$), umidade relativa de 70 ($\pm 10\%$) e fotofase de 12 horas. O conteúdo é transferido para bandejas plásticas que são inseridas em câmara climatizada por um período de oito dias, sendo cruzadas no quarto dia, para que haja circulação de ar entre ela, favorecendo a secagem. Após este período o material é colocado em sacos plásticos e armazenado em geladeira (ALVES & PEREIRA, 1989).

TABELA 7 – Materiais utilizados como componentes do custo de produção de suspensões de conídios de *B. bassiana* em arroz.

Equipamentos e materiais	Unidade	Quantidade	Finalidade
Alça de platina	unidade	1	Semeio em meio de cultura
Cabo de Kolle	unidade	1	Suporte da alça de platina
Erlenmeyer (500mL)	unidade	2	Preparo de soluções
Bancada de mármore	unidade	1	Manipulação de experimentos
Papel filme	unidade	1	Proteção de recipientes em geral
Placa de petri (9 cm)	unidade	2	Replicação do fungo em meio de cultura
Luva p/ procedimento	caixa	1	Manipulações em geral
Espátula	unidade	2	Manipulação de compostos
Béquer (200 mL)	unidade	2	Armazenamento de compostos
Proveta (100 mL)	unidade	2	Aferição de volume de soluções
Barra magnética	unidade	2	Agitação de soluções
Tamis	unidade	1	Peneirações em geral
Seringa de 20 mL com agulha	unidade	1	Gotejamento da formulação
Papel filtro	caixa	1	Filtrações em geral
Gaze estéril	pacote	10	Filtração da suspensão
Câmara de Neubauer	unidade	1	Contagem de conídios
Frasco Scotch	unidade	1	Esterilização de meio de cultura
Funil simples	unidade	1	Filtrações em geral
Saco polipropileno 35x22cm	pacote	1	Multiplicação do fungo no substrato
Panela	unidade	1	Cozimento do substrato
Bandejas 46x30x11 cm	unidade	4	Secagem do substrato
Peneira metálica 300 µm	unidade	1	Peneiração do substrato com fungo
Recipiente coletor	unidade	1	Coleta da suspensão

Fonte: Autor, 2014.

TABELA 8 – Materiais utilizados como componentes do custo de produção de formulações nanoestruturadas contendo conídios de *B. bassiana*.

Equipamentos e materiais	Unidade	Quantidade	Finalidade
Alça de platina	unidade	1	Semeio em meio de cultura
Cabo de Kolle	unidade	1	Suporte da alça de platina
Erlenmeyer (500mL)	unidade	2	Preparo de soluções
Bancada de mármore	unidade	1	Manipulação de experimentos
Papel filme	unidade	1	Proteção de recipientes em geral
Placa de petri (9 cm)	unidade	2	Replicação do fungo em meio de cultura
Luva p/ procedimento	caixa	1	Manipulações em geral
Espátula	unidade	2	Manipulação de compostos
Béquer (200 mL)	unidade	2	Armazenamento de compostos
Proveta (100 mL)	unidade	2	Aferição de volume de soluções
Barra magnética	unidade	2	Agitação de soluções
Tamis	unidade	1	Peneirações em geral
Seringa de 20 mL com agulha	unidade	1	Gotejamento da formulação
Papel filtro	caixa	1	Filtrações em geral
Gaze estéril	pacote	10	Filtração da suspensão
Câmara de Neubauer	unidade	1	Contagem de conídios
Frasco Scotch	unidade	1	Esterilização de meio de cultura
Funil simples	unidade	1	Filtrações em geral

Fonte: Autor, 2014.

O custo variável é referente aos recursos que apresentam tempo de duração menor ou igual ao curto prazo de produção, sendo incorporados em sua totalidade ao produto dentro deste prazo. Desta maneira, sua reposição é realizada a cada ciclo, não havendo reaproveitamento para os demais. A quantidade e a variedade do serviço ou produto podem sofrer alteração em um pequeno espaço de tempo, exigindo investimento monetário direto imediato (REIS, 2004). Os insumos consumidos durante o procedimento de produção dos conídios fúngicos de *B. bassiana* são mostrados nas Tabelas 9 e 10.

TABELA 9 – Insumos e tarifas componentes do custo variável de produção de suspensões de conídios de *B. bassiana* em arroz.

Insumos	Unidade	Quantidade	Finalidade
Arroz	Kg	10	Multiplicação do fungo
Meio de cultura BDA	Frasco	1	Multiplicação do fungo
Material de limpeza	-	-	Álcool, detergente, papel absorvente e afins

Fonte: Autor, 2014.

TABELA 10 – Insumos, tarifas componentes do custo variável de produção de formulações nanoestruturadas contendo conídios de *B. bassiana*.

Insumos	Unidade	Quantidade	Finalidade
Alginato de sódio	Frasco	1	Gelificação ionotrópica
Bentonita sódica	Frasco	1	Intercalação
Cloreto de cálcio	Frasco	1	Gelificação ionotrópica
Meio de cultura BDA	Frasco	1	Multiplicação do fungo
Tween 80®	Frasco	1	Espalhante adesivo
Material de limpeza	-	-	Álcool, detergente, papel absorvente e afins.

Fonte: Autor, 2014.

4.2.14 Análise estatística

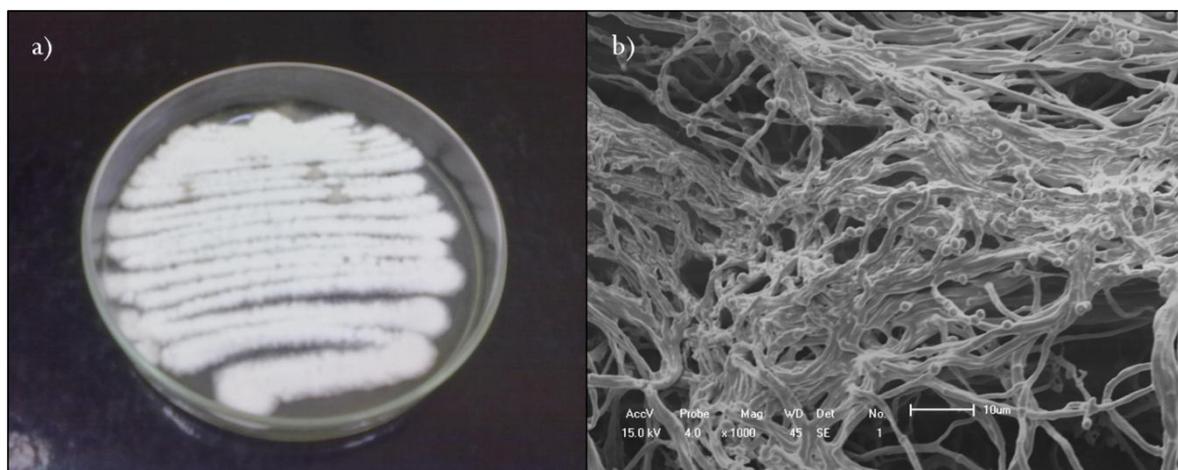
Os experimentos foram conduzidos em triplicata, com os dados obtidos das séries submetidos a análises de variância (ANOVA) com ($p < 0,05$) seguido pelo teste de múltiplas comparações, teste de Bonferoni. Os dados foram dispostos em tabelas e gráficos, com seus respectivos desvios padrão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Microrganismo e meio de cultura

B. bassiana CPATC032 cultivada em BDA por 14 dias foi identificada morfológica e estruturalmente. Macroscopicamente (Figura 12a), as colônias de *B. bassiana* após 14 dias de cultivo apresentaram um micélio de coloração branca, típico desta espécie. A análise microscópica (Figura 12b) revelou a presença de hifas septadas, hialinas e com a presença de conidióforos laterais contendo fiáldes em sua extremidade, donde brotam os conídios, que se mostraram hialinos e com formato ovóide ou globuloso. Estas características também foram observadas por Baptista et al. (2008).

Figura 12 – Aspecto macroscópico (a) e microscópico (b) de *B. bassiana*.

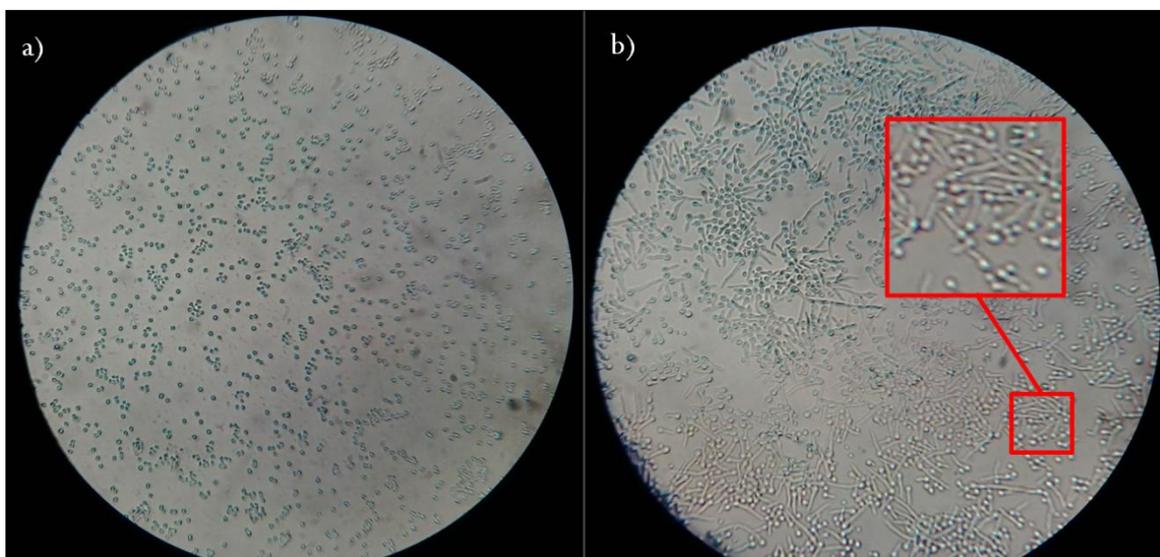


Fonte: Autor, 2014.

5.2 Viabilidade das suspensões

A figura 13a mostra os conídios distribuídos homogeneamente em toda extensão da placa contendo BDA, sem que haja sobreposição, requisito importante para realização de testes de viabilidade (ALVES, 1998). Os ensaios de germinação de conídios de fungos entomopatogênicos são essenciais na rotina de laboratórios que utilizam estes agentes, objetivando o biocontrole de pragas (ALVES, 2002).

Figura 13 – Microscopia óptica dos conídios em BDA: a) conídios recém-semeados; b) conídios germinados (após 16 horas); c) detalhe dos conídios germinados.



Fonte: Autor, 2014.

Como pode ser visto na figura 13b, os conídios germinados, e conseqüentemente considerados viáveis, apresentam tubo germinativo igual ou maior que o seu diâmetro no tempo estipulado, indicando crescimento ativo do fungo. Os testes de viabilidade resultaram em porcentagens altas de germinação para todas as suspensões utilizadas nos experimentos. Estes valores estão expressos na tabela 11. Vale ressaltar que foram superiores 95% para as três suspensões, considerando-se que valores acima de 85% já são tidos como ideais para atividade infectante de fungos (ALVES, 2002).

Tabela 11 – Percentual de germinação das suspensões.

Amostra	Percentual de germinação	Desvio Padrão (\pm)
Série 1	96,83	3,05
Série 2	96,77	3,04
Série 3	95,33	0,76

Fonte: Autor, 2014.

5.3 Preparação das Formulações

A técnica de gelificação ionotrópica utilizada foi eficiente em gelificar todas as misturas avaliadas. As formulações com adição de bentonita demonstraram um aprimoramento das propriedades mecânicas proporcional ao aumento da concentração desta, quando comparado à matriz unicamente polimérica. Cabellero et al. (2014) destacam que o equilíbrio entre os constituintes da formulação é essencial para a formação do hidrogel e, mesmo frente à maior concentração utilizada (6%), não ocorreu qualquer interferência sobre a gelificação do alginato.

Quanto da adição dos conídios, os *beads* continuaram sendo formados imediatamente após o gotejamento em cloreto de cálcio (Figura 14) e mostraram-se resistentes ao toque, a exceção dos produtos da série 3, que apresentaram relativa fragilidade, chegando mesmo a romper durante o manuseio. Condição semelhante foi relatada por Pasqualim et al. (2010), que atribuíram este fato à extrapolação da capacidade de encapsulação do material. Este resultado foi determinante no seguimento dos experimentos, tendo sido a série 2 selecionada para os testes posteriores, já que foi a condição que demonstrou suportar a maior carga fúngica sem prejuízo evidente para as propriedades mecânicas da matriz utilizada.

Figura 14 – Produto da gelificação ionotrópica.



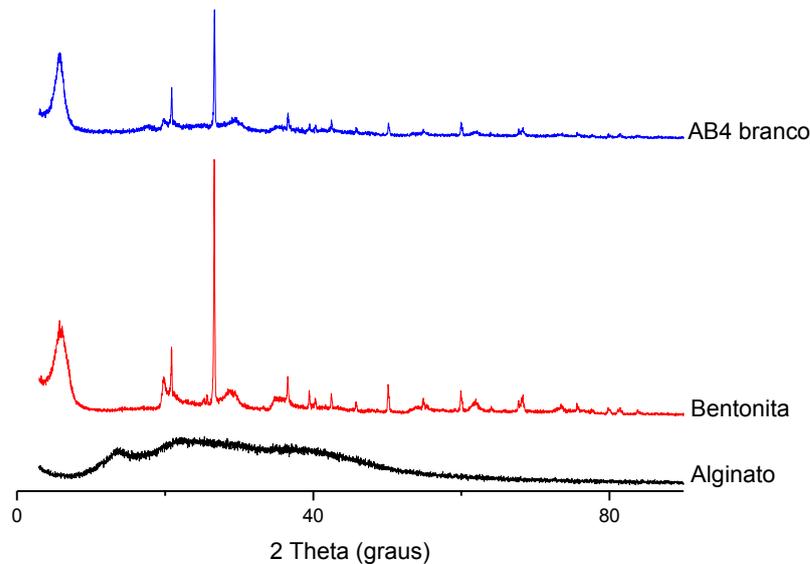
Fonte: Autor, 2014.

5.4 Interação entre os componentes dos *beads*

5.4.1 Difração de raios X

Os difratogramas do alginato, da bentonita e da formulação AB4 (branco) são mostrados na figura 15. A interpretação dos resultados é feita através dos índices de Miller dos planos correspondentes para cada valor obtido de d (distância basal), sendo o ângulo de difração (2θ) determinado pelo espaçamento entre um conjunto particular de planos. Utilizando-se a equação de Bragg ($n\lambda=2.d.\text{sen}\theta$), o cálculo de d é feito partir do comprimento de onda conhecido da fonte e do ângulo medido (HOLLER et al., 2009).

Figura 15 – Espectros de DRX do alginato, da bentonita e de AB4 (branco).



Fonte: Autor, 2014.

Como era esperado, uma vez que o alginato é um material amorfo (MLADENOVSKA et al., 2007) o seu difratograma não mostrou a presença de planos cristalinos. A bentonita demonstrou espaçamento basal d_{001} de 15.26\AA ($2\theta = 5,8^\circ$). Os difratogramas da matriz não apresentaram deslocamento do plano d_{001} inicial da bentonita, isto é, não houve alteração do espaçamento basal, indicando que não houve intercalação do polímero. Quando a estrutura é esfoliada, os picos de difração da argila desaparecem, porque a forma cristalográfica é perdida, o que também não foi o caso (LONKAR et al., 2009). Kevadiya et al. (2010)

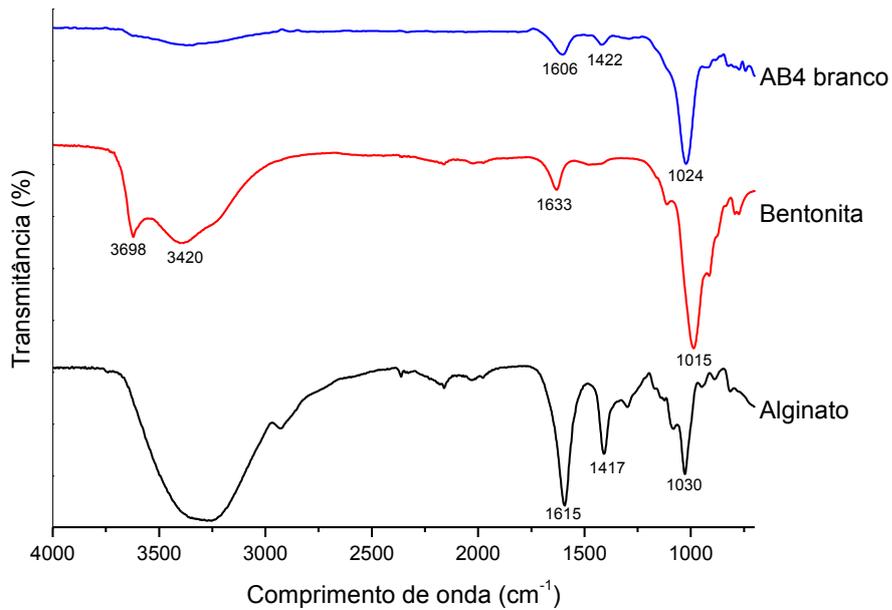
encontrou resultados semelhantes, e sugeriram que o alginato interage com bentonita através de ligações com os grupos hidroxila na superfície da montmorilonite (MMT), constituinte principal desta argila, formando ligações de hidrogênio intermoleculares e eletrostáticas, que provocam inúmeros pontos de contato para a criação de uma rede tridimensional. Sugeriu-se também que as cadeias de alginato funcionam como uma ponte, ligando camadas de silicatos vizinhos quando presentes em alta concentração. Nós tentamos elucidar essa hipótese usando a técnica de FTIR.

5.4.2 Infravermelho

Os espectros de FTIR são mostrados na figura 16. Vibrações assimétricas e simétricas de alongamento são vistas entre 1615 e 1417 cm^{-1} , devido à presença de íons carboxílicos do alginato. Um estiramento simétrico ocorre em 1030 cm^{-1} devido ao éter cíclico ligado a oxigênio da estrutura alginato (-C-O-C-) (KEVADIYA et al., 2010). A MMT mostra bandas de 3620 a 3898 cm^{-1} que são devidas ao elevado número de grupamentos hidroxila ligados a sílica e ao alumínio (Si-OH e Al-OH) presentes na superfície da argila, gerando bandas de grande amplitude semelhantes aos encontrados na estrutura de alginato, o qual tem os grupos hidroxila derivados dos grupamentos alcoólicos da sua estrutura molecular. Bandas derivadas do Si-O da estrutura da argila são vistos em 1115 cm^{-1} (PATEL et al., 2007). As bandas na região de 1633 cm^{-1} no espectro de bentonita são devidos a forma da OH com água adsorvida. A região com vibrações assimétricas e simétricas de -C-O-O- vista no alginato, sofreu diminuição na intensidade e deslocamento dos picos de 1615 e 1417 cm^{-1} a 1606 e 1422 cm^{-1} no nanocompósito, respectivamente. A alteração observada na banda -C-O-O- (1030 cm^{-1}) pode ter sido causada pela interação entre o alginato e a bentonite, o que resulta em maior número de ondas e na diminuição da intensidade e deslocamento de 1030 para 1024 cm^{-1} . Thaned et al. (2007) também relataram este fenômeno. Grupamentos carboxilílicos do alginato com cargas negativas poderiam interagir com os locais de carga positiva nos bordos da MMT. A região dos grupamentos silanol da bentonite e grupos alcoólicos do alginato desapareceram nos espectros do nanocompósito, o que é uma evidência da ligação de hidrogênio intermolecular e forças eletrostáticas. De acordo com Kevadiya et al. (2010), o aumento da intensidade de pico na região hidroxila indica a ocorrência de ligações de hidrogênio intermoleculares que aumentam as forças eletrostáticas entre os dois compostos.

Assim, essas ligações de hidrogênio causam inúmeros pontos de contato para a criação da rede tridimensional.

Figura 16 – Espectros de FTIR do alginato, da bentonita e de AB4 (branco).

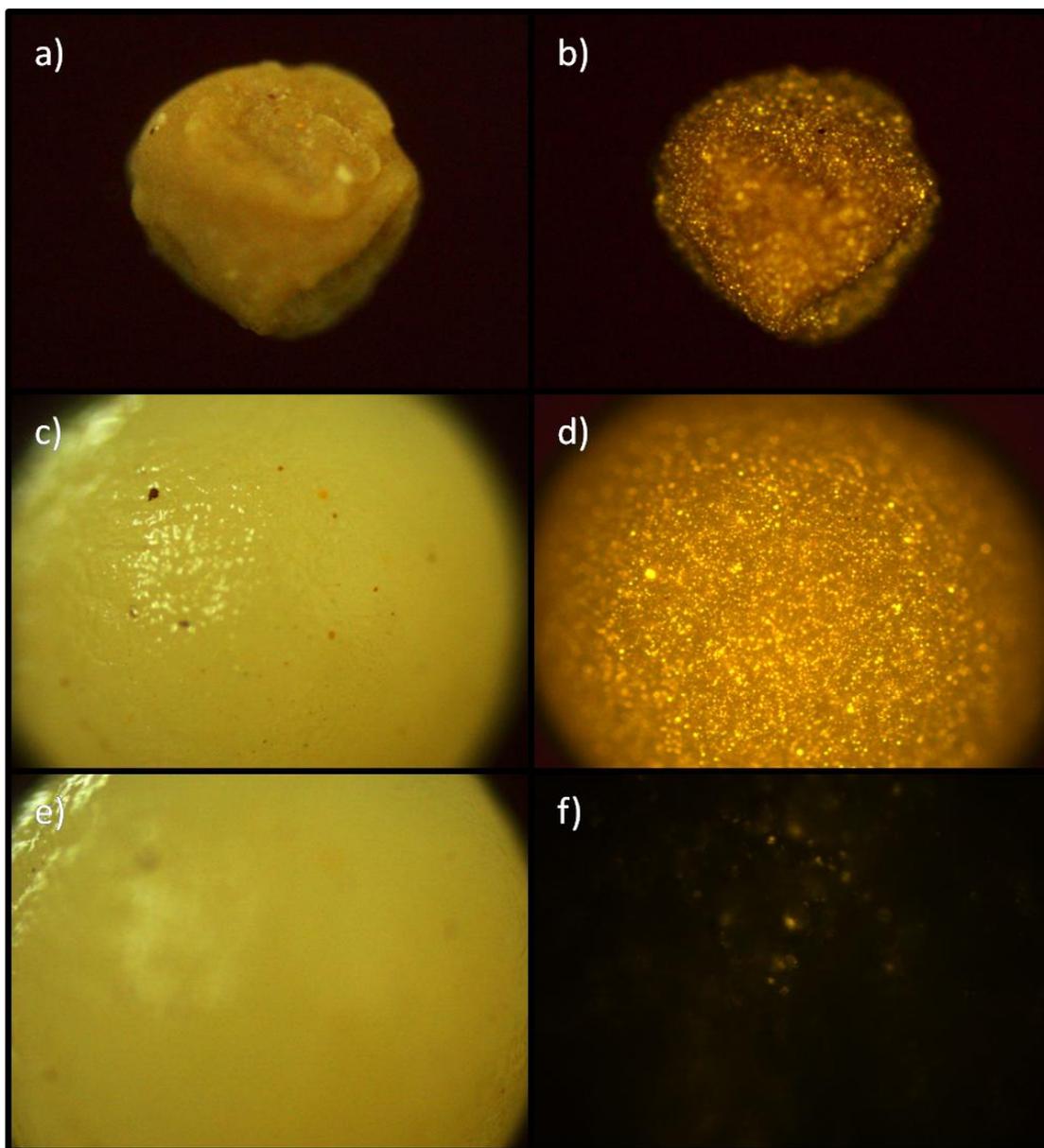


Fonte: Autor, 2014.

5.5 Distribuição dos conídios nos *beads*

Como pode ser verificado na figura 17, os conídios corados com o fluorocromo C6G3SUB2 apresentam-se distribuídos por toda extensão do *bead*. Foram observadas tanto formulações obtidas após secagem (Figura 17 a-b) quanto imediatamente após a formação (Figura 17 c-d), ou seja, quando ainda se apresentam intumescidas. *Beads* contendo apenas o corante (com ausência de esporos - branco) também foram visualizados pela mesma técnica (Figura 17 e-f), a fim de demonstrarem que o corante não fluoresce a matriz. A micrografia (Figura 17f), demonstrou emissão de fluorescência bastante reduzida, que foi atribuída a própria presença física do fluorocromo com o material de matriz.

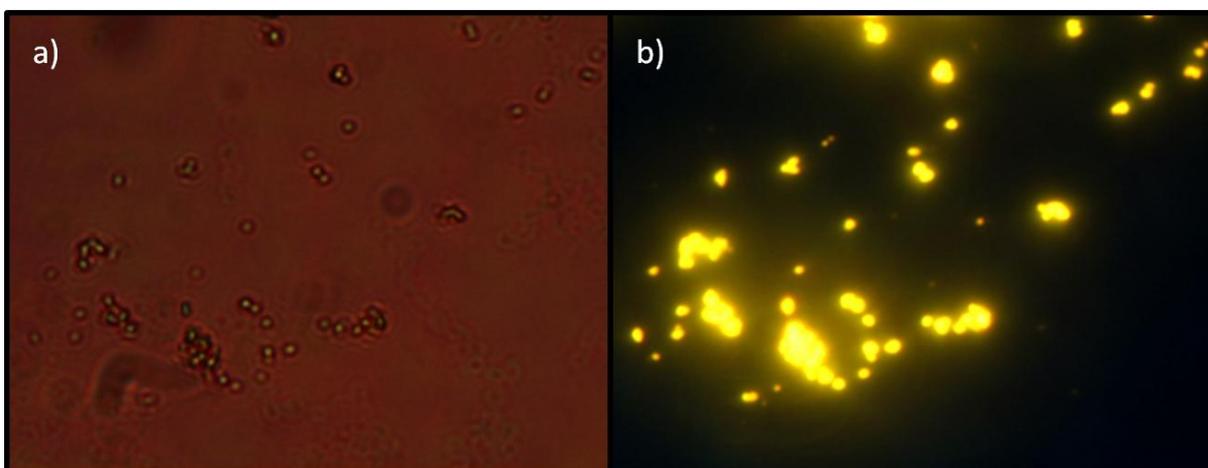
Figura 17 – Micrografias: a) *bead* seco sob luz comum; b) *bead* seco sob luz UV; c) *bead* intumescido sob luz comum; d) *bead* intumescido sob luz UV; e) *bead* (branco) sob luz comum; f) *bead* (branco) sob luz UV.



Fonte: Autor, 2014.

Ainda, lâminas contendo conídios fixados e posteriormente expostos ao corante em questão foram utilizadas com o objetivo de confirmar a emissão de fluorescência por parte dos conídios. Na figura 18, podem ser observados esporos de *B. bassiana* sob luz comum (Figura 18a) e sob luz UV (Figura 18b).

Figura 18 – Lâmina contendo conídios de *B. bassiana* fixados: a) sob luz comum; b) sob luz UV.



Fonte: Autor, 2014.

5.6 Rendimento (Y%)

O percentual de rendimento dos *beads* de AB0 foi de 70,0% (resultados expressos na tabela 12), semelhante ao encontrado por Singh et al. (2009a). Neste estudo, os autores relataram que o aumento da concentração de alginato resultou em índices mais elevados de rendimento, sendo que o amido não interferiu neste resultado. Embora a concentração de alginato tenha se mantido fixa, nesta dissertação a adição da carga utilizada (bentonita) promoveu aumento significativo no rendimento, superior a 95%, independente da concentração utilizada.

O melhoramento do rendimento associado ao aumento da concentração de bentonita pode estar relacionado a elevação da viscosidade da mistura antes do gotejamento, havendo menor lixiviação do material de matriz no momento da gelificação no cloreto de cálcio. Resultados semelhantes foram verificados por Wu et al. (2012), utilizando uma matriz semelhante, porém, com adição de amido.

5.7 Eficiência de encapsulação

De um modo geral, o aumento na concentração de bentonita resultou em aumento da EE% (Tabela 12). Este resultado sugere que a encapsulação do princípio ativo com o

polímero enriquecido com silicato parece reduzir a malha polimérica, reduzindo a quantidade de conídios lixiviados na solução de cloreto de cálcio durante a gelificação ionotrópica. A adição de silicato em menor proporção (AB0,5) já foi capaz de aumentar a EE% de 85,5 para 89,5% em comparação com AB0. Os produtos AB4 e AB6 obtiveram resultados ainda mais expressivos, 98,0 e 97,5, respectivamente.

Tabela 12 – Rendimento (Y%) e Eficiência de encapsulação (EE%) dos produtos obtidos.

Formulação	Alginato (%m/v)	Bentonita (%m/v)	Rendimento (Y%)	Eficiência de encapsulação (EE%)
AB0	1,0	-	70,0	85,5
AB0,5	1,0	0,5	96,0	89,5
AB1	1,0	1,0	98,2	89,0
AB2	1,0	2,0	97,3	93,0
AB4	1,0	4,0	99,7	98,0
AB6	1,0	6,0	99,2	97,5

Fonte: Autor, 2014.

Assim, a mistura alginato/bentonita se mostrou altamente eficaz na encapsulação de *B. bassiana*. Este resultado é similar ao encontrado por Wu et al. (2012) encapsulando a bactéria *Raoultella planticola* com uma mistura alginato/bentonita/amido, onde a EE% ficou acima de 99,9%.

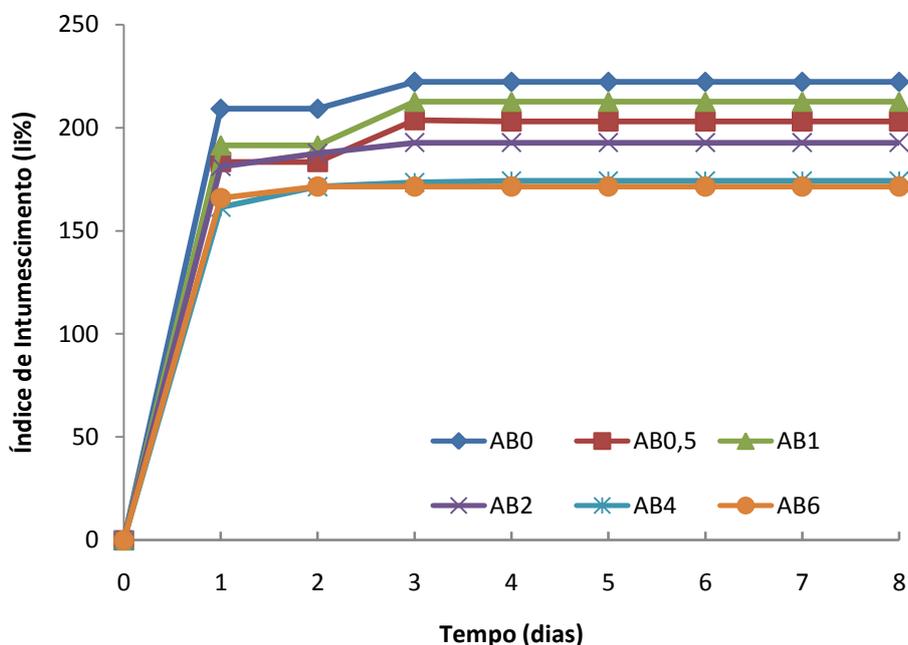
5.8 Índice de intumescimento

A habilidade de captação de água é uma importante propriedade de hidrogéis e de compósitos poliméricos em geral. O índice de intumescimento (Ii%) avalia esta capacidade através da variação de peso que ocorre quando unidades de dimensão aproximada são imersas em água deionizada a temperatura ambiente (GROVER, et al., 2012). Nanocompósitos poliméricos que apresentam em sua composição polímeros hidrofílicos, a exemplo do alginato, possuem grande capacidade de captação de água. Este comportamento de inchamento (“swelling”) pode ser explicado pela tendência deste material absorver água com o objetivo de preencher os espaços vazios que permanecem desidratados em sua rede polimérica. Este fenômeno é mantido por diferenças de pressão osmótica, que resultam em

relaxamento da estrutura polimérica do nanocompósito até o momento em que se alcança equilíbrio dinâmico e também está relacionado aos princípios de difusão de compostos intercalados. Sistemas matriciais deste tipo, ao entrarem em contato com meios de dissolução, podem apresentar capacidade de captação de água alterada, tanto por mudanças na taxa de difusão quanto por modificações do arcabouço estrutural do nanocompósito (CAVALCANTI et al., 2002; GROVER et al., 2012).

Os *beads* de AB0 apresentaram Ii% superiores as demais formulações (Figura 19), indicando que a matriz unicamente polimérica, como já era de se esperar, possui alta capacidade de absorção de água. Isso é justificado pelo grande número de sítios de ligação providos pelos grupamentos -C-O-O- (carboxilato) de sua estrutura, facilitando a ligação com moléculas de água (WU et al., 2012). Nas primeiras 24 horas, é possível observar uma grande capacidade de captação de água em todas as formulações, que tende a estabilizar nas próximas 24 (AB0; AB0,5 e AB1) ou 48 horas (AB2; AB4 e AB6).

Figura 19 – Índice de intumescimento das formulações.



Fonte: Autor, 2014.

Com a adição de bentonita, menores índices de intumescimento foram encontrados para todas as formulações contendo a argila. Os *beads* contendo a menor concentração de argila testada (AB0,5) demonstraram uma imediata redução na captação de água em comparação com AB0 nas primeiras 24 horas, de 209,15 para 183,43, estabilizando após o terceiro dia de experimento (perfil semelhante ao encontrado para AB1). As formulações AB2; AB4 e AB6 demonstraram uma estabilização mais rápida que as demais, após 48 horas, destacando-se as duas últimas pela redução acentuada da captação de água no primeiro dia, 161,38 e 165,93 respectivamente.

A água é essencial para o crescimento dos microrganismos de forma geral (CONSTANSKI, 2011), a importância do intumescimento de formulações deste tipo se mostra ainda mais evidente. Conseguir controlar esta captação de água pelos *beads* pode resultar no retardo de liberação de princípios ativos e aumento da permanência do bioinseticida no local de ação (ALVES, 2002).

Resultado semelhante também foi relatado por Wu et al. (2012) encapsulando a bactéria *Raoultella planticola* e por Singh et al. (2009a), com o fungicida tetrametiluram dissulfeto, ambos utilizando a mesma matriz, exceto pela adição de amido a formulação. De acordo com Singh et al. (2009b), a diminuição da capacidade de captação de água de uma formulação possibilita sua utilização como sistema de liberação modificada.

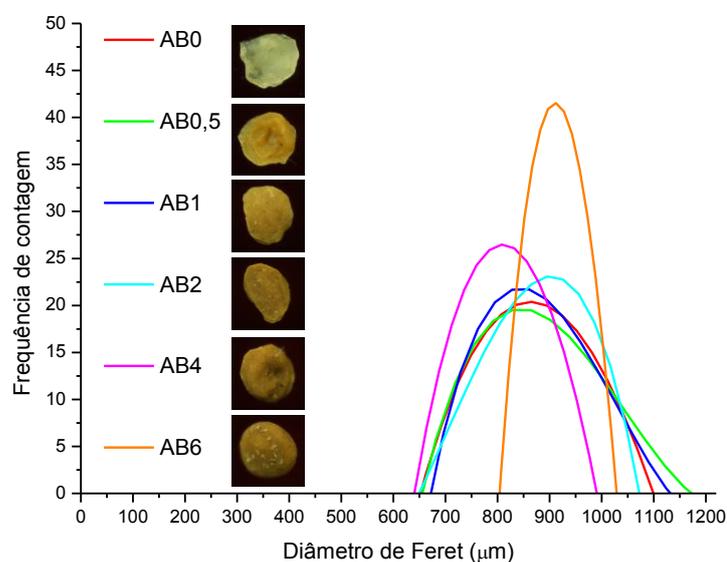
5.9 Distribuição do tamanho de partículas (DTP)

Fica evidente que a adição de bentonita resultou em diminuição do tamanho das partículas (figura 20). A faixa granulométrica das formulações pode ser vistas na tabela 13.

O IP demonstra se o sistema é homogêneo ou heterogêneo (VILANOVA et al., 2012). O grau dispersão das partículas vai de 0 à 1, onde valores menores que 0,3 representam distribuição de partículas na mesma faixa granulométrica, enquanto que valores próximos de 1, indicam granulometria variada (JANEIRO, 2011). Os valores obtidos de IP estão relacionados na tabela 13. Os resultados de IP indicaram que todos os produtos formados apresentaram distribuição de tamanho homogêneo, com destaque para AB6, que apesar de ter apresentado maior média de tamanho, demonstrou IP menor que as demais formulações. Os produtos obtidos podem, assim, ser considerados como sistemas homogêneos. Todos os produtos apresentaram estreita faixa granulométrica ($\leq 0,3$), ou seja, não apresentaram muita

variação ao redor da média. As micrografias da figura 20 ilustram um aumento na densidade óptica e na esferização dos *beads* proporcional ao aumento da concentração de silicato na formulação. A maior tendência em formar partículas esféricas da formulação AB6 tem relação com a alta viscosidade proporcionada pela bentonita e é responsável pela menor variação no diâmetro médio (WU, et al., 2012).

Figura 20 – Tamanho de partícula dos *beads* secos com diferentes concentrações de bentonita.



Fonte: Autor, 2014.

Tabela 13 – Distribuição do tamanho de partículas (DTP) e Índice de polidispersão (IP) dos produtos obtidos.

Formulação	Alginato (%m/v)	Bentonita (%m/v)	Distribuição do tamanho de partículas (µm)	Índice de polidispersão (IP)
AB0	1,0	-	869,8	0,29
AB0,5	1,0	0,5	883,0	0,30
AB1	1,0	1,0	875,6	0,27
AB2	1,0	2,0	881,7	0,23
AB4	1,0	4,0	811,5	0,24
AB6	1,0	6,0	912,8	0,13

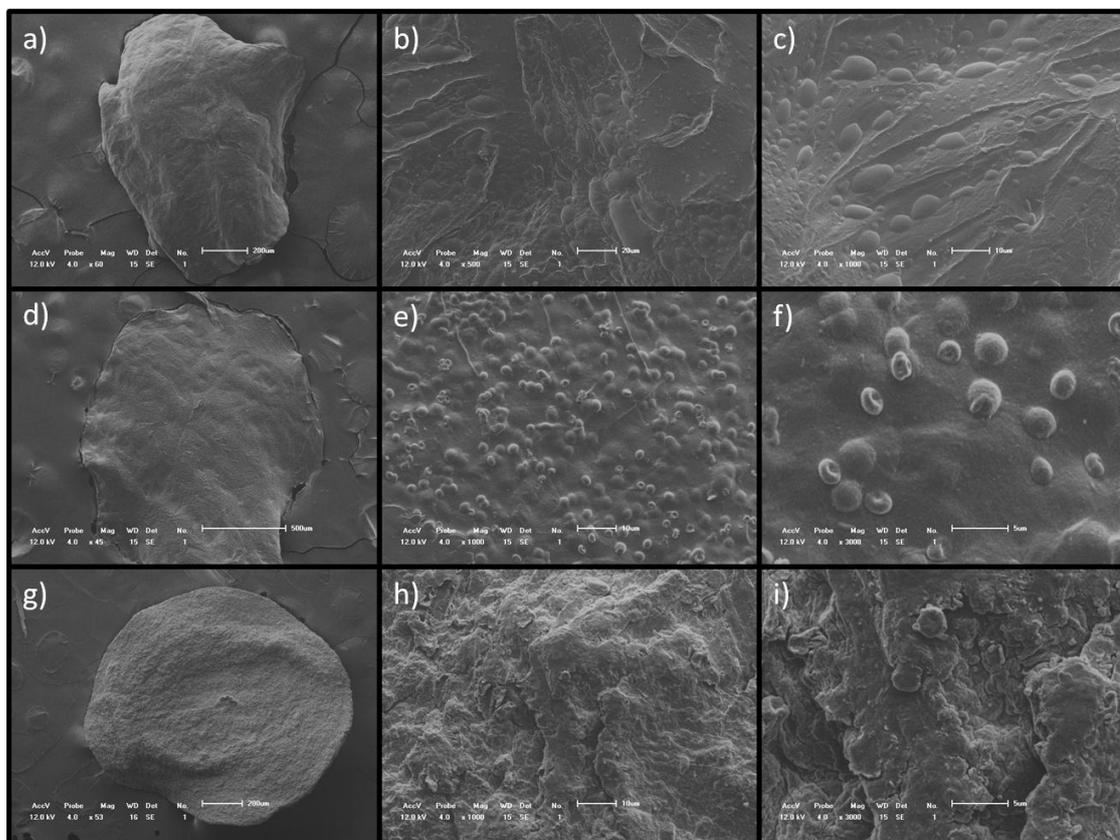
Fonte: Autor, 2014.

Pode-se observar que a faixa de tamanho variou ligeiramente entre as diferentes formulações, entre 650 e 1150 μm , semelhante a outros relatos na literatura em que foram utilizadas matrizes semelhantes. Wu et al. (2012), encontraram tamanhos de partículas entre 980 e 1300 μm utilizando matriz composta de alginato, bentonita e amido para encapsular bactérias. No entanto, Cabellero et al. (2014) encapsulando ibuprofeno em *beads* de alginato através da técnica de gelificação ionotrópica, encontraram uma faixa de distribuição de tamanho mais ampla, variando entre 700 e 1600 μm . Foi relatado por eles que um importante fator para a homogeneidade das partículas é a viscosidade do polímero. Quando são utilizadas concentrações muito altas pode haver má formação dos hidrogéis. Os *beads* contendo bentonita, independente da concentração, apresentaram distribuição de tamanho um pouco abaixo da faixa descrita por Singh et al. (2009a), que variou entre 1260 a 1340 μm .

5.10 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

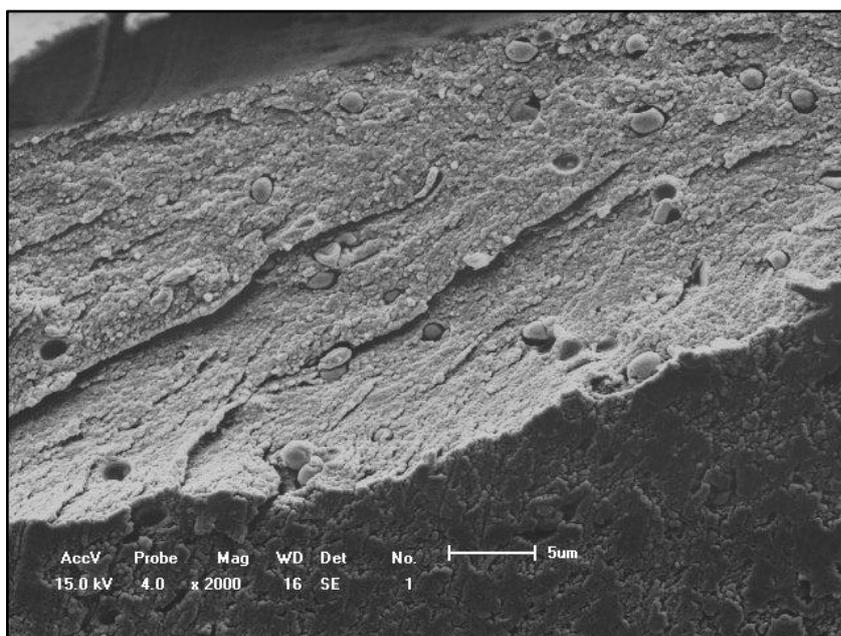
As imagens obtidas por MEV (Figura 21) demonstraram que os *beads* compostos apenas pelo polímero (AB0) apresentam morfologia ligeiramente mais irregular que as demais estruturas com adição de bentonita, que tendem à esferização, como observado através da microscopia óptica. Além disso, foi possível visualizar uma superfície menos rugosa e com conídios em AB0, condição que não foi encontrada nas demais formulações. Este fato reforça ainda mais a possibilidade de proteção dos conídios fúngicos pela bentonita, que parece estar recobrando a estrutura. A visualização dos conídios pode ser feita com a secção do *bead*. Esta metodologia ainda não havia sido citada na literatura para formulações deste tipo e possibilitou a detecção dos conídios distribuídos no interior da matriz nanoestruturada (Figura 22). Foi possível também visualizar arcações vazios onde se encontravam alguns esporos e que foram removidos no momento do corte.

Figura 21 – Morfologia dos *beads* por MEV a-b-c: AB0 branco (60, 500 e 1000x); d-e-f: AB0 (45, 1000 e 3000x); g-h-i: AB4 (53, 100 e 3000x).



Fonte: Autor, 2014.

Figura 22: MEV da secção de um *bead* AB6.



Fonte: Autor, 2014.

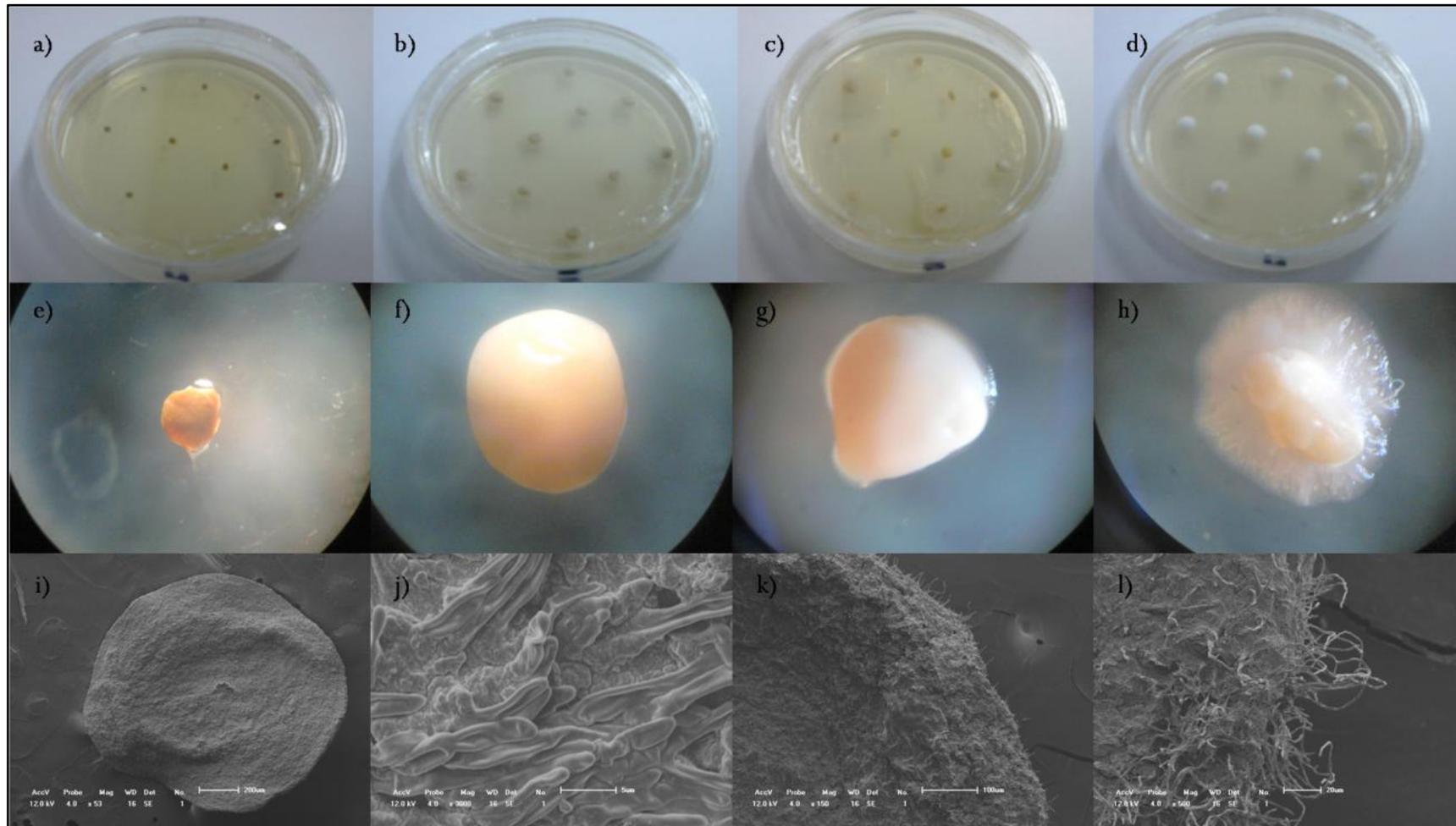
5.11 Teste de liberação *in vitro*

Pela observação a olho nu, o início da germinação miceliana se deu aproximadamente a partir de 24 horas pós-semeio para todas as formulações da série 2, exceto para AB4 e AB6, onde possível verificar germinação após 48 horas. Este resultado pode ser indicativo de uma possível propriedade de barreira com as maiores concentrações de bentonita avaliadas, característica importante para sua utilização em formulações que visam uma liberação modificada. Moretini e Melo (2007) relataram resultados semelhantes com agentes entomopatogênicos formulados em sistemas poliméricos contendo alginato e pectina cítrica, onde também foi verificado retardo no início do crescimento do fungo *Coniothyrium minitans* que ocorreu após 48 horas do semeio. Os *beads* começaram lentamente a adquirir coloração esbranquiçada e logo após foram recobertos com o micélio fúngico. O acompanhamento deste processo pode ser acompanhado pelas fotografias correspondentes (Figura 23a-d).

A estereoscopia (Figura 23e-h) acompanhou a observação a olho nu, mas possibilitou um maior evidenciamento do início do crescimento e deflagrou a importância do intumescimento na liberação do ativo. Ao redor do *bead* foi possível visualizar um microambiente aquoso (Figura 23g), que é justamente o local onde o desenvolvimento hifal se inicia. Como a água é primordial para o crescimento de microrganismo em geral, a importância do intumescimento de produtos deste tipo se mostra ainda mais evidente. Formulações capazes de controlar esta captação de água são potencialmente aplicáveis no retardo de liberação de princípios ativos.

A figura 23i-l apresenta as micrografias obtidas por MEV, as quais são capazes de demonstrar modificações na superfície do *bead* (aproximadamente após 16 horas do cultivo) até um progressivo crescimento das hifas. Para AB4 e AB6 essas projeções hifais foram detectáveis após aproximadamente 28 horas. Levando-se em consideração que pela observação do crescimento a olho nu, este ocorreu próximo de 48 horas pós-semeio, fica evidente que houve não só retardo no início da germinação, como também na progressão do desenvolvimento. Dados que corroboraram com a hipótese do efeito encapsulador da bentonita e ratifica seu efeito de barreira.

Figura 23 – Liberação *in vitro* de *B. bassiana* dos *beads* de AB2 a-d: fotografias; e-h: estereoscópias; i-l: MEV: secas (a/e); intumescidas (b/f); após 24 horas (c/g); após 48 horas (d/h); do *bead* seco - 53x (i); modificação da superfície - 16 horas - 3000x (j); crescimento hifal - 22 horas - 150x (k) e recobrimento miceliano - 24 horas 500x.



Fonte: Autor, 2014.

A observação do crescimento das estruturas fúngicas de *B. bassiana* na superfície de *beads* nanoestruturados ainda não havia sido descrito na literatura. A carência de uma metodologia para tal tornou necessário o estabelecimento de uma técnica que permitisse a visualização da germinação sem que houvesse danos à estrutura fúngica. A metodologia utilizada foi inovadora e possibilitou o acompanhamento do crescimento hifal do fungo a partir do ponto inicial.

5.12 Teste de estabilidade

A estabilidade dos *beads* da série 2 em função da temperatura é mostrada na tabela 14. Em geral, as formulações armazenadas a baixas temperaturas mantiveram-se mais viáveis do que aquelas mantidas em temperatura ambiente. Este resultado mostra a importância do controle da temperatura para as formulações contendo conídios, pois eles são muito sensíveis a fatores externos, dentre os quais a temperatura. As formulações contendo silicato apresentaram melhores resultados e AB4 apresentou a maior estabilidade térmica, mesmo em temperatura ambiente (é importante ressaltar que a formulação AB6 foi produzida após as demais, não apresentando dados compatíveis). Esta formulação obteve resultado ainda mais significativo quando armazenado sob refrigeração. Sob esta condição, os *beads* mantiveram germinação micelial normal durante os 10 meses de estudo. Resultados semelhantes foram encontrados por Carneiro & Gomes (1999) encapsulando o fungo *Paecilomyces lilacinus* numa matriz de alginato 1% bentonita 5%. Eles observaram que a viabilidade foi mantida mesmo após 12 meses de armazenamento a 7 °C.

Tabela 14 – Estabilidade dos conídios fúngicos encapsulados, armazenados a diferentes temperaturas.

Amostras	Tempo de armazenamento (meses)																				
	25°C (±4)										4°C (±1)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
AB0	+++	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+	-	-	-	-	-	
AB0,5	+++	+++	++	++	+	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	
AB1	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	
AB2	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	
AB4	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
AB6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	/	/	/	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	/	/	/

+++ indica germinação miceliana normal (em comparação os beads recém-preparados – padrão)

++ indica germinação miceliana retardada em aproximadamente 24 horas

+ indica germinação miceliana retardada em aproximadamente 72 horas e crescimento deficiente

- indica ausência de crescimento

/ indica ausência de dados

Fonte: Autor, 2014.

5.13 Custo de produção de conídios por diferentes tecnologias

Resultados referentes aos custos de produção de conídios fúngicos de *B. bassiana* de ambos sistemas produtivos, podem ser visualizados nas tabelas 15 e 16. Vale ressaltar que esta estimativa de custo é uma análise relativa e não absoluta, sendo, neste caso, desconsiderados aspectos financeiros como taxa de juros, custos alternativos, encargos sociais, entre outros.

TABELA 15 – Custo fixo discriminado para a produção de suspensões de conídios de *B. bassiana* em arroz.

Recursos	Valor R\$ (07/08/2014)
Balança analítica	3.681,00
(B.O.D.)	3.139,00
Deionizador	649,99
Autoclave	2.490,00
Microscópio óptico	2.495,00
Bico de Bunsen	34,90
Botijão de gás	145,50
Válvula de gás + mangueira	14,40
Capela de fluxo laminar	13.490,00
Agitador magnético	1400,00
Alça de platina	99,90
Cabo de Kolle	15,52
Erlenmeyer (500mL)	13,80
Papel filme	3,50
Placa de petri (9 cm)	9,00
Luva p/ procedimento	24,00
Espátula	19,80
Béquer (200 mL)	7,80
Proveta (100 mL)	39,62
Barra magnética	11,90
Tamis	76,51
Seringa 20 mL c/ agulha	4,65
Papel filtro	5,49
Gaze estéril	6,10
Câmara de Neubauer	69,90
Frasco Scoth	16,90
Funil simples	5,90
Saco polipropileno 35x22cm	15,00
Panela industrial	49,00
Bandejas 46x30x11 cm	140,00
Peneira granulométrica	102,87
Recipiente coletor	35,00
Total	28.311,95

Fonte: Autor, 2014.

TABELA 16 – Custo fixo discriminado para a produção de formulações nanoestruturadas contendo conídios de *B. bassiana*.

Recursos	Valor R\$ (07/08/2014)
Balança analítica	3.681,00
(B.O.D.)	3.139,00
Deionizador	649,99
Autoclave	2.490,00
Microscópio óptico	2.495,00
Bico de Bunsen	34,90
Botijão de gás	145,50
Válvula de gás + mangueira	14,40
Capela de fluxo laminar	13.490,00
Agitador magnético	1400,00
Alça de platina	99,90
Cabo de Kolle	15,52
Erlenmeyer (500mL)	13,80
Papel filme	3,50
Placa de petri (9 cm)	9,00
Luva p/ procedimento	24,00
Espátula	19,80
Béquer (200 mL)	7,80
Proveta (100 mL)	39,62
Barra magnética	11,90
Tamis	76,51
Seringa 20 mL c/ agulha	4,65
Papel filtro	5,49
Gaze estéril	6,10
Câmara de Neubauer	69,90
Frasco Scoth	16,90
Funil simples	5,90
Total	27.970,08

Fonte: Autor, 2014.

Os custos referentes aos insumos estão relacionados nas tabelas 17 e 18.

TABELA 17 – Custo variável de produção de suspensões de conídios de *B. bassiana* em arroz.

Recurso	Quantidade	Valor R\$ (07/08/2014)
Arroz	10	21,00
Meio de cultura BDA	1	198,94
Material de limpeza	-	10,00
Total		229,94

Fonte: Autor, 2014.

TABELA 18 – Custo variável de produção de formulações nanoestruturadas contendo conídios de *B. bassiana*.

Recurso	Quantidade	Valor R\$ (07/08/2014)
Alginato de sódio	1	244,00
Bentonita sódica	1	27,32
Cloreto de cálcio	1	116,00
Meio de cultura BDA	1	198,94
Tween 80 [®]	1	69,00
Material de limpeza	-	10,00
Total		665,26

Fonte: Autor, 2014.

O custo para produção do produto formulado foi calculado como R\$28.635,34. Em comparação com o custo para pré-formulação, que foi de R\$28.541,89, representa uma diferença pequena em relação aos benefícios gerados pela aplicação da tecnologia avaliada neste estudo. De acordo com Batista Filho (1998), produtos que contenham princípios ativos utilizados no controle microbiano de pragas devem, além de proporcionar os benefícios citados anteriormente, ser de baixo custo.

6 CONCLUSÕES

- A matriz possui capacidade de encapsular grande quantidade de conídios, sem que haja interferência no seu processo de germinação;
- Análises de DRX mostraram que não houve intercalação do alginato nas lamelas da bentonita, mas as interações entre ambos foram elucidadas por FTIR, confirmando a formação do nanocompósito polimérico;
- A microscopia de fluorescência ilustrou a distribuição dos conídios por toda a matriz nanoestruturada;
- A adição da bentonita resultou em um aumento do rendimento e o aumento da sua concentração promoveu aumento da eficiência de encapsulação, ao passo que reduziu o índice de intumescimento dos *beads*;
- Todos os produtos apresentaram homogeneidade de tamanho, resultado da estreita faixa de polidispersão e o aumento da concentração de bentonita pareceu ser acompanhado por uma esferização dos *beads*;

- As concentrações mais altas do argilomineral (4 e 6%) propiciaram perfis de liberação modificados do fungo, havendo retardo tanto do início da germinação quanto de seu desenvolvimento;
- A adição de bentonita aumentou a estabilidade térmica dos produtos, e o produto da concentração mais alta de bentonita avaliada por 10 meses (AB4) manteve-se estável, ou seja, com germinação miceliana normal, por todo o período quando sob refrigeração, ou por 5 meses quando em temperatura ambiente;
- A aplicação de tecnologia e consequente agregação de valor ao produto formulado, não representou aumento significativo nos custos produtivos, característica essencial para produtos formulados.

A matriz testada mostrou-se promissora na encapsulação de ingredientes ativos, agregando valor aos produtos formulados. Novas metodologias para a aplicação de técnicas sofisticadas puderam ser desenvolvidas durante a realização dos ensaios. Estudos adicionais ainda são necessários e incluem, dentre eles, a avaliação da cinética de liberação dos conídios.

REFERÊNCIAS

- AGROFIT- Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins/DFIA/SDA. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> Acesso em: 07/02/2014.
- AGROLINK, 2014. Anel vermelho. Disponível em: <http://www.agrolink.com.br/agricultura/problemas/busca/anel-vermelho_2990.html>. Acesso em: 14/02/2014
- ALEXANDRE, M.; DUBOIS, P. Polymer-layered silicate nanocomposites: preparation, properties and uses of a new class of materials. **Materials Science and Engineering**. v.28, p.1-63, 2000.
- ALMEIDA, J. E. M.; FILHO, A. B. Banco de Microrganismos Entomopatogênicos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. n.20, mai./jun., 2001.
- ALMEIDA, J.E.M. et al. Formulações de entomopatógenos na América Latina. In: ALVES, S.B. **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba, SP, FEALQ, 2008. cap. 10, p.257 - 272.
- ALMEIDA A.M.B. et al. Susceptibilidade de *Rhynchophorus palmarum* à ação de *Metarhizium anisopliae* e compatibilidade do entomopatógeno com agrotóxicos utilizados na cultura da banana. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v.77, n.4, p.661-668, 2010.
- ALVES, R.T et al. Effects of different formulations on viability and medium-term storage of metarhizium anisopliae conidia. **Neotropical Entomology**. v.31, n.1, p.91-99, 2002.
- ALVES, R.T. Formulação e armazenamento de fungos entomopatogênicos. In: Simpósio de Controle Biológico, 8, 2003, São Pedro, SP. **Livro de resumos do 8º Simpósio de Controle Biológico**. Piracicaba, SP: Sociedade Entomológica do Brasil – SEB, 2003, p.54.
- ALVES S.B.; PEREIRA, R.M. Produção de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill em bandejas. **Ecossistema**. v.14, p.188-192, 1989.
- ALVES, S. B. et al. Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina. In: (Ed). **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba, SP, FEALQ, 2008. p.69-110.
- ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: _____. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba, SP, FEALQ, 1998, cap.11, p.289 - 381.
- ALVES, S. B.; et al. Delayed Germination of *Beauveria bassiana* Conidia after Prolonged Storage at Low, Above-freezing Temperature. **Biocontrol Science and Technology**. v.6, p.575-581, 1996.
- ARAGÃO, W. M. COCO: pós-colheita. Brasília DF: **Embrapa Informação Tecnológica**. 2002, p.76.

- ARICA, M.Y.; KAÇAR, Y.; GENÇ, O. Entrapment of white-rot fungus *Trametes versicolor* in Ca-alginate *beads*: preparation and biosorption kinetic analysis for cadmium removal from an aqueous solution. **Bioresource Technology**. v.80, n.2, p.121-129, 2001.
- BAPTISTA, P. et al. *Beauveria bassiana*, fungo entomopatogênico da traça-da-oliveira em Trás-os-Montes: caracterização morfológica e molecular. In: Encontro Nacional de Produção Integrada: Encontro Nacional de Proteção Integrada, 1, 2008. **Ponte de Lima: Escola Superior Agrária**. p.418-424.
- BATISTA FILHO, A et al. Formulações de entomopatógenos. In: ALVES, S.B. (Ed.) **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba, SP, FEALQ, 1998. cap.11, p.917-965.
- BARBARIN, A.M. et al. A preliminary evaluation of the potential of *Beauveria bassiana* for bed bug control. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.111, i.1, p.82-85, 2012.
- BENETTI, F.; PAGOTTO, J.F. O anel vermelho e os coqueiros. Revista Eletrônica de Ciências. n.32. Disponível em: <http://cdcc.sc.usp.br/ciencia/artigos/art_32/aprendendo1.html>. Acesso em: 06/02/2014.
- BORGES, L.R. **Eficiência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycota) para o controle de *Hedypathes betulinus* (Keug) (Coleoptera: Cerambycidae) em erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Arquifoliaceae)**. 2007. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.
- BOTTAN, R. et al. Síntese e Caracterização de Nanocompósitos Esfoliados de Poliestireno – Hidróxido Duplo Lamelar Via Polimerização *In Situ*. **Polímeros**. v.1, p.1-10, 2011.
- BRESSEL, T. A. B. **Sistema gerador de microcápsulas de alginato**. 2007. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.
- BURI, P.; DOELKER, E. Formulation des comprimés à libération prolongée II. Matrices hydrophiles. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**. Amsterdam, v.55, n.7-8, p.189-197, 1980.
- CABALLERO, F. et al. Characterization of alginate *beads* loaded with ibuprofen lysine salt and optimization of the preparation method. **International Journal Pharmaceutics**. v.460, p.181-188, 2014.
- CALERO, J. et al. Elaboración y Caracterización de Microcápsulas Gastroresistentes de Diclofenac Obtenidas por Gelificación Iónica, **Universitas**. vol.1, p.27-30, 2008.
- CASTRO, J. M. C.; LIMA C. R. F.; SANTANA, M. L. M. P. Nematóide do Anel Vermelho do Coqueiro e Medidas de Manejo. **Instruções Técnicas da Embrapa Semiárido**. Petrolândia, Dezembro, 2009.
- CAVALCANTI, O.A. et al. Polysaccharides as excipients for colon-specific coatings, permeability and swelling properties of casted films, **Drug Development and Industrial Pharmacy**. v.28, p.157-164, 2002.
- CÉSPEDES, F.F. et al. Bentonite and anthracite in alginate-based controlled release formulations to reduce leaching of chloridazon and metribuzin in a calcareous soil. **Chemosphere**. v.92, p.918-924, 2013.

- CONSTANSKI, K. C. et al. Seleção da virulência de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. submetidos a diferentes temperaturas. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina, v.32, n.3, p.875-882, 2011.
- COUTINHO, A. et al. **Produção de Biopesticidas**: Projecto FEUP. Dissertação (Mestrado integrado em engenharia química) Universidade do Porto, Porto, 2010.
- DE JAEGER, N. et al. Co-entrapment of *Trichoderma harzianum* and *Glomus* sp. within alginate *beads*: impact on the arbuscular mycorrhizal fungi life cycle. **Journal of Applied Microbiology**. v.111, p.125-135, 2011.
- DUARTE, A. G. et al. Captura de *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: curculionidae) em armadilhas iscadas com o feromônio de agregação e compostos voláteis de frutos do abacaxi. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v.25, n.1, 2003.
- EMBRAPA. Boas práticas agrícolas para produção de alimentos seguros no campo: controle de pragas. **Embrapa Transferência de Tecnologia**. p.41. Brasília, 2005.
- EMBRAPA. Broca-do-olho-do-coqueiro: Praga potencial para as palmeiras com fins de produção de palmito. **Colombo: Embrapa Florestas**. Paraná. 2010.
- FAO 2011. World Production. Disponível em: <www.faostat.org.br>. Acesso em: 19/01/2014
- FARIA, M. R.; MAGALHÃES, B. P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. **Biociência**. v.22, 2001.
- FERNANDÉS-PÉRES, M. et al. Mobility of isoproturon from an alginate/bentonite controlled release formulation in layered soil. **Chemosphere**. v.41, p.1495-1501, 2000.
- FERREIRA, J. M. S.; WARWICK, D. R. N.; SIQUEIRA, L. A. A cultura do coqueiro no Brasil. **Embrapa-SPI**, Brasília, 2.ed. p.292, 1998.
- FERREIRA, J. M. S. (Ed.) Coco: fitossanidade. **Embrapa Informação Tecnológica**. p.136, 2002a.
- FERREIRA, J. M. S. Controle Biológico do Agente Transmissor do Nematóide Causador do Anel-vermelho-do-coqueiro. **Embrapa Tabuleiros Costeiros**. Circular Técnica 31. Aracaju, Sergipe. 2002b.
- FERREIRA, J. M. S. Sistema de Captura do *Rhynchophorus palmarum* com Armadilha Tipo Pet. **Embrapa Tabuleiros Costeiros**. Cartilha. 2007.
- FONTENELE, R. E. S. Cultura do coco no Brasil: caracterização do mercado atual e perspectivas futuras. In: Congresso Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural (SOBER), 43, 2005, Ribeirão Preto-SP, **Anais**. Brasília: SOBER, 2005.
- GROVER, C.N.; CAMERON R.E.; BEST, S. N. Investigating the morphological, mechanical and degradation properties of scaffolds comprising collagen, gelatin and elastin for use in soft tissue engineering. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**. v.10, p.62-74, 2012.
- GÜERRI-AGULLÓ, B. et al. Infection of the Red Palm Weevil (*Rhynchophorus ferrugineus*) by the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*: A SEM Study. **Microscopy Research and Technique**. v.73, p.714-725, 2010.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S, R. **Princípios de análise instrumental /** tradução Celio Pasquini [coordenação]; Jarbas José Rodrigues Rohwedder ... [et al.]. – 6. ed. – Porto Alegre : Bookman. 1056p. ; il. ; 28 cm. ISBN 978-85-7780-460-3, 2009.

IBGE. Produção Agrícola Municipal – Culturas Temporárias e Permanentes. **IBGE**, Rio de Janeiro, v. 39, p.1-101, 2012.

JAN, T.H.H.K. Alginate in drug delivery systems, **Drug Development and Industrial Pharmacy**. v.28, p.621-630, 2002.

JANEIRO, A. I. **Vetores líidicos para administração tópica de corticosteroides**. 2011. Monografia (Licenciatura em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2011.

KAMINSKI, G. A. T. et al. Obtenção, avaliação e recuperação de micropartículas de alginato-poloxâmérico utilizando técnica de emulsão a/o. **Visão Acadêmica**. Curitiba, v.10, n.2, 2009.

KAWAGUTI, H. Y.; SATO, H. H. Produção de isomaltose, um substituto da sacarose, utilizando glicosiltransferase microbiana. **Química Nova**. v.31, n.1, p.134-143, 2008.

KEVADIYA, B. D. et al. Montmorillonite-Alginate Nanocomposites as a Drug Delivery System: Intercalation and In Vitro Release of Vitamin B₁ and Vitamin B₆. **Journal of Biomaterials Applications**. v.25, 2010.

LAZO, M. L. S. R. **Caracterização e Patogenicidade de Fungos Entomopatogênicos Isolados do Percevejo-Bronzeado do Eucalipto, *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae)**. 2012. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Proteção de Plantas) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

LEE, K.H. et al. Enhanced production of bioethanol and ultrastructural characteristics of reused *Saccharomyces cerevisiae* immobilized calcium alginate *beads*. **Bioresource Technology**. v.102, p.8191-8198, 2011.

LEONE G.; BARBUCCI R. Polysaccharide based hydrogels for biomedical applications. In: Hydrogels: Biological Properties and Applications. **Chemistry and Materials Science**. p.25-41, 2009.

LI, H.; HUANG, D.; WANG, Z. Potential of *Beauveria bassiana* for control of *Apriona germari*. **Frontiers of Agriculture in China**. v.5, n.4, p.666-670, 2011.

LOIOLA, C. M. **Comportamento de cultivares de coqueiro (*Cocos nucifera* L.) em diferentes condições agroecológicas dos Tabuleiros Costeiros do Nordeste Brasileiro**. 2009. Dissertação (mestrado em agroecossistemas) – Universidade Federal de Sergipe. São Cristóvão, 2009.

LONKAR, S. P. et al. Preparation and nonisothermal crystallization behavior of polypropylene/layered double hydroxide nanocomposites. **Polymer**. v.50, p.1505–1515, 2009.

MLADENOVSKA, K. et al. 5-ASA loaded chitosan–Ca–alginate microparticles: Preparation and physicochemical characterization. **International Journal of Pharmaceutics**. v.345, p.59–69, 2007.

- MARTINS, C. R.; JESUS JÚNIOR, L. A. Evolução da produção de coco no Brasil e o comércio internacional : panorama 2010. **Embrapa Tabuleiros Costeiros**, Aracajú, 2011.
- MELO I. S.; COSTA. F. G. Desenvolvimento de uma formulação granulada a base de *Trichoderma harzianum* para controle de fitopatógenos. **Embrapa Meio Ambiente**. Comunicado Técnico 31. ISSN 1516-8638, Jaguariúna-SP, 2005.
- MENEZES R. R. et al. Argilas bentoníticas de Cubati, Paraíba, Brasil: Caracterização físico-mineralógica. **Cerâmica**. v.55, p.163-169, 2009.
- MOEBUS, K.; SIEPMANN, J.; BODMEIER, R. Alginate-poloxamer microparticles for controlled drug delivery to mucosal tissue. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v.72, p.42-53, 2009.
- MOLIM, I. L. D.; BARRETO, M. R. Ocorrência e controle de *Curculionidae* em *Cocos nucifera* L. em Sinop, Mato Grosso. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v.33, n.1, p.53-64, 2012.
- MORETINE, A.; MELO, I.S. Formulação do fungo *Coniothyrium minitans* para controle do mofo-branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.2, p.155-161, 2007.
- NEGRISOLI-JÚNIOR, A. S. et al. Criação em laboratório da broca-do-olho-do-coqueiro *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) visando pesquisas para o controle das suas larvas, 2011. In: CINTRA, F. L. D. et al. (Ed.). **Fundamentos tecnológicos para a revitalização das áreas cultivadas com coqueiro gigante no nordeste do Brasil**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros. v.233, p.14-23, 2009.
- NEUMANN, M. G. et al. Interações entre corantes e argilas em suspensão aquosa. **Química Nova**. v.23, n.6, p.818-824, 2000.
- NEUMANN, R. et al. Caracterização Mineralógicas das Bentonitas Brasileiras. In: Encontro Nacional de Tratamento de Minérios e Metalurgia Extrativa, 19, 2002, **Anais...** Recife-Pernambuco Nov/2002.
- OEPP, 2005. *Rhynchophorus palmarum*. **European and Mediterranean Plant Protection Organization**. Boletim 35, p.468-471, 2005.
- OLIVEIRA, D.G.P. **Proposta de um protocolo para avaliação da viabilidade de conídios de fungos entomopatogênicos e determinação da proteção ao calor conferida a *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* pela formulação em óleo emulsionável**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências: Entomologia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo. Piracicaba. 2009.
- PAIVA, L. B.; MORALES, A. R.; DÍAZ, F. R. V. Argilas organofílicas: Características, metodologias de preparação, compostos de intercalação e técnicas de caracterização. **Cerâmica**, v.54, p.213-226, 2008.
- PASQUALIM, P et al. Microcápsulas de Alginato de Cálcio e Óleo Vegetal Pela Técnica de Gelificação Iônica: Um Estudo da Capacidade de Encapsulamento e Aplicação Dermatológica. **Visão Acadêmica** v.11, p.23-37, 2010.

- PATEL, H. A.; SOMANI, R. S.; BAJAJ, H. C.; JASRA, R. V. Preparation and Characterization of Phosphonium Montmorillonite with Enhanced Thermal Stability, **Applied Clay Science**. v.35, p.194–200, 2007.
- PICANÇO, M. C. Manejo integrado de pragas. **Apostila do Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa**. p.144, 2010.
- RAMOS, S. R. R. et al. Banco Ativo de Germoplasma de Coco. **Embrapa Tabuleiros Costeiros**, Cartilha, 2009.
- RANASINGH, N. Biopesticides : an Economic Approach for Pest Management. **Orissa Review**, 2007.
- RAY, S. S.; BOUSMINA, M. Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites: In greening the 21st century materials world. **Progress in Materials Science**. v.50, p.962–1079, 2005.
- ROSETTO, E. et al. Caracterização de argilas bentonitas e diatomitas e sua aplicação como adsorventes. **Química nova**. v.32, n.8, 2009.
- SAÏD, I, et al. Structure and function of the antennal sensilla of the palm weevil *Rhynchophorus palmarum*(Coleoptera, Curculionidae). **Journal of Insect Physiology**. v.49, p.857–872, 2003.
- SAUSEN, T.R. **Desenvolvimento de comprimidos de clozapina obtidos pelo método de compressão direta**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas: Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos). Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2007.
- SHAWKY, H.A. Improvement of Water Quality Using Alginate/Montmorillonite Composite *Beads*. **Journal of Applied Polymer Science**. v.119, p.2371-2378, 2011.
- SILVA, A. B., et al. Controle biológico da broca do olho do coqueiro e dendezeiro, *Rhynchophorus palmarum* (L., 1764), em dendezaís, no município de Igarapé-Açu, Pará. **Belém: Embrapa Amazônia Oriental**, Comunicado Técnico, n. 36. 2000.
- SILVA, M. S. et al. Nanopartículas de alginato como sistema de liberação para o herbicida clomazone. **Química Nova**, v.33, n.9, p.1868-1873, 2010.
- SINGH, B.; SHARMA, D. K.; GUPTA, A. A study towards release dynamics of thiram fungicide from starch-alginate *beads* to control environmental and health. **Journal of Hazardous Materials**. v.161, p.208-216, 2009a.
- SINGH, B.; SHARMA, D. K.; KUMAR, R.; GUPTA, A. Controlled release of the fungicide thiram from starch-alginate-clay based formulation. **Applied Clay Science**, v.45, p.76-82, 2009b.
- SIQUEIRA, L. A.; ARAGÃO, W. M.; TUPINAMBÁ, E. A. A Introdução do coqueiro no Brasil, importância histórica e agrônômica. **Embrapa Tabuleiros Costeiros**. Documento 47, Aracaju, SE: p.24, 2002.
- SODRÉ, J. B.; **Morfologia das palmeiras como meio de identificação e uso paisagístico**. 2005. Monografia (Especialização em Plantas Ornamentais e Paisagismo) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2005.

SOSA-GÓMEZ, D. R. Seletividade de agroquímicos para fungos entomopatogênicos. **Embrapa Soja**. Londrina, 2005.

TAN, W.S.; TING, A.S.Y. Alginate-immobilized bentonite clay: Adsorption efficacy and reusability for Cu(II) removal from aqueous solution. **Bioresource Technology**. 2014.

THANED, P.; SATIT, P. Sodium Alginate–magnesium Aluminum Silicate Composite Gels: Characterization of Flow Behavior, Microviscosity, and Drug Diffusivity, **American Association of Pharmaceutical Scientists Tech**. v.8, n.3, 2007.

VALICENTE, F.H.; CRUZ, I. Efeito da radiação ultra-violeta na esterilização do *Baculovirus Spodoptera*. In: Embrapa Milho e Sorgo-Resumo em anais de congresso (ALICE). In: Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 19, Reunião Técnica Anual de Milho, 37, Reunião Técnica Anual do Sorgo, 21, 1992, Porto Alegre. **Resumos**. Porto Alegre: SAA, 1992, p.73.

VALICENTE, F. H. Controle biológico de pragas com entomopatógenos. **Informe Agropeuário**. Belo Horizonte, v.30, n.251, p.48-55, 2009.

VICINI, G. **Otimização da Produção de Esporos do Fungo *Clonostachys rosea*** – Um Biopesticida para Cultivo do Morangueiro. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) – Curso de Pós-Graduação em Ciências: Bioquímica, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2004.

VIEIRA, P. D.S. et al. Estudo da caracterização morfológica, esporulação e germinação dos conídios de *Metarhizium anisopliae* var. *Acridum* em diferentes temperaturas. **Biológico**. São Paulo, v.71, n.1, p.43-47, 2009.

VIJAYAN, V. et al. Preparation and characterization of Anti Diabetic Drug Loaded Solid lipid Nanoparticles. **JITPS**. v.1 n.8, p.320-328. 2010.

VILANOVA, J. C. O. et al. Síntese e caracterização de *beads* acrílicos preparados por polimerização em suspensão visando aplicação como excipiente farmacêutico para compressão direta. **Química Nova**. v.35, n.1, p.124-131, 2012.

WU, Z.; GUO, L.; QIN, S.; LI, C. Encapsulation of *R. planticola* Rs-2 from alginate-starch-bentonite and its controlled release and swelling behavior under simulated soil conditions. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v.39, p.317-327, 2012.

YUXIN, M. A. Preparation and characterization of PSf/clay nanocomposite membranes with PEG 400 as a pore forming additive. **Desalination**. v.286, p.131–137, 2012.

ANEXOS

ANEXO A – Artigo