



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL
CENTRO DE TECNOLOGIA - CTEC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MATERIAIS - PPGMAT
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA DE SISTEMAS CARREADORES DE
SUBSTÂNCIAS ATIVAS - TECNANO

DIOGO PORPINO CORDEIRO BATISTA

**CO-ENCAPSULAÇÃO BIOATIVO/FEROMÔNIO EM NANOCOMPÓSITO
POLÍMERO/SILICATO LAMELAR**

Maceió

2019

DIOGO PORPINO CORDEIRO BATISTA

**CO-ENCAPSULAÇÃO BIOATIVO/FEROMÔNIO EM NANOCOMPÓSITO
POLÍMERO/SILICATO LAMELAR**

Defesa de tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Materiais da Universidade Federal de Alagoas, como requisito final para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Professora Dr.^a Camila Braga
Dornelas

Co-orientadora: Professor Dr.^a Rusiene
Monteiro de Almeida

Maceió

2019

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

- B333c Batista, Diogo Porpino Cordeiro.
Co-encapsulação bioativo/feromônio em nanocompósito polímero/silicato lamelar / Diogo Porpino Cordeiro Batista. – 2019.
[116] f. : il.
- Orientadora: Camila Braga Dornelas.
Co-orientadora: Rusiene Monteiro de Almeida.
Tese (doutorado em Materiais) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Materiais. Maceió, 2019.
- Inclui bibliografias.
Anexos: f. [96]-[112].
1. *Rhynchophorus palmarum*. 2. Fungos entomopatogênicos. 3. Rincoforol. 4. Silicatos. I. Título.

CDU: 661.183.6

Diogo Porpino Cordeiro Batista

**CO-ENCAPSULAÇÃO BIOATIVO/FEROMÔNIO EM
NANOCOMPÓSITO POLÍMERO/SILICATO LAMELAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Materiais da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 16 de Maio de 2019.

BANCA EXAMINADORA



Prof^ª. Dr^ª. Camila Braga Dornelas (Orientadora - PPGMateriais/UFAL)



Prof^ª. Dr^ª. Rusiene Monteiro de Almeida (Co-orientadora - PPGMateriais/UFAL)



Prof^ª. Dr^ª. Luciano Aparecido Meireles Grillo (Esenfar/UFAL)



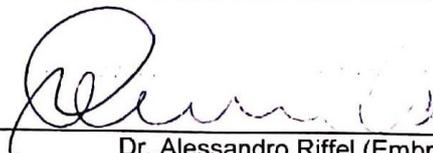
Prof^ª. Dr^ª. Ruth Rufino do Nascimento (IQB/UFAL)



Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana (CECA/UFAL)



Prof. Dr. Johnnatan Duarte de Freitas (IFAL)



Dr. Alessandro Riffel (Embrapa)

*Dedico este trabalho à minha família, base de tudo que sou.
A minha parceira, amiga, companheira, noiva, esposa e eterna
namorada Amanda e a mais nova integrante da gangue,
nossa bebê Helena, que ainda nem chegou mas já é a
coisinha mais amada deste mundo. E finalmente, aos meus
orientadores Camila e Luciano, que se tornaram grandes
amigos durante esta longa e exaustiva jornada.*

AGRADECIMENTOS

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

Agradeço à mulher da minha vida, Amanda Carlos, mais que uma esposa, uma cúmplice, que nos presenteará em breve com nossa bebê Helena, tão amada e esperada com ansiedade. A meu filho e parceiro Pedro Neto, amo vocês!

Agradeço aos meus pais, Márcia e Pedro, por terem me proporcionado amor incondicional, acesso à educação e sabedoria pra escolher o sapato adequado para trilhar o caminho escolhido, não importando ele qual fosse. A meu irmão Douglas, parceiro e exemplo a ser seguido. A todos os familiares que me ajudaram de forma direta ou indireta nessa jornada.

A todos os amigos, da faculdade de Farmácia, do TecNano e aos que a vida colocou no meu caminho nestes 35 anos e que estão comigo sempre, tanto nos momentos alegres quanto nos momentos difíceis. Aos amigos e parceiros de bancada Ingrid Vieira e Lucas Tenório.

Agradeço a todos os professores, grandes mestres do saber, que me deram o embasamento intelectual para que eu me tornasse o profissional que sou. Especialmente a meus orientadores, Camila Braga, por suportar minhas peculiaridades (hehehehe), Rusiene Monteiro, por ter embarcado nessa louca empreitada e Luciano Meireles, por ter creditado esperança em mim apesar de tantas barreiras existentes na época (tudo começou ali).

Ao CNPq, CAPES, FINEP e FAPEAL, pelo apoio financeiro. A Embrapa Tabuleiros Costeiros pelo apoio científico e metodológico e aos parceiros de pesquisa que tornaram este trabalho possível: Eduardo Jorge (IF), Emiliano Barreto (ICBS), Adriana Ribeiro, Euzébio Goulart, Henrique Goulart (IQB) Ticiano Gomes, Irinaldo Basílio, João Xavier, Sâmia Andrícia, Valter Alvino (ESENFAR), Ana Ribeiro (IF) e Thyago Ribeiro (IQB) e a todos que possam ter ajudado de alguma forma na realização deste trabalho e que eu possa estar esquecendo de mencionar aqui.

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

RESUMO

A cultura do coco (*Cocos nucifera* L) merece grande destaque no cenário nacional, sobretudo por sua importância econômica, social e ambiental. Infestações pela broca-do-olho-do-coqueiro (*Rhynchophorus palmarum*) causam grandes prejuízos aos agrossistemas que cultivam esta aracacea. Existe uma grande carência de produtos empregados no seu controle, sendo o feromônio sintético de agregação, Rincoforol, o único produto registrado para tal. A utilização de agentes entomopatogênicos, como o fungo *Beauveria bassiana*, tem se mostrado promissora no Manejo Integrado de Pragas (MIP). Seu encapsulamento em nanocompósitos polímero-silicato lamelar (PLN) proporciona proteção ao bioativo à fatores deletérios, garante maior aderência e permanência do produto no local de ação e maior eficácia no controle populacional da praga. Desta forma, o presente trabalho objetivou desenvolver e avaliar um nanocompósito co-encapsulado contendo o bioativo em associação ao Rincoforol. *Beads* foram formados pela técnica de gelificação ionotrópica seguida de secagem por liofilização, sendo testadas diferentes concentrações de silicato lamelar. Os produtos foram avaliados por difratometria de raios X, espectroscopia de infravermelho, rendimento, índice de intumescimento, morfologia, quantificação do Rincoforol, estudo de liberação dos conídios. A exposição direta ao Rincoforol demonstrou efeito deletério na viabilidade, havendo retardo ou até mesmo inviabilidade dos conídios. Contudo, efeito protetor foi alcançado a partir da encapsulação destes na matriz polímero/silicato lamelar, sobretudo para maior concentração de argila testada, 6%. DRX e FTIR foram essenciais na elucidação das interações entre os componentes da matriz. A bentonita proporcionou melhor rendimento das formulações. Também, atuou como reforço estrutural da rede polimérica, gerando *beads* com maior grau de esferização e diminuindo a captação de água por retardar o relaxamento da rede polimérica, fenômeno essencial na obtenção de controle de liberação dos ativos. A eficiência de encapsulação do feromônio e do bioinseticida aumentaram de forma proporcional ao maior teor de silicato incorporado, bem como houve modulação da volatilização do Rincoforol. A distribuição do bioativo na matriz, observada por microscopia de fluorescência, se deu de forma homogênea, caracterizando um perfil monolítico. Crioproteção frente aos efeitos deletérios do congelamento aplicado na liofilização foi alcançada no produto F6, corroborando com o efeito protetor visto na exposição ao feromônio. Desta forma, a matriz de encapsulação demonstra grande potencial para co-encapsulação de bioativos e produção de dispositivos eficazes para liberação de feromônios.

Palavras-chave: *Beauveria bassiana*; Rincoforol; Nanocompósito polímero/silicato lamelar; Co-encapsulação; Controle de liberação.

ABSTRACT

The coconut (*Cocos nucifera* L.) culture deserves a special mention in the national scenario, mainly because of its economic, social and environmental importance. Infestations by borer-eye-of-coconut (*Rhynchophorus palmarum*) cause great damage to the agrosystems that cultivate this palmácea. There is a great lack of products used in its control, being the synthetic aggregation pheromone, Rhynchophorol, the only registered product for such. The use of entomopathogenic agents, such as the fungus *Beauveria bassiana*, has been shown to be promising in Integrated Pest Management (IPM). Its encapsulation in Polymer-layered Silicate Nanocomposite (PLN) provides bioactive protection to deleterious factors, ensures greater adhesion and permanence of the product at the site of action and greater effectiveness in the population control of the pest. Thus, the present work aimed to develop and evaluate a co-encapsulated nanocomposite containing the bioactive in association with Rhynchophorol. Beads were formed by the ionotropic gelation technique followed by lyophilization drying, and different concentrations of lamellar silicate were tested. The products were evaluated by X-ray diffractometry, infrared spectroscopy, yield, swelling index, morphology, Rhynchophorol quantification and conidia release study. Direct exposure to Rhynchophorol demonstrated a deleterious effect on viability, with delay or even non-viability of conidia. However, protective effect was achieved by encapsulating these in the polymer matrix / lamellar silicate, especially for the highest concentration of clay tested, 6%. DRX and FTIR were essential in elucidating the interactions between the components of the matrix. Bentonite provides the improved yield of the formulations. In addition, it acts as a structural reinforcement of the polymer network, generating beads with greater degree of spherization and decreasing the water uptake by delaying the relaxation of the polymer network, an essential phenomenon in obtaining control of the release of the assets. The efficiency of encapsulation of the pheromone and of the bioinsecticide increased proportionally to the higher content of incorporated silicate, as well as there was modulation of the volatilization of Rhynchophorol. The distribution of the bioactive in the matrix, observed by fluorescence microscopy, was homogeneous, characterizing a monolithic profile. Cryoprotection against the deleterious effects of freezing applied on lyophilization was achieved in product F6, corroborating with the protective effect seen in pheromone exposure. In this way, the encapsulation matrix demonstrates great potential for co-encapsulation of bioactives and production of effective pheromone releasing devices.

Keywords: *Beauveria bassiana*; *Rhynchophorol*; *Polymer-layered silicate nanocomposites*; *Co-encapsulation*; *Control release*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Avanço do cultivo de coqueiros nos estados brasileiros.....	18
Figura 2 – Área plantada e produção do coco no Brasil de 1990 a 2012.....	19
Figura 3 – Ciclo de desenvolvimento e reprodução do <i>R. palmarum</i>	21
Figura 4 – Dimorfismo sexual de adultos de <i>Rhynchophorus palmarum</i> . As inserções detalham a probóscide (rosto) ligeiramente menor e com ausência de pelos nas fêmeas e a presença de pelos na proboscide do macho.....	22
Figura 5 – a) Nematóide <i>Bursaphelenchus cocophilus</i> ; b) corte na estipe do coqueiro mostrando o anel vermelho no floema; c) coqueiro acometido apresentando folhas laterais da copa amareladas e quebradas; d) enfraquecimento e quebra da ráquis, indicando morte do coqueiro.....	24
Figura 6 – Estrutura e propriedades físico-químicas do Rincoforol.....	30
Figura 7 – Esquema de armadilhas tipo alçapão: a) balde; b) garrafa PET.....	32
Figura 8 – Macho adulto de <i>R. palmarum</i> parasitado pelo fungo <i>B. bassiana</i>	37
Figura 9 – Estrutura e conformação de ligações glicosídias do ácido β -D-manurônico e do α -L-gulurônico.....	45
Figura 10 – Estrutura do alginato e suas ligações aos íons cálcio no modelo “egg-box”.....	46
Figura 11 – Microestrutura da montmorilonita.....	48
Figura 12 – Diagrama esquemático geral das argilas tipo esmectita 2:1.....	49
Figura 13 – Tipos de compósitos formados a partir de modificações estruturais em argilas.....	52
Figura 14 – Esquema de produção dos <i>beads</i> co-encapsulados demonstrando a metodologia e os materiais utilizados, o processo de gelificação ionotrópica e o processo de secagem dos <i>beads</i>	58
Figura 15 – Aspecto macroscópico de <i>B. bassiana</i> com 14 dias em substrato BDA (a) e microscópico a partir de microcultivo em BDA (b).....	64

Figura 16 – Difratoogramas de raios X de pós dos materiais de partida, alginato e bentonita, e dos formulações co-encapsuladas, F0, F2, F4 e F6.....	67
Figura 17 – Espectros de FTIR dos materiais de partida utilizados no preparo dos produtos co-encapsulados: Alginato de sódio, bentonita e Rincoforol.....	69
Figura 18 – Espectros de FTIR dos produtos formulados: a) Produtos F0; b) Produtos F2; c) Produtos F4 e d) Produtos F6.....	71
Figura 19 – Índice de intumescimento dos produtos formulados: a) Produtos F0; b) Produtos F2; c) Produtos F4 e d) Produtos F6.....	74
Figura 20 – Morfologia e esfericidade dos <i>beads</i> co-encapsulados contendo diferentes concentrações de bentonita: a) F0; b) F2; c) F4 e d) F6. Note a tendência de esferização com o aumento de teor do silicato.....	75
Figura 21 – MEV dos <i>beads</i> compostos por matrizes com diferentes concentrações de bentonita: a) <i>bead</i> F0 com aumento de 40x; b) F0 com aumento de 1000x demonstrando superfície com menor rugosidade; c) <i>bead</i> F4 com aumento de 40x; d) F4 com aumento de 1000x demonstrando maior rugosidade.....	76
Figura 22 – Curva de calibração do Rincoforol.....	77
Figura 23 – Concentração de Rincoforol volatilizado e retido no adsorvente.....	79
Figura 24 – Imagens de microscopia de fluorescência de conídios corados com IP encapsulados na matriz em diferentes aumentos. <i>Bead</i> F4 seco – a) e b); <i>bead</i> F4 intumescido – c) e d). Note o perfil de distribuição monolítica dos conídios na matriz.....	80
Figura 25 – Imagens de microscopia de fluorescência de conídios fixados em lâmina e corac com IP.....	81
Figura 26 – Teste de liberação dos conídios de <i>B. bassiana</i> encapsulados em matrizes com diferentes concentrações de bentonita. <i>Beads</i> contendo apenas conídios encapsulados semeados em BDA: a) F0c após 17 horas; b) F0c após 25 horas; c) F0c após 50 horas; d) F4c após 17 horas; e) F4c após 25 horas; f) F4c após 50 horas. As inserções em vermelho indicam o crescimento das primeiras hifas em consequência da liberação dos conídios.....	82

Figura 27 – Placas de Petri contendo BDA utilizadas na liberação dos conídios de *B. bassiana* encapsulados em matrizes com diferentes concentrações de bentonita: a) produtos F0 após 50 horas; b) produtos F0 após 66 horas; c) produtos F4 após 50 horas; d) produtos F4 após 66 horas. As letras na parte superior de cada imagem indicam beads: T – Co-encapsulados; B – branco; C – controle.....82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produção, área colhida e produtividade dos principais países produtores de coco, em 2012.....	18
Tabela 2 – Pragas agrícolas susceptíveis a <i>B. bassiana</i> e principais culturas afetadas.....	36
Tabela 3 – Pragas domésticas susceptíveis a <i>B. bassiana</i>	36
Tabela 4 – Suscetibilidade dos conídios de <i>B. bassiana</i> a exposição direta ao Rincoforol. As alíquotas da mistura Rincoforol/suspensão que não demonstraram germinação foram marcadas na tabela como NV (não-viável).....	65
Tabela 5 – Características gerais dos <i>beads</i> co-encapsulados preparados com concentrações variadas de bentonita.	66
Tabela 6 – Palavras-chave utilizadas na revisão patentária e números de patentes encontradas na base de dados da WIPO.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MIP	Manejo Integrado de Pragas
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (<i>Food and Agriculture Organization</i>)
pH	potencial Hidrogeniônico
t	tonelada
ha	hectare
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
PAM	Produção Agrícola Municipal
mm	milímetros
cm	centímetros
Agrofit	Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários
PET	politereftalato de etileno
PLGA	poli(ácido lático-co-ácido glicólico)
SPLAT	Tecnologias especializadas na aplicação de feromônios e iscas (<i>Specialized Pheromone and Lure Application Technology</i>)
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
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
ATR	Refletância Total Atenuada (<i>Attenuated Total Reflectance</i>)
GC-MS	Cromatografia Gasosa com Espectrômetro de Massa (<i>Gas chromatography–mass spectrometry</i>)
eV	elétron-Volt
m/z	razão massa/carga
rpm	rotações por minuto

M	molar
DRX	difração de raios X
kV	quilovolts
mA	miliampere
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
g	grama
v	volume
T _g	transição vítrea
WIPO	Organização Mundial da Propriedade Intelectual (<i>World Intellectual Property Organization</i>)
PCT	Tratado de Cooperação Internacional de Patentes (<i>Patent Cooperation Treaty</i>)
Y%	rendimento
SF	fator de esfericidade
EE%	eficiência de encapsulação
Ii%	índice de intumescimento
UV	ultravioleta
Mt	montmorilonita

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	Coqueiro	17
2.2	Controle de pragas.....	24
2.2.1	Controle químico.....	26
2.2.2	Controle comportamental.....	27
2.2.3	Controle biológico.....	32
2.2.3.1	Fungos entomopatogênicos.....	34
2.2.3.1.1	<i>Beauveria bassiana</i>	35
2.2.3.1.2	Produto à base de fungos entomopatogênicos.....	38
2.2.3.2	Encapsulamento de bioativos.....	40
2.2.3.3	Nanocompósitos.....	42
2.2.3.3.1	Alginato.....	44
2.2.3.3.2	Bentonita sódica.....	48
2.3	Formulações co-encapsuladas.....	53
3	OBJETIVOS	55
3.1	Objetivo geral	55
3.2	Objetivos específicos	55
4	MATERIAL E MÉTODOS	56
4.1	Material	56
4.2	Métodos	56
4.2.1	Microrganismo e meio de cultura.....	56
4.2.1.1	Teste de susceptibilidade fúngica ao Rincoforol.....	57
4.2.1.2	Preparo das formulações co-encapsuladas.....	57
4.2.1.3	Análise estrutural.....	59
4.2.1.3.1	Difratometria de raios X (DRX).....	59
4.2.1.3.2	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (<i>FTIR</i>).....	59
4.2.1.4	Rendimento das formulações.....	60
4.2.1.5	Índice de intumescimento (Ii%).....	60
4.2.1.6	Morfologia dos <i>beads</i> – Estereoscopia, tamanho de partículas, esfericidade e MEV.....	60

4.2.1.7	Recuperação do Rincoforol em câmara de aeração e quantificação por CG/MS.....	61
4.2.1.8	Distribuição dos conídios nos <i>beads</i> - Microscopia de fluorescência.....	62
4.2.1.9	Liberação do microorganismo.....	63
4.2.1.10	Revisão patentária.....	63
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1	Microrganismo e meio de cultura.....	64
5.1.1	Teste de susceptibilidade fúngica ao Rincoforol.....	64
5.1.2	Preparo das formulações co-encapsuladas.....	66
5.1.2.1	Análise estrutural.....	66
5.1.2.1.1	Difratometria de raios X (DRX).....	66
5.1.2.1.2	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (<i>FTIR</i>)	68
5.1.2.2	Rendimento das formulações.....	72
5.1.2.3	Índice de intumescimento (Ii%).....	72
5.1.2.4	Morfologia dos <i>beads</i> – Estereoscopia, tamanho de partículas, esfericidade e MEV.....	75
5.1.2.5	Recuperação do Rincoforol em câmara de aeração e quantificação por CG/MS.....	77
5.1.2.6	Distribuição dos conídios nos <i>beads</i> - Microscopia de fluorescência.....	80
5.1.2.7	Liberação do microorganismo.....	81
5.1.2.8	Revisão patentária.....	82
6	CONCLUSÕES	84
	REFERÊNCIAS	85
	ANEXOS	

1 INTRODUÇÃO

O cultivo do coqueiro (*Cocos nucifera* L.) ocupa lugar de destaque no mundo do agronegócio. Diversos produtos e inúmeras aplicações são possíveis a partir das matérias-primas derivadas deste vegetal, o que resulta em aproveitamento quase que completo de seus derivados. Esta versatilidade torna tal cultura extremamente importante para os produtores, já que aumenta consideravelmente a geração de empregos diretos e indiretos (FONTENELE, 2005; MARTINS & JESUS JÚNIOR, 2014). O Brasil desponta entre os quatro maiores produtores desta frutífera em escala mundial, ao lado de Indonésia, Filipinas e Índia, dentre cerca de 90 países que praticam esta cultura como agronegócio. Grande parte da produção nacional é proveniente de culturas de pequenos produtores. Estes, em sua grande maioria, não têm acesso a tecnologias recentes em consequência de limitação de recursos financeiros. A restrição financeira resulta em condições inadequadas de cultivo, como irrigação deficiente, adubação insuficiente e precário controle fitossanitário, fatores que impedem o total aproveitamento da matéria-prima e resultam em diminuição da produtividade (NEGRISOLI JÚNIOR et al., 2011).

Adicionalmente, a incidência de insetos-praga infestando as culturas aumenta ainda mais os prejuízos aos produtores. A broca-do-olho-do-coqueiro *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) é uma coleobroca que causa danos ao tecido vegetal. Ao se alimentar do tecido vegetal, esta praga causa dano mecânico ao coqueiro, que resulta em diminuição da produtividade e pode, por si só, levar a planta à morte. Adicionalmente, o *R. palmarum* pode veicular o nematoide *Bursaphelenchus cocophilus* (Nemata, Aphelenchida: Aphelenchoides), que causa a doença-do-anel-vermelho, letal para a planta (FERREIRA, 2002a).

A utilização integrada e racional de estratégias de controle disponíveis é prevista no Manejo Integrado de Pragas (MIP), que fundamenta-se em práticas de controle ecológico que objetivem minimizar uma possível adaptação de insetos ou doenças a uma estratégia defensiva em particular, interferindo minimamente no agrossistema (KOGAN, 1998). O uso de agentes entomopatogênicos apresenta aplicação consolidada e resultados significativos no controle populacional de pragas (ALVES et al., 2008). No caso do *R. palmarum*, destaca-se o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*, seu parasita natural (VEGA et al., 2009). Apesar disso, o único composto ativo registrado no MAPA com o objetivo de controle do *R. palmarum* é o

feromônio de agregação Rincoforol (6-metil-2-hepten-4-ol), por meio de estratégias de controle comportamental (ROCHAT et al., 1981; AGROFIT, 2017).

Um dos fatores limitantes que mais dificulta a introdução da *B. bassiana* na prática agrícola é a sua suscetibilidade a fatores externos (abióticos), como calor, radiação e umidade (VEGA et al., 2009). A principal estratégia para contornar este problema é a encapsulação do bioativo, especificamente neste caso, os conídios da *B. bassiana*. Tal prática pode proporcionar diversos benefícios, com a possibilidade de obtenção de características que potencializem sua aplicabilidade e aumentem o valor agregado do produto final, como proteção do microrganismo, aumento da estabilidade, melhorias nas propriedades mecânicas, maior adesividade do produto no local alvo e modulação da liberação dos conídios do fungo. Existe ainda a possibilidade de co-encapsulação de ativos distintos em uma mesma matriz. (SULTANA et al., 2000; ARICA et al., 2001; JIMÉNEZ-PRANTEDA et al., 2012; WU et al., 2012; BATISTA et al., 2014; HE et al., 2015). Uma recente abordagem no controle de insetos-praga é a utilização de tecnologias que visam atrair e matar o inseto-praga (*Attract-and-Kill Strategy*). Além da proteção proporcionada pela matriz, o quimioatratador e o agente de controle biológico encontram-se co-encapsulados no produto, o que pode resultar em atração do inseto para armadilha, infecção em massa de indivíduos e consequente controle populacional (SUKOVATA et al., 2012; SCHUMANN et al., 2012; KROSCHEL & ZEGARRA, 2013; MORRISON et al., 2016).

Estratégias de controle que possam potencializar o manejo desta praga sem que resultem, concomitantemente, em danos ambientais e à saúde dos produtores e consumidores, é de suma importância nos dias de hoje. Visando atender tais demandas e fundamentado no recente e promissor conceito de atrair e matar, o presente trabalho vem propor o desenvolvimento de formulações bioinseticidas co-encapsuladas de liberação modificada contendo conídios fúngicos de *B. bassiana* encapsulados em associação com feromônio de agregação de *R. palmarum* em nanocompósito polímero/silicato lamelar para uso no manejo integrado deste inseto-praga.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Coqueiro

O coqueiro, *Cocos nucifera* L. é uma monocotiledônea lenhosa que apresenta características típicas das Aracaceas, grupo vegetal de fácil distinção por apresentar morfologia extremamente peculiar em relação às demais espécies. É a única espécie do gênero *Cocos* (Arecaceae) pertencente à subfamília Cocoideae e apresenta duas variedades com bastante importância comercial, a variedade anã (*Nana*) e gigante (*Typica*), que resultam, ainda, em híbridos provenientes de cruzamentos entre as duas (PATEL, 1938).

O coqueiro é uma frutífera essencialmente de clima tropical e encontra-se bastante difundido ao redor do mundo, em grande parte devido a sua facilidade de cultivo e características climáticas e geológicas comuns a tais locais, a saber, a alta incidência de radiação solar, níveis de precipitação regulares associados a umidade do ar relativamente alta e predominância de terrenos arenosos (FONTENELE, 2005; MARTINS & JESUS JÚNIOR, 2014). Estima-se que 200 países cultivem este vegetal, dos quais 90 objetivam sua exploração comercial, de acordo com dados da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (*Food and Agriculture Organization* - FAO). A área total de plantio é de cerca de 12 milhões de hectares, o que faz com que o coqueiro desponte entre uma das 20 espécies vegetais com maior importância para humanidade (FAO, 2014).

A origem desta frutífera ainda é motivo de debate na literatura até os dias atuais, contudo, o continente asiático é o mais provável ponto de origem e ainda se destaca como principal região produtora, responsável por cerca de 72% da produção mundial (FAO, 2014). O produto derivado do coqueiro que representa maior importância econômica é o fruto, ou seja, o coco. A partir dele diversos subprodutos podem ser obtidos, como a água, o óleo e a polpa, predominantemente para o consumo humano, como também as fibras e o endossarão (camada dura, pétreo), para finalidades diversas (LOIOLA, 2009).

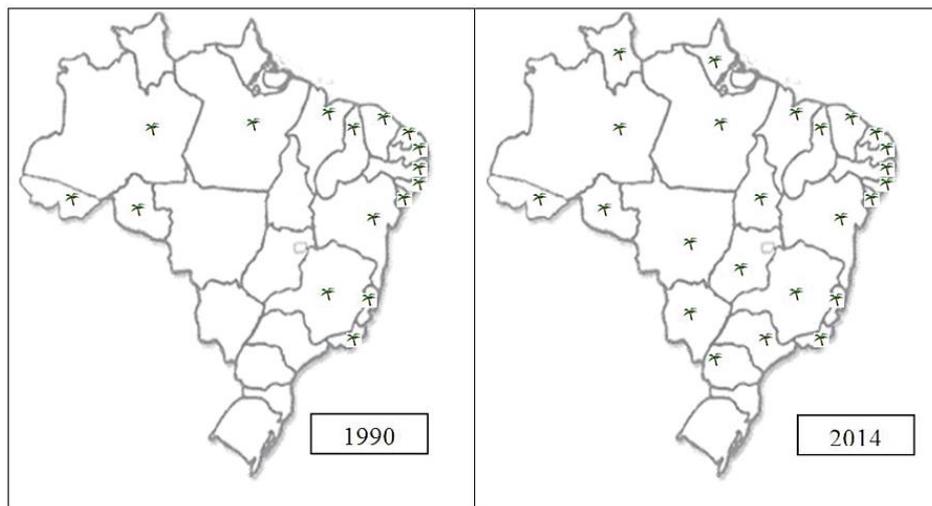
Em termos de produção, o Brasil apresenta posição de destaque no cenário mundial, estando atualmente na quarta colocação. Levando-se em consideração que em 1990 encontrava-se na décima posição no ranking, com cerca 477 mil toneladas de fruto, um grande avanço foi observado, visto que já em 2012 foram colhidas mais de 2,5 milhões de toneladas (Tabela 1) (FAO, 2014).

Tabela 1 – Produção, área colhida e produtividade dos principais países produtores de coco, em 2012.

País	Produção (1.000t)	Área colhida (ha)	Produtividade (1.000t/ha)
Indonésia	3.000.000	18.000.000	6,00
Filipinas	3.573.806	15.862.386	4,44
Índia	2.132.240	10.560.000	4,95
Brasil	257.742	2.888.532	11,21
Sri Lanka	394.840	2.000.000	5,07
Vietnã	145.000	1.250.000	8,62
Tailândia	217.000	1.100.000	5,07
México	166.000	1.050.000	6,33
Papua Nova Guiné	223.000	900.000	4,04
Malásia	112.093	606.530	5,41
Outros	1.892.920	5.831.389	3,08
Mundo	12.114.141,37	60.048.837,15	4,96

Fonte: FAO, 2014.

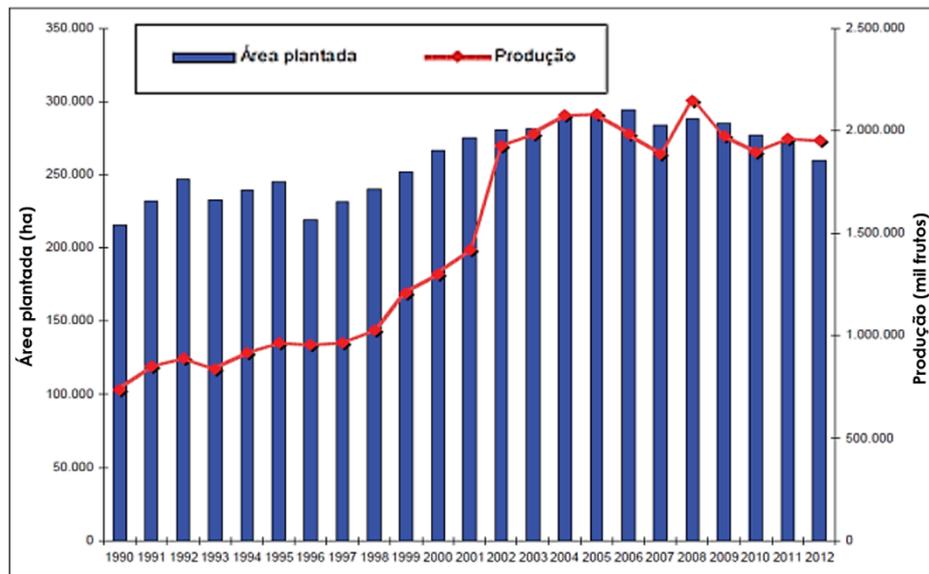
Tradicionalmente, a região nordeste sempre representou o território de maior cultivo no Brasil, principalmente na região litorânea. Contudo, entre os anos de 1990 e 2014 foi verificada uma vasta expansão desta cultura para demais regiões federativas, inclusive para a região do semiárido nordestino (MARTINS & JESUS JÚNIOR, 2014). Este fenômeno de expansão pode ser facilmente mensurado na figura 1.

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

Fonte: MARTINS & JESUS JÚNIOR, 2014.

A área plantada sofreu uma grande ampliação entre os anos de 1990 e 2012. Contudo, o crescimento mais marcante nesse período foi o grande aumento da produção, como pode ser visto na figura 2.

Figura 2 - Área plantada e produção do coco no Brasil de 1990 a 2012.



Fonte: IBGE, 2014.

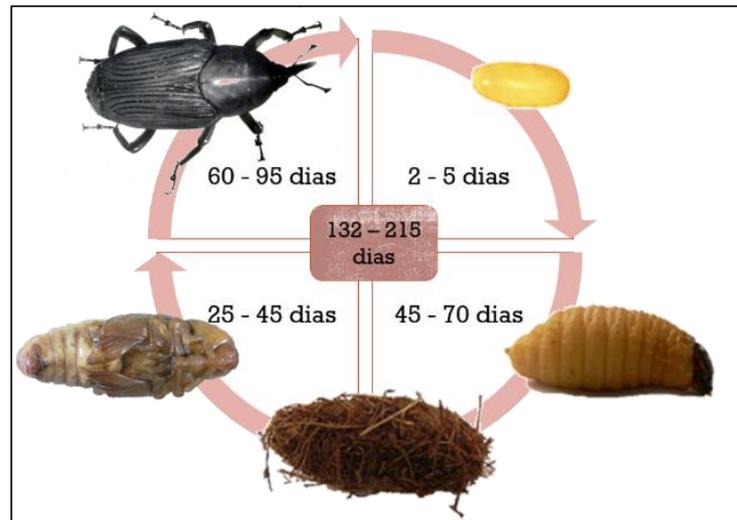
No cenário local, o estado de Alagoas tem a cocoicultura como parte integrante do ecossistema agrícola, de onde é explorada matéria-prima abundante por parte da indústria, bem como para o mercado local, o que gera renda e melhoria na qualidade de vida dos produtores. Grande parte da produção no estado é proveniente de culturas familiares e de pequenos produtores, que em sua maioria não tem acesso a novas tecnologias que auxiliem na produção. Esta carência compromete a produtividade e prejudica o agronegócio da região. As perdas verificadas por deficiências no cultivo, ainda são potencializadas pela alta incidência de organismos-praga, que causam danos muitas vezes irreparáveis ao coqueiro e reduzem drasticamente a produtividade (NEGRISOLI JÚNIOR et al., 2011). O resultado deste fenômeno é uma taxa de produção dos coqueirais bem abaixo do verdadeiro potencial desta frutífera. Em condições ideais, a planta é capaz de produzir entre 60 a 80 frutos/planta/ano, sendo que, atualmente, produz na faixa de 30 frutos por planta a cada ano. Isto revela um subaproveitamento da cultura e a urgente necessidade de aperfeiçoamento da atividade agrícola objetivando suprir a crescente demanda de coco em nível nacional (FONTENELE, 2005; FERREIRA, 2002a).

Estes organismos-praga se caracterizam por resultar em grandes perdas na produção e/ou causar danos que prejudicam a qualidade de produtos agrícolas dos agrossistemas afetados, tanto pelo próprio ataque da praga, quanto através da transmissão de doenças, agindo muitas vezes como vetor (PICANÇO, 2010). No decorrer de todo o período de desenvolvimento da planta, inúmeras espécies podem lhe causar danos ao buscar alimentação ou utilizar tais vegetais para algum processo fisiológico de seu ciclo biológico. Estes danos podem resultar em enormes prejuízos ao agronegócio, tanto em caráter ambiental quanto econômico, o que provoca declínio do desenvolvimento vegetativo e resulta em atraso no período produtivo inicial (FERREIRA, 2002a; MOLIN & BARRETO, 2012).

O principal inseto-praga que causa prejuízos a cocoicultura é o *Rhynchophorus palmarum*, inseto da ordem Coleoptera pertencente à família Curculionidae, que abrange espécimes conhecidos popularmente como gorgulhos. Esta ordem se caracteriza como a maior em número de espécies, sendo a principal característica desta ordem e comum a todos os exemplares a presença de um par de asas endurecidas chamadas de élitros, que sobrepõem o par de asas membranosas utilizadas durante o voo. Estas asas endurecidas servem de proteção física ao inseto contra danos mecânicos. Adicionalmente, uma característica comum vista em indivíduos da família Curculionidae é a presença de uma probóscide comprida, chamada de rostro, que se caracteriza como um apêndice alongado localizado na cabeça do inseto. A presença desta probóscide no *R. palmarum* é muito importante em relação a seus hábitos alimentares, já que muitas vezes precisa perfurar tecidos vegetais duros. Estes insetos são conhecido popularmente como broca-do-olho-do-coqueiro, aramanbaia, broca-do-coqueiro, bicudo, elefante, entre outros (EMBRAPA, 2010; CYSNE et al., 2013).

O *R. palmarum* é um inseto holometábolo que passa por metamorfose completa durante seu ciclo de vida, ilustrado na figura 3. A ovoposição gera um total de aproximadamente 250 ovos no decorrer do ciclo de vida de uma fêmea (média de 5 ovos por dia). Este ciclo de vida dura cerca de 120 dias. O período de incubação dos ovos gira em torno de 2 a 4 dias, momento em que eclodem dando origem as larvas. Estas, por sua vez são ápodas, possuem formato cilíndrico, medindo cerca de 2 a 2,5 mm de comprimento e 1,25 a 1,35 mm de largura, coloração branco-amarelada e cabeça castanho-escuro. O corpo se apresenta recurvado contendo 13 anéis rugosos, sendo mais calibrosos os localizados na porção mediana, em relação aos anteriores e posteriores. Esta característica faz com que elas apresentem morfologia mais afilada nas extremidades e mais volumosa no centro. 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 3 - Ciclo de desenvolvimento e reprodução do *R. palmarum*.



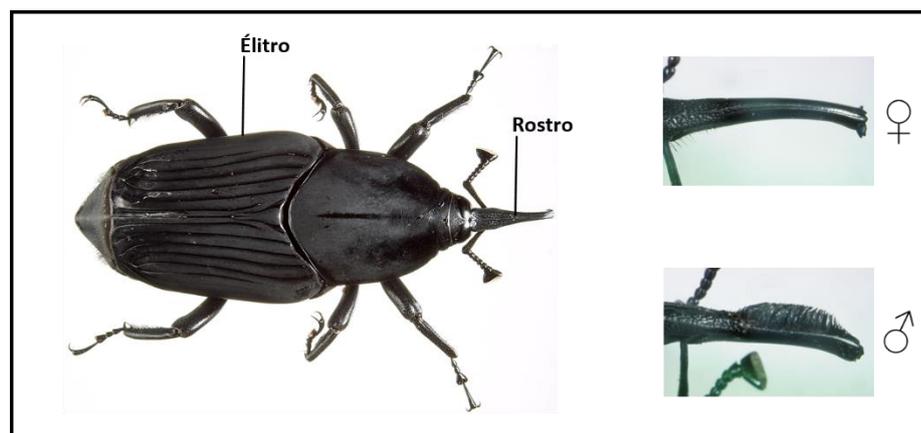
Fonte: Autor, 2019.

As larvas alimentam-se de forma ativa do tecido vegetal do coqueiro ao longo de seu desenvolvimento, preferivelmente da região da gema apical (palmito), nas inflorescências, no pecíolo das folhas novas e na região mole do estipe. O dano mecânico que elas causam na planta é decorrente, sobretudo, ao seu hábito alimentar, pois formam galerias em toda extensão da área em que elas se alimentam. Conseqüentemente, ocorre a destruição dos tecidos que conduzem a seiva para toda a planta. Um coqueiro adulto pode ser levado a morte quando infestado por larvas justamente por conta desse dano tecidual (GRIFFITH et al., 1968). Após adquirir todos os nutrientes necessários ao seu desenvolvimento, a larva entra no estágio de pré-pupa, quando utiliza as fibras do tecido vegetal do coqueiro que sobraram durante a alimentação para produzir o casulo que a protegerá durante a fase de pupa (FERREIRA, 2002a; EMBRAPA, 2010, MOLIN & BARRETO, 2012).

A fase de pré-pupa dura entre 4 a 7 dias, neste período as larvas encontram-se alojadas dentro do casulo que produziram com as fibras do tecido vegetal. Nesta etapa medirá cerca de 9 cm de comprimento e 3,5 cm largura. A pré-pupa se transformará em pupa dentro deste casulo, onde permanecerá por aproximadamente mais 4 a 16 dias. Ao final deste período ocorre a etapa final de metamorfose, que se completa com a formação do inseto adulto, que ainda se mantém no interior do casulo por cerca de 8 dias, mesmo estando totalmente formado. Finalmente, o inseto abandona o casulo e aproximadamente após um período de 5 dias atinge maturidade sexual, tornando-se apto a dar continuidade ao ciclo biológico (MEXZÓN et al., 1994; OEPP, 2005; EMBRAPA, 2010).

O adulto por sua vez, é um inseto que possui cor preto-opaco aveludada característica e seu tamanho pode variar de 3,5 a 6 cm de comprimento e 1,5 a 1,8 cm de largura. Possui um par de asas membranosas que são utilizadas para o voo e, recobrando-as, um par de asas anteriores externas rígidas denominadas élitros, que possuem oito estrias longitudinais características. Estes élitros são relativamente curtos e deixam exposta a parte posterior do abdômen (CYSNE et al., 2013). Caracterizam-se por apresentar dimorfismo sexual (Figura 4), sendo a principal diferença entre o macho e a fêmea a presença de pelos rígidos em forma de escova na parte superior da probóscide do macho, que estão ausentes nas fêmeas. Estas ainda, apresentam rostro ligeiramente mais curto que o do macho. O rostro, ou probóscide, é a parte frontal do inseto que representa o seu aparelho bucal, mede cerca 1,1 cm de comprimento, possui formato recurvado e é bastante forte (OEPP, 2005). O tempo de vida do adulto varia entre 27 e 61 dias, contudo a fêmea apresenta longevidade ligeiramente menor que o macho. Seus hábitos são basicamente diurnos, período em que são mais ativos e mantém o voo guiados por aromas fermentados liberados por palmeiras doentes, com presença de feridas, ou até mesmo pelo tecido vegetal morto (FERREIRA, 2002a; EMBRAPA, 2010).

Figura 4 - Dimorfismo sexual de adultos de *Rhynchophorus palmarum*. As inserções detalham a probóscide (rostro) ligeiramente menor e com ausência de pelos nas fêmeas e a presença de pelos na probóscide do macho.



Fonte: FERREIRA, 2002a (Adaptado).

O *R. palmarum* é predominantemente fitófago, ou seja, sua fonte de alimentação é o tecido vegetal, estando ele vivo ou morto (MOLIN & BARRETO, 2012). Os ataques geralmente ocorrem em plantas com idade superior a dois anos, ou seja, após significativo desenvolvimento da planta, sobretudo de regiões foliares e cachos. Os tecidos tenros localizados na coroa foliar do coqueiro são os preferidos das coleobrocas, que ao se alimentarem causam

danos físicos a esta região. Estes danos resultam em deficiência no crescimento e desenvolvimento da planta ou até mesmo sua morte (CYSNE et al., 2013). Um fato que pode agravar ainda mais esta situação é o hábito reprodutivo das fêmeas, que podem ovopositar na região do meristema apical após se alimentar, de onde eclodirão larvas que se alimentarão do tecido vegetal meristemático, região rica em células promotoras do crescimento e desenvolvimento do vegetal (BENETTI & PAGOTTO, 2006).

Adicionalmente, o inseto adulto pode agir como vetor do nematoide *Bursaphelenchus cocophilus* (Nemata, Aphelenchida: Aphelenchoides) (Figura 5a), parasita responsável pela doença-do-anel-vermelho (Figura 5b). Essa doença é letal para a planta, sobretudo quando associada ao dano físico causado previamente no estipe, podendo ser levada à morte num período de 3 a 4 meses (FERREIRA, 2002b; AGROLINK, 2017). O *B. cocophilus* foi descrito pela primeira vez no Brasil no município de Barretos, localizado no estado de São Paulo. Nos dias atuais, o nematoide encontra-se disseminado em praticamente todos os estados que tem a cocoicultura como agronegócio.

Adultos que se alimentam em plantas infectadas com o *B. cocophilus* se contaminam interna e externamente com os nematoides, podendo disseminar a doença para outras plantas. Contudo, a forma de disseminação mais comum é durante a ovoposição das fêmeas e pelas deposição de fezes nas axilas ou internódios das folhas. Nematoides juvenis liberados penetram no local da ferida, alimentam-se e reproduzem-se, ocasionando disseminação através do tecido vegetal. Ocorre oclusão vascular e clorose, as folhas enfraquecidas ficam pendentes ao redor do tronco, murcham e adquirem coloração amarronzada (Figura 5c) (GRIFFITH, 1987). Praticamente toda copa do coqueiro assume esta coloração, com exceção da parte central, que permanecer esverdeada. Esta, contudo, apresenta grande fragilidade na sua estrutura, o que gera a quebra da ráquis e morte (Figura 5d) (CASTRO et al., 2009).

Os nematoides agem principalmente nos tecidos do parênquima do estipe, nos pecíolos das folhas e no córtex das raízes das plantas. Eles não ocorrem necessariamente nos tecidos do xilema ou do floema, mas causam oclusão de seus vasos pelas tiloses produzidas pelas plantas como forma de defesa à infecção, e acabam por impedir o fluxo de seiva bruta no xilema e de seiva elaborada no floema (BLAIR & DARLING, 1968; GRIFFITH, 1987).

A partir dos danos causados ao tecido vegetal, inicia-se a fermentação e putrefação com liberação de odores característicos, formados por compostos voláteis que funcionam como atratores naturais da coleobrocas para o local de infecção. Neste caso, ocorre sinergismo entre estes odores e o feromônio de agregação que está sendo produzido pelo macho como forma de sinalizar uma fonte de alimento. Desta forma, este local afetado torna-se um grande foco de

alimentação e, conseqüentemente, de reprodução para o *R. palmarum* (BENETTI & PAGOTTO, 2006). Além da transmissão por parte do inseto-praga, pode ocorrer ainda a transmissão por contato direto entre raízes de plantas vizinhas, bem como por meio de ferramentas de corte utilizadas pelos produtores, como o facão ou enxada (GRIFFITH, 1987).

Figura 5 - a) Nematóide *Bursaphelenchus cocophilus*; b) corte na estipe do coqueiro mostrando o anel vermelho no floema; c) coqueiro acometido apresentando folhas laterais da copa amareladas e quebradas; d) enfraquecimento e quebra da ráquis, indicando morte do coqueiro.



Fonte: WARWICK 2005 (Adaptado).

2.2 Controle de Pragas

Os agrossistemas se caracterizam como ecossistemas alterados com o objetivo de viabilizar a produção de alimentos ou mesmo de qualquer matéria-prima que gere lucro para agroindústria. A incidência de insetos-praga nestes agrossistemas muitas vezes é favorecida pelas características climáticas do local, que podem ser ideais para o estabelecimento destas pragas de forma endêmica. O Brasil apresenta regiões com climas bastante diversificados, o que acarreta no surgimento de microrregiões climáticas que também favorecem a ocorrência de diversas espécies (LOIOLA, 2009).

Outro fator que favorece o estabelecimento de insetos-praga em uma determinada região é a inexistência ou reduzida população de antagonistas naturais (patógenos, predadores e parasitoides), importantes no controle dos níveis populacionais das pragas. Isto ocorre porque em um ecossistema natural, a relação antagonista/praga tende a ser muito mais ativa, diminuindo a incidência do invasor. Contudo, em sistemas agrícolas essa competição não

ocorre, o que resulta em desequilíbrio e consequente estabelecimento da praga invasora, representado risco eminente às culturas ali implantadas (PARRA et al., 2002). Como forma de tentar controlar a proliferação destas pragas, na maioria das vezes são utilizados agrotóxicos de forma indiscriminada, o que corrobora ainda mais com desequilíbrios neste ecossistema (FERREIRA, 2002a).

As estratégias para controle de pragas iniciam-se antes do plantio, com técnicas de pré-cultivo que naturalmente resultam em redução de danos e que preconizam o correto manejo do solo, com equilíbrio na adubação e seguido por práticas de rotação de culturas, dentre outras estratégias. Contudo, estas técnicas pré-cultivo não são eficazes isoladamente para o MIP, outras táticas são aplicadas no pós-cultivo, com base, sobretudo, na combinação de várias formas de controle, como o químico, o comportamental e o biológico (EMBRAPA, 2005).

Apesar da utilização de agrotóxicos na busca do controle populacional de insetos-praga ainda ser bastante disseminada, uma forte tendência de abandono de técnicas que se utilizam de pesticidas químicos nocivos ao meio ambiente tem sido acompanhada nos últimos anos (EMBRAPA, 2005). De modo geral, estes produtos apresentam amplo espectro de ação e geram inúmeros problemas agroecológicos, inclusive para saúde de trabalhadores rurais e consumidores (FERREIRA, 2002a). Diversos mecanismos de ação de inseticidas podem resultar na morte de insetos-praga, normalmente através de interferências em processos essenciais como respiração, alimentação, reprodução, crescimento e desenvolvimento. Qualquer produto capaz de resultar na morte, controle ou inibição do desenvolvimento de organismos-praga em um agrossistema pode ser considerado um inseticida (HOLSTEGE & BAER, 2004).

Especificamente para *R. palmarum*, o controle populacional representa um grande desafio para a cocoicultura, visto que não existem inseticidas registrados para seu controle no Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (Agrofit). Diversos agrotóxicos já foram testados no combate a esta praga, inclusive associados a outros produtos, como agentes de controle biológico, visando avaliar compatibilidade e possível aumento da virulência nos insetos, contudo, ainda há carência de informações a respeito. Adicionalmente, existe uma enorme carência de estudos que objetivem a obtenção de formulações bioinseticidas eficazes contra esta coleobroca, o que gera uma grande demanda por produtos deste tipo (AGROFIT, 2017).

2.2.1 Controle químico

O termo inseticida é muitas vezes utilizado como referência a produtos químicos utilizados na agricultura. Contudo, de forma geral, esta denominação faz alusão a qualquer tipo de produto que objetive a morte, o controle populacional ou a inibição do desenvolvimento de organismos considerados pragas em agrossistemas. Os inseticidas geralmente são intitulados agrotóxicos, e abrangem inúmeros produtos químicos empregados nos mais diversos tipos de cultura, com o objetivo principal de controlar a incidência de pragas que geram prejuízos ao agronegócio. Estes também recebem a denominação de pesticidas, defensivos agrícolas, agroquímicos ou fitossanitários. As principais formas de aplicação destes produtos é por meio de técnicas de pulverização, nebulização, pincelamento e fumigação (EMBRAPA, 2005).

Inúmeros agrotóxicos são utilizados no agronegócio em todo o mundo. Estes fazem parte de uma classe diversificada de substâncias que são potencialmente tóxicas. Dentre elas incluem-se os carbamatos, organoclorados, organofosforados e as piretrinas, principais classes de inseticidas disponíveis no mercado (HOLSTEGE & BAER, 2004). Apesar de ser uma das formas de controle de maior prevalência na agricultura, sua utilização geralmente acarreta diversos problemas agroecológicos, especialmente pelo uso de inseticidas que apresentam espectro de ação amplo. Apresentam efeitos neurotóxicos e representam grande risco a saúde de agricultores e consumidores (BOTTON et al., 2011). Adicionalmente, tais produtos podem interferir na fisiologia de diversas espécies, inclusive as que são benéficas aos cultivares, causando desequilíbrios ecológicos prejudiciais ao ambiente (FERREIRA, 2002a).

Da mesma forma que existem inúmeros produtos químicos que podem apresentar propriedades inseticidas contra organismos-praga, também existem diversos mecanismos de ação pelo qual eles agem. De forma geral, eles atuam através de interferências em processos que são essenciais à vida da espécie em questão, causando danos que limitam a ação do organismo ou até mesmo o leva à morte. Interferências em processos alimentares, respiratórios, reprodutivos e de crescimento e desenvolvimento possibilitam o controle populacional (HOLSTEGE & BAER, 2004).

O emprego de produtos que apresentem maior especificidade para a praga-alvo a ser controlada em determinada cultura se tornou tendência nos últimos anos. Dentre estes métodos de manejo estão o controle comportamental e o controle biológico, promissores quando se trata do inseto-praga *R. palmarum*. Isto porque não há registro de inseticidas específicos para esta colebroca no sistema Agrofit (AGROFIT, 2017).

2.2.2 Controle comportamental

Os insetos diferem de outras espécies quando se fala em métodos de comunicação. O sistema olfativo associado à transmissão de determinados compostos químicos específicos produzidos por eles é essencial para a realização de funções vitais, tais como a alimentação, defesa, acasalamento, dentre outros (NORDLUND & LEWIS, 1976). O controle comportamental caracteriza-se como uma forma de controle que permite o manejo de agrossistemas de forma a diminuir ou até mesmo extinguir a aplicação de agrotóxicos. Esta prática se utiliza basicamente da aplicação de semioquímicos, o que possibilita redução de danos ao meio ambiente e diminui os riscos de toxicidade a trabalhadores do campo e consumidores finais (CYSNE et al., 2013).

Semioquímicos são substâncias envolvidas na transmissão de informações entre indivíduos. São subdivididos em dois grandes grupos, feromônios e aleloquímicos, dependendo se a interação é intraespecífica (entre indivíduos de uma mesma espécie) ou interespecífica (entre indivíduos de espécies diferentes), respectivamente. Neste último, quando a interação favorece o produtor, diz-se alomônios, enquanto aqueles que favorecem o receptor são chamados cairomônios. O nome feromônio foi proposto para aqueles semioquímicos que são usados para comunicação dentro de uma espécie (LAW & REGNIER, 1971). A sua produção por parte do indivíduo emissor resulta em respostas fisiológicas de reação comportamental no indivíduo receptor, que será proporcionalmente adequada ao tipo de semioquímico produzido (NORDLUND & LEWIS, 1976).

O semioquímico responsável pela troca de informação entre dois indivíduos recebe a denominação de infoquímico. Este, quando participa da comunicação entre exemplares da mesma espécie é denominado feromônio (LAW & REGNIER, 1971). Levando-se em consideração sua origem semântica, derivada do grego *pherein* e *hormon*, respectivamente carregar e estimular, se caracterizam como compostos biologicamente ativos que são produzidos e liberados no ambiente por um indivíduo e posteriormente assimilados por outros de uma mesma espécie. Esta recepção desencadeia reações específicas, representadas por um comportamento ou mesmo por um processo de desenvolvimento fisiológico definido (WILSON & BOSSERT, 1976).

Os feromônios permitem a propagação de mensagens com alto grau de complexidade, podendo ocorrer a emissão de diversas informações concomitantemente. Este fenômeno é possível devido a sua composição extremamente complexa, caracterizada por combinações

multicomponentes de variadas substâncias que apresentam volatilidades distintas. Como estas substâncias geralmente apresentam gradientes de concentração diferentes, uma grande variedade de informações pode ser gerada ao mesmo tempo (WILSON & BOSSERT, 1976). Indivíduos receptores da informação conseguem detectar compostos voláteis através da interação com seus receptores biológicos, identificando-os mesmo em concentrações muito baixas no ambiente e a longas distâncias de onde o sinal foi gerado (ATTERHOLT et al.; 1999).

Quanto a sua atividade frente ao indivíduo receptor da mensagem, o feromônio pode ser classificado como preparador ou desencadeador. Este primeiro, geralmente demonstra atividade mais lenta e com efeito prolongado no receptor, sobretudo por efeitos fisiológicos e que interferem no desenvolvimento do indivíduo. Já o segundo, exerce alteração de forma imediata no receptor, modificando o comportamento dos indivíduos de forma rápida, especialmente por atuar diretamente no sistema nervoso central (WILSON & BOSSERT, 1976).

A classificação dos feromônios desencadeadores tem relação direta com o tipo de resposta comportamental que é produzida no agente receptor. O feromônio sexual provoca a atração de indivíduos do sexo oposto, com objetivo de acasalamento. O de trilha é importante para algumas espécies na formação dos caminhos que a colônia deve seguir, bem como na demarcação de espaço. O feromônio de agregação promove a atração de indivíduos de ambos os sexos em um determinado local, geralmente para indicar uma fonte de alimento, conseqüentemente tem papel importante também no acasalamento e na oviposição. Já o de alarme serve como alerta na indicação de perigo, sobretudo pela presença de predadores naturais (LEONHARD & BEROZA, 1982).

Com relação aos infoquímicos do tipo aleloquímicos, sua classificação é um pouco mais complexa. Eles estão relacionados diretamente com a execução de diversas atividades realizadas na colônia de insetos sociais. A diferença entre eles ocorre de acordo com o indivíduo que se beneficia na relação de comunicação. Os cairomônios são resultantes de uma característica biológica do próprio organismo, que libera compostos atrativos para outra espécie, e nela gera resposta que lhes são favoráveis em termos de adaptabilidade, mas que não traz nenhum benefício ao emissor. Os denominados alomônios são infoquímicos que geram benefícios somente ao agente emissor. Já os sinomônios beneficiam tanto ao agente emissor quanto ao agente receptor (JUTSUM & GORDON, 1987).

Apesar de não atuarem na morte direta dos insetos-praga, os feromônios se mostram bastante efetivos no controle de pragas, representando risco praticamente nulo a outros seres vivos e ao meio ambiente. Estudos a respeito da utilização de feromônios de diversas espécies de pragas têm aumentado bastante nos últimos anos, resultando em novas informações relativas

aos aspectos fisiológicos, biológicos, bioquímicos, comportamentais e genéticos relacionados (CHEN et al., 2018).

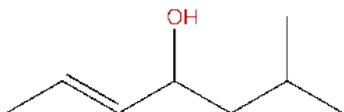
A produção de feromônios dentre as espécies do gênero *Rhynchophorus* tem relação direta com os sistemas de interação entre seus indivíduos, ao encontrar uma fonte de alimento eles produzem um feromônio de agregação, que atrai outros indivíduos para o local. Esta atração possibilita tanto a alimentação quanto o acasalamento (SEO et al., 2016). Existe ainda o sinergismo entre os feromônios produzidos pelo *R. palmarum* e os cairomônios liberados pelas plantas. Adicionalmente, tecidos vegetais que apresentam feridas ou encontram-se com algum tipo de doença podem exalar compostos voláteis atrativos para as coleobrocas deste gênero (NAVARRO et al., 2002). As culturas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), mamão e abacaxi são exemplos de vegetais que apresentam capacidade fermentativa e, conseqüentemente, atraem estes insetos. De forma sinérgica, os feromônios produzidos pelos indivíduos presentes na fonte de alimento potencializam esta atração, fazendo com que ocorra a agregação de vários insetos no local inicial de sinalização. Além de se alimentarem, as coleobrocas também utilizarão tal local para se reproduzirem, aumentando ainda mais seu nível populacional naquela região (FERREIRA, 2002a).

A combinação dos voláteis do feromônio com os resultantes da fermentação das iscas vegetais pode ser utilizada em sistemas de alçapão, armadilhas que atraem o inseto para uma câmara que impossibilita sua saída (CYSNE et al., 2013). Este é um método bastante eficiente de controle populacional que ajuda a reduzir os danos causados por este inseto-praga. A isca utilizada neste caso é composta por um atrativo alimentar com capacidade fermentativa, sobretudo a cana-de-açúcar, e o feromônio sintético de agregação, similar ao natural produzido pelo inseto. No caso do *R. palmarum*, este feromônio sintético é o Rincoforol, que possui capacidade atrativa semelhante a vista no feromônio natural produzido pelo macho da espécie (FERREIRA, 2007).

Uma área específica do sistema Agrofite elenca os produtos registrados no MAPA que possuam finalidade de controle de pragas que atacam diversos tipos de cultura de interesse econômico para o país. Especificamente para o coqueiro, o único produto registrado para controle das coleobrocas de *R. palmarum* é o Rincoforol (6-Metil-2-hepten-4-ol) (Figura 6), um álcool alifático contendo 8 carbonos e com uma insaturação. Ele se apresenta como um líquido amarelo claro de odor característico, bastante volátil, altamente solúvel em álcool, imiscível com água e que apresenta boa biodegradabilidade. O Rincoforol foi isolado e identificado no ano de 1991 por Rochat e colaboradores (ROCHAT et al., 1991). Sua estereoquímica absoluta foi definida como sendo *S*(-) (2*E*)-6-metil-2-hepten-4-ol, tendo como o isômero ativo o (*S*)-

Rincoforol. O isômero inativo, (*R*)-Rincoforol, não demonstra atividade inibitória, o que permite a utilização do racemato sintético (\pm)-Rincoforol (OEHLSCHLAGER et al., 1992). Dois produtos comerciais são indicados no Agrofít, ambas formulações caracterizadas como geradores de gás (voláteis) e classificadas como produtos de baixa toxicidade (classe IV) e baixo risco para o meio ambiente (classe IV) (AGROFIT, 2017).

Figura 6 - Estrutura e propriedades físico-químicas do Rincoforol.

Propriedades físico-químicas	
	Estereoquímica absoluta
	<i>S</i> (-) (2 <i>E</i>)-6-metil-2-hepten-4-ol
	Fórmula química
	C ₈ H ₁₆ O
	pH
	3,13
	densidade
	0,8626 g.mL ⁻¹

Fonte: SEO et al., 2013.

A aplicabilidade dos feromônios no controle de pragas requer a utilização de dispositivos que propiciem sua liberação por período de tempo suficientemente adequado para sua efetividade. Tais sistemas devem garantir taxas de liberação constantes, não variando a velocidade em função do tempo, ou seja, devem apresentar cinética de liberação de ordem zero. Além disso, a emissão dos voláteis deve obedecer as reais necessidades destes no ambiente, mantendo concentrações adequadas que possam ser eficazes na captura do inseto sem que haja exacerbação de sua presença no ar. Tais características devem ser adaptativas ao tipo de mecanismo utilizado na captura bem como as condições climáticas da região (KYDONIUS & BEROZA, 1982).

Uma ampla gama de dispositivos de liberação controlada para feromônios já foram propostas. Atualmente, os dispensadores consistem principalmente de septos de borracha, tubos de plástico, fibras ocas, cordões impregnados, *twist-ties*, formulações a base de ceras, matrizes tipo gel, dentre outros. Embora eficazes em muitos casos, a grande maioria dos dispositivos apresentam limitações de uso, dentre as mais importantes estão (STIPANOVIC et al., 2004; CHEN et al., 2018):

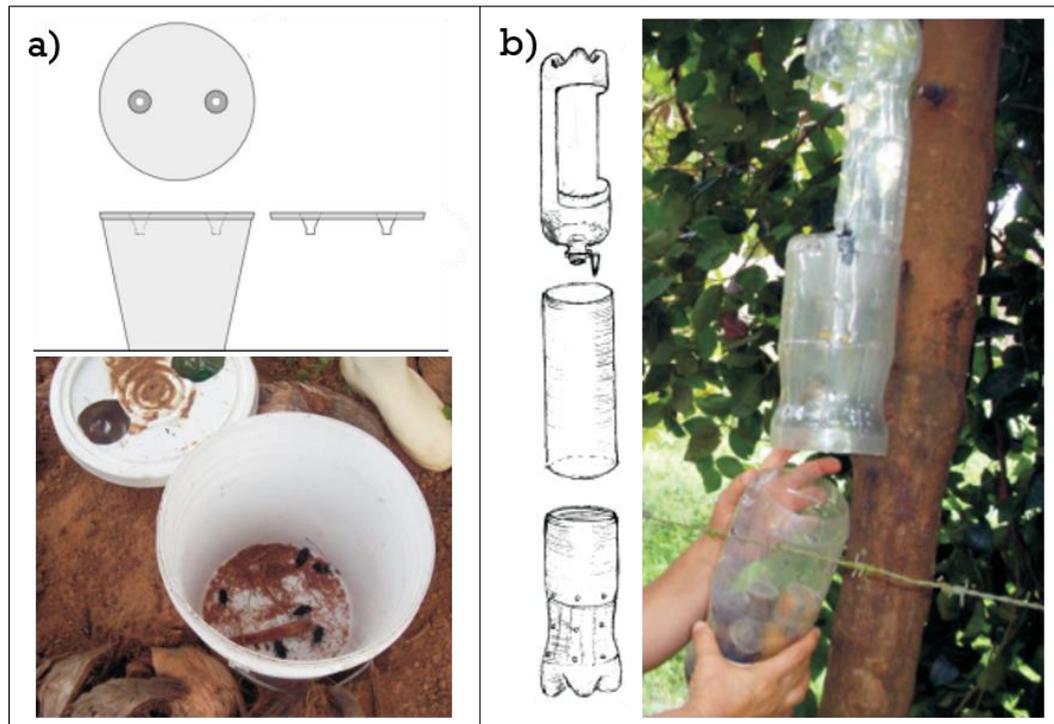
- Variação da taxa de liberação;
- Dificuldade de manutenção de concentrações ideais dos voláteis;
- Alto custo de produção, alta demanda de tempo de confecção e/ou impossibilidade de escalonamento para produção em massa dos dispositivos;

- Dificuldade de implementação dos dispositivos no local de ação;
- Utilização de polímeros não-biodegradáveis em películas de controle de liberação ou de suporte do dispositivo.

Armadilhas do tipo alçapão são bastante utilizadas no controle de *R. palmarum*, geralmente confeccionadas com baldes adaptados ao aprisionamento dos insetos adultos. O mecanismo permite a entrada da praga por atração proporcionada pela isca alimento/feromônio, mas impede que o mesmo retorne para o ambiente. Tal artifício é conseguido por meio de furos feitos na tampa do balde, garantindo o acesso para seu interior. Na parte interna destes furos são acoplados funis, que dificultam a saída do inseto aprisionado, como pode ser visto na figura 7a. O sistema de liberação do feromônio que possibilita a atratividade também é fixado na tampa do balde, geralmente sendo constituído por um tudo eppendorf com um furo central que permite a saída dos voláteis (DUARTE et al., 2003; EMBRAPA, 2010).

Como nem sempre é viável a aquisição e manutenção destes baldes no campo, principalmente em áreas muito grandes e sujeitas a vandalismo, a Embrapa Tabuleiros Costeiros de Aracaju desenvolveu um modelo alternativo feito a partir de garrafas PET (politereftalato de etileno), que mantém um princípio de funcionamento semelhante ao das armadilhas tipo balde, contudo são mais baratas, mais discretas e não representam interesse por parte de vândalos, evitando furtos (Figura 7b) (FERREIRA, 2007).

Figura 7 - Esquema de armadilhas tipo alçapão: a) balde; b) garrafa PET.



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

2.2.3 Controle biológico

O principal objetivo do controle biológico é prover a manutenção ou elevação do número de espécies que agem como antagonistas naturais das pragas, ou seja, ela promove o estabelecimento de organismos que levarão à morte a espécie que representa risco à plantação. O controle biológico de pragas está inserido no MIP, que une informações técnicas, ecológicas, econômicas e sociológicas para idealizar estratégias com métodos integrados e que resultem em potencialização da redução populacional da espécie em questão (PICANÇO, 2010). A prática de métodos ecologicamente sustentáveis de manejo de pragas vem se tornando uma tendência dentre produtores e gestores públicos, que assumem uma crescente conscientização a respeito da importância destas atitudes para o futuro do agronegócio e da diminuição de danos ao ambiente e aos seres vivos (RANASINGH, 2007). Desta forma, tem sido observado incentivo crescente do MAPA na utilização de inseticidas biológicos, também conhecidos como biopesticidas ou bioinseticidas. Nenhum produto deste tipo com finalidade de combater o *R. palmarum* está registrado no sistema Agrofit, deixando uma lacuna a ser preenchida na prática do controle biológico (AGROFIT, 2017).

As diferentes estratégias aplicadas em conjunto para o controle de pragas buscam reduzir os danos ao meio ambiente e à saúde dos seres vivos, caracterizando-se técnicas ecologicamente sustentáveis. Este tipo de prática começou a ser aplicada e também a ganhar importância na década de 50. Uma de suas vertentes está relacionada a aplicação de entomopatógenos, que são organismos capazes de parasitar insetos, levando-os a morte e, conseqüentemente, diminuindo seus níveis populacionais. Mais especificamente, o controle biológico baseado na aplicação de agentes entomopatogênicos utiliza nematoides, fungos, bactérias, vírus e protozoários no manejo de insetos que são considerados pragas (ALVES et al., 2008).

Cada bioagente age por um mecanismo principal que, geralmente, é diferente para cada tipo de microrganismo. Bactérias utilizadas como entomopatógenos normalmente iniciam sua atividade infectante somente após a ingestão por parte da praga, para que exerçam seu mecanismo de ação. Após a ingestão, o metabolismo destes microrganismos resulta em toxinas liberadas no trato digestório do inseto com potencial para leva-lo a morte. Dentre os diversos tipos de bactérias, as do gênero *Bacillus* é o que apresenta maior aplicabilidade no manejo de pragas (FERREIRA, 2002a). De forma semelhante, o principal mecanismo de ação dos vírus é através do trato gastrointestinal, geralmente ocorrendo penetração através das células do intestino médio. A infecção pode então se disseminar através da hemolinfa e levar o inseto à morte. Os baculovírus, pertencentes a família Baculoviridae infectam predominantemente artrópodes, e por isso são bastante aplicados no controle biológico (ALVES et al., 2008).

Em uma vertente diferente, a utilização de nematoides é basicamente realizado no manejo do solo, exercendo seu mecanismo de ação nas pragas presentes predominantemente neste ambiente. Apesar desta prevalência, houve um aumento considerável no número de estudos que relacionam suas aplicações em outras áreas, até mesmo fora da agricultura (ALVES et al., 2008). Os protozoários representam o grupo com maior limitação no controle de pragas, por apresentarem baixo grau de virulência e mecanismo de ação mais demorado que os demais. Como normalmente resultam em infecção crônica no inseto, este apresenta debilidade que resulta em morte lenta, muitas vezes não satisfazendo os requisitos para tal aplicação (FERREIRA, 2002a). Por outro lado, os fungos representam o grupo de entomopatógenos mais versáteis no controle biológico. Eles são capazes de causar infecção em várias espécies de pragas, em grande parte por apresentarem diferentes mecanismos de ação diferentes. Além disso, alguns fungos podem infectar várias espécies diferentes concomitantemente em um mesmo ambiente, causando epizootias rápidas e que reduzem níveis populacionais de pragas importantes que atacam uma determinada cultura de forma conjunta. (ALVES et al., 2008).

2.2.3.1 Fungos Entomopatogênicos

Os fungos entomopatogênicos são bastante utilizados como bioinseticidas e representam grande importância socioeconômica para as regiões de cultivo. Eles se caracterizam como fungos que apresentam a capacidade de parasitar insetos, dentre estes, diversas espécies consideradas pragas agrícolas (GÜERRI-AGULLÓ et al., 2010). Sua aplicação para tal finalidade data do século XIX, onde os testes iniciais com fungos entomopatogênicos foram realizados. A infectividade destes agentes biológicos foi avaliada primordialmente pelo russo Metschnikoff, que testou o fungo *Metarhizium anisopliae* no combate a besouros. Contudo, a obtenção de resultados práticos no controle de insetos-praga só ocorreu aproximadamente um século após os experimentos iniciais, sendo, nos dias atuais, bastante utilizados como micoinseticidas na prática agrícola (FARIA & MAGALHÃES, 2001).

A elaboração em massa de produtos à base de isolados fúngicos deve garantir volumosa capacidade de esporulação, crescimento rápido e patogenicidade suficientemente alta afim de provocar redução populacional da pragas-alvo. Adicionalmente, os conídios devem ser protegidos de fatores ambientais possivelmente deletérios durante o período de estocagem e aplicação do produto (FENG et al. 1994).

O mecanismo geral de ação dos fungos entomopatogênicos se inicia a partir do contato com o tegumento (cutícula) do inseto. Ocorre adesão dos conidióforos, colonização com posterior germinação dos esporos (conídios) e penetração do exoesqueleto do inseto. Após acessar o interior do corpo do inseto, as hifas do fungo colonizam a hemolinfa, se diferenciam em blastóporos (células ovais) que então se disseminam e se multiplicam de forma rápida com consequente extrusão de estruturas de conidiação novas. A disseminação através do corpo do inseto resulta em destruição tecidual, o que o leva à morte (GÜERRI-AGULLÓ et al., 2010; FERREIRA, 2002a). Os fungos representam o grupo de entomopatógenos mais versáteis no controle biológico. Eles apresentam mecanismos de ação variados, sendo capazes de causar infecção em várias espécies de pragas. Além disso, alguns fungos podem infectar várias espécies diferentes concomitantemente em um mesmo ambiente (FARIA & MAGALHÃES, 2001).

Diversos mecanismos de ação diferentes dos fungos entomopatogênicos podem resultar na morte dos insetos-praga. Eles apresentam versatilidade de ação e por isso vêm sendo cada dia mais utilizados no controle biológico (ALVES et al., 2008). Este crescimento é impulsionado pelos diversos estudos que vêm sendo realizados nos últimos anos, gerando

grandes descobertas na área do controle biológico e elucidando os mecanismos de ação que estão envolvidos em cada interação entre o agente biológico e a praga-alvo. Cerca de 700 espécies de fungos entomopatogênicos são conhecidas, contudo, a maior parte da produção comercial utiliza como bioativo espécies de *Metarhizium*, *Isaria*, *Lecanicillium* e *Beauveria* (VEGA et al., 2009). Este último merece destaque no controle de insetos-praga, visto que desponta como um dos fungos entomopatogênicos mais utilizados no biocontrole, sobretudo pelo incentivo da utilização de biopesticidas nos últimos anos, a busca dos consumidores por produtos livres de resíduos químicos e o desenvolvimento de resistência a pesticidas por muitas pragas de importância socioeconômica (BUTT et al., 2016).

2.2.3.1.1 *Beauveria bassiana*

No início do século XIX uma grave doença atacava o bicho-da-seda e estava devastando a indústria da seda na França. Agostino Bassi (1773 – 1856) demonstrou que *Beauveria bassiana* (como *Botrytis bassiana*) era o agente infeccioso causando o que era então conhecido como a doença da muscardina dos bichos-da-seda, daí o segundo nome do binômio em sua homenagem. Ele criou a hipótese de que a doença era causada por organismos microscópicos, neste caso fungos, que eram capazes de infectar indivíduos saudáveis a partir da infecção existente em insetos mortos. Através de estudos microscópicos experimentais realizados a partir das teorias sugeridas por Bassi, Giuseppe Balsamo-Crivelli (1800 – 1874) e outros pesquisadores reforçaram esta hipótese, surgindo então o primeiro caso comprovado experimentalmente em que se atribuiu uma determinada doença à infecção por microrganismos (VEGA et al., 2009).

A *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) é um fungo da ordem Hypocreales, família Cordycipitaceae e gênero *Beauveria*. É um entomopatôgeno capaz de infectar grande quantidade de insetos-praga, sobretudo coleópteros, tendo enorme importância no agronegócio como agente de controle biológico no MIP (GÜERRI-AGULLÓ et al., 2010). Diversas espécies de importância econômica para o agronegócio e também como pragas domésticas são susceptíveis a este fungo, capaz de infectar uma vasta gama insetos-praga, como pode ser visto nas Tabelas 2 e 3. A partir destas características, diversos biopesticidas a base de *B. bassiana* têm sido produzidos para aplicação em cultivares das mais variadas espécies vegetais (BARBARIN et al., 2012).

Tabela 2 – 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, 2017.

Tabela 3 – 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, 2017.

O mecanismo de infecção utilizado pela *B. bassiana* para parasitar coleópteros é o mesmo utilizado pela maioria dos agentes entomopatogênicos. A adesão ao tegumento do inseto ocorre após o contato com a cutícula, o fungo então inicia diversos processos enzimáticos que culminarão na degradação cuticular e subsequente penetração através do exoesqueleto, juntamente com a pressão mecânica exercida pelo crescimento hifal (BORGES, 2007). Após penetrar a carapaça do inseto, o fungo atinge a hemolinfa e suplanta a resposta imune do hospedeiro, se prolifera rapidamente levando-o à morte. Logo após, o fungo realiza crescimento saprofítico e subsequente produção de novos conídios (XIAO et. al., 2012).

Em 1991, pesquisadores da Embrapa Tabuleiros Costeiros do estado de Sergipe, identificaram coleobrocas de *R. palmarum* em culturas de coqueiro parasitadas naturalmente por *B. bassiana*. A partir deste achado, ensaios laboratoriais e estudos de campo vêm sendo colocados em prática visando viabilizar a utilização da cepa, que foi designada CPATC032, no MIP como agente entomopatogênico no controle biológico (FERREIRA, 2002b).

Em um dos estudos realizados pela Embrapa, indivíduos machos de *R. palmarum* foram expostos a uma suspensão de esporos de *B. bassiana* contendo 10^9 conídios por mililitro (con/mL). Após a inoculação dos insetos, foi procedida a liberação quinzenal de indivíduos infectados nas culturas de coqueiro visando avaliar possível influência nos níveis populacionais da colebroca nos períodos subsequentes ao experimento. Durante 3 anos os níveis populacionais foram avaliados e foi verificada uma redução de 58, 38 e 69% da população nativa da praga, no primeiro, segundo e terceiro ano, respectivamente. Segundo o autor, o inseto macho é um bom transmissor e veiculador dos esporos de *B. bassiana* na população de *R. palmarum* (FERREIRA, 2002b). A figura 8 mostra um inseto adulto morto devido à infecção pela cepa CPATC032.

Figura 8 - Macho adulto de *R. palmarum* parasitado pelo fungo *B. bassiana*.



Fonte: Autor, 2017.

Segundo um estudo de Güerri-Agulló (2010) a multiplicação dos conídios e a estruturas mais delgadas ou regiões com sulcos ou espículas são mais propícias à penetração. Neste, os autores utilizaram suspensões contendo conídios fúngicos em concentrações variadas para avaliar a infectividade de uma cepa de *B. bassiana* contra insetos do gênero *Rhynchophorus*. Constatou-se 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. O método de microscopia utilizado possibilitou a observação dos

estágios iniciais da infecção, que segundo os autores, ocorre primariamente com a adesão dos conídios à cutícula no caso de insetos adultos, sobretudo nas regiões mais susceptíveis, como patas, antenas e élitros. Posteriormente, ocorre a germinação dos conídios com fusão de hifas e formação de apressórios e anastomose, onde há formação de mucilagens que facilitam a penetração por degradação da cutícula. Após a penetração ocorre a colonização da hemolinfa e morte do inseto. Essa colonização e posterior surgimento de conidióforos nas cutículas indicaram conclusão do ciclo de vida do fungo no hospedeiro (GÜERRI-AGULLÓ et al., 2010).

A formação dos apressórios permite a ancoragem dos conídios que, então, exercem pressão na cutícula para que ocorra a penetração. Concomitantemente, uma grande variedade de enzimas são excretadas pelo fungo com o objetivo de degradar a cutícula, dentre elas quitinases, proteases, lipases, quitobiases, lipoxigenases, além de algumas enzimas hidrolíticas. Adicionalmente, a degradação também fornece nutrientes para o fungo (ALVES, 1998).

2.2.3.1.2 Produto à base de fungos entomopatogênicos

A comercialização de produtos bioinseticidas derivados de fungos entomopatogênicos se iniciou nos anos 60 no Brasil. Os métodos de obtenção são baseados na multiplicação dos fungos em substratos, geralmente compostos por cereais. A inoculação do substrato estéril, sobretudo o arroz, a partir de um fermentado inicial líquido permite a colonização do meio de cultura com alta produção de conídios do fungo (FARIA & MAGALHÃES, 2001). Este material pode ser vendido sob esta forma, onde é essencial uma etapa de pré-lavagem antes do uso para arraste dos esporos, que então poderão ser aplicados nas culturas. A massa colonizada também pode passar por um processo de trituração com posterior comercialização sob a forma de pó-molhável. Este método de produção é geralmente realizado de forma artesanal em associações de produtores ou mesmo em centros de pesquisa, gerando uma grande variação em termos de qualidade e padronização (ALVES et al., 2008).

Além dos problemas relacionados à qualidade e a falta de padronização dos produtos disponíveis no mercado brasileiro, estes geralmente também não proporcionam praticidade de aplicação. Estas características quando associadas à reduzida vida de prateleira, devido à alta susceptibilidade do fungo, dificultam a comercialização e limitam o potencial destes entomopatógenos no MIP. Dentre os problemas encontrados no dia-a-dia do campo para aplicação destes produtos estão a necessidade de se realizar a pré-lavagem da massa fermentada

para retirada do bioativo antes da utilização, a alta probabilidade de ocorrência de entupimento dos equipamentos pulverizadores por conta da grande concentração de material particulado inerte na suspensão resultante da lavagem e a curta sobrevivência dos conídios neste material. Estes fenômenos apontam para uma grande demanda de produtos formulados que contornem estas limitações (FARIA & MAGALHÃES, 2001). A produção de formulações bioinseticidas pode ser muito complexa, visto que muitos dos materiais normalmente utilizados na produção de biopesticidas podem interferir na natureza biológica do bioagente, gerando efeitos deletérios à sua atividade. Dentre os efeitos indesejáveis prováveis em uma formulação deste tipo pode-se citar a perda de viabilidade do agente microbiano no decorrer do período de armazenamento ou mesmo após a sua aplicação no ambiente. Tanto fatores bióticos quanto abióticos podem resultar em perdas na bioatividade de diversos agentes de controle microbiano. Desta forma, a adequada formulação destes produtos se caracteriza como uma etapa crucial no desenvolvimento de biopesticidas (ALVES et al., 1996).

O estabelecimento do controle microbiano nas práticas desenvolvidas nos agrossistemas é facilitado pela praticidade de implementação dos métodos após pleno desenvolvimento das formulações. Isto porque alguns requisitos para a consolidação dos bioinseticidas na prática são o reduzido custo de produção e a simplicidade dos processos produtivos, fatores que garantem a adesão ao sistema de controle. Contudo, inserir no mercado produtos formulados para o controle biológico não é uma tarefa tão simples e alguns desafios precisam ser transpostos para que o produto tenha sua aplicabilidade consolidada. Dentre estes desafios a carência de conhecimento sobre os diversos benefícios que podem ser proporcionados por tais produtos bem como a resistência por parte dos produtores e das empresas do setor em aderir ao sistema são os principais entraves a serem vencidos. Muitas vezes esta resistência é resultado da insegurança frente a novas estratégias de manejo. A única forma de superar esta desconfiança é com conhecimento, apresentando aos empresários e produtores os benefícios das novas tecnologias e a maior eficiência dos produtos (ALMEIDA et al., 2008). Adicionalmente, a praticidade na aplicação, a alta eficiência, o baixo custo e a persistência do bioativo no local de aplicação a partir da liberação satisfatória e controlada no ambiente acabam conquistando a confiança dos agricultores em um curto espaço de tempo. Estas características são imprescindíveis para os produtos formulados com finalidade de controle biológico (BATISTA FILHO et al., 1998).

2.2.3.2 Encapsulamento de bioativos

O processo produtivo de uma formulação para aplicação bioinseticida compreende a realização de ensaios que comprovem propriedades satisfatórias de armazenamento do produto. Os compostos utilizados no controle biológico devem ser comprovadamente compatíveis com o bioativo, que deve estar em concentrações adequadas. Além disso, melhorias na capacidade de adesão/espalhamento no local de ação, seja no exoesqueleto da praga, seja nas regiões hidrofóbicas dos tecidos vegetais são essenciais para a persistência do bioativo no local de ação (ALVES, 2003).

Uma forma de atingir estes objetivos é através do encapsulamento dos bioativos, estratégia que provê proteção destes a efeitos deletérios e preservação suas características intrínsecas (EZHILARASI et al., 2013). Adicionalmente, a matriz utilizada pode ser projetada para garantir adesividade do produto no local de ação, proporcionar maior eficácia na aplicação além de possibilitar melhorias na estabilidade e maior vida de prateleira (ALVES, 2003). Para tal, um dos métodos de encapsulação mais utilizados nos dias atuais é através do uso de matrizes poliméricas, que agrega valor ao produto e garante as propriedades necessárias de um bioinseticida. Formulações que tem como base matrizes poliméricas geralmente apresentam grande melhoria na manutenção da viabilidade de bioativos, por conseguinte, têm recebido atenção especial no meio científico (WU et al., 2012). Dentre os polímeros mais utilizados na encapsulação de bioativos os que formam matrizes hidrofílicas apresentam maior aplicabilidade. Como exemplos, temos os polímeros derivados do ácido acrílico como carbâmeros, polímeros da celulose como a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), além dos não-celulósicos, naturais ou semissintéticos como as gomas, ágar-ágar, quitosana e alginatos. Dentre estes, os alginatos estão entre os mais utilizados em processos de encapsulação de ativos, apresentando características de excelência como suporte para liberação de drogas e diversas macromoléculas bioativas (OMAR et al., 2015; PALESH et al., 2017; NATH 7 DOLUI, 2018).

Ding & Shah (2009) relataram proteção contra condições severas para os probióticos *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, a partir de matrizes formadas por alginato associado a gomas variadas, como guar, xantana, alfarroba e carragena (DING & SHAH, 2009). Kim et al. (2012) encapsularam *Pantoea agglomerans* em *beads* de alginato e obtiveram proteção frente a condições ambientais severas além de liberação controlada para uso como agente de controle biológico (KIM, 2012). Serrano-Casas et al. (2017) co-encapsularam bagaço de maçã derivada da produção de cidra, farinha de casca de pêra, além da inulina como controle, juntamente com

bactérias lácticas termotolerantes em gel de alginato ionotrópico. Eles observaram maior viabilidade das bactérias encapsuladas para produtos com maior tamanho de partículas, sobretudo nas compostas por bagaço de maçã. Microcápsulas com tamanho em torno de 100 µm apresentaram maior capacidade de resistência a condições ácidas estomacais, garantindo a entrega de cepas probióticas no cólon ao longo do trato gastrointestinal (SERRANO-CASAS et al. 2017).

Adicionalmente, é possível alterar diversas propriedades nos polímeros utilizados na encapsulação de ativos de forma simples, através da combinação destes com materiais de composição diferente, o que possibilita melhoria em diversas características dos produtos formulados. Zhai et al. (2015) demonstraram uma nova técnica de emulsão dupla para a preparação de microesferas compostas de poli(ácido lático-co-ácido glicólico) – PLGA e alginato para encapsular proteínas hidrofílicas. As microesferas do compósito PLGA/alginato apresentaram maior capacidade de retenção de proteínas durante os processos de preparação e lavagem. A adição de alginato proporcionou erosão mais lenta e a taxa de degradação menor, levando a um melhor controle da liberação das proteínas. Eles sugeriram que as microesferas do compósito podem ser eficazes como um dispositivo de matriz polimérica para a liberação sustentada de biomoléculas hidrofílicas em uma variedade de aplicações. Batista et al. (2017) utilizaram um nanocompósito polimérico composto por alginato de sódio e bentonita sódica no encapsulamento de *B. bassiana*. Tal matriz avaliada foi considerada no atual trabalho e será abordada de forma mais detalhada adiante (BATISTA et al., 2017).

Para a encapsulação de feromônios aplicados no controle de insetos-praga, o dispositivo utilizado precisa garantir a liberação em concentrações adequadas e, preferencialmente, pelo maior tempo possível. A concentração dos voláteis liberados deve ser suficiente para detecção pelo inseto sem que haja liberação exagerada, ao ponto de tornar sua utilização economicamente viável. Adicionalmente, a taxa de liberação destes compostos não deve ser influenciada por condições ambientais, como ocorre em alguns dispositivos que permitem o aumento da volatilidade frente a altas temperaturas, por exemplo (HAGLEY, 1963). Diversos estudos avaliam matrizes que proporcionem cinética de evaporação/liberação constante do feromônio, sobretudo pela adsorção deste na matriz e conseqüente liberação gradual para o ambiente, aumentando a eficiência no controle da praga. Esta velocidade de liberação pode ser modulada em sistemas matriciais através de diversas combinações dos constituintes e modificações estruturais do arcabouço da matriz (SEO et al., 2016).

Emissores sob a forma de pastas a base de óleos e ceras que visam a evaporação de feromônios vêm sendo utilizados com sucesso em sistemas de manejo de pragas. Esses sistemas

fazem parte das tecnologias especializadas na aplicação de feromônios e iscas - SPLAT (*Specialized Pheromone and Lure Application Technology*). São formulações matriciais formadas a partir de materiais biologicamente inertes usados para controlar a liberação de semioquímicos com ou sem pesticidas. Permite a emissão de feromônios em níveis eficazes de supressão de pragas por intervalos que variam entre 2 e 16 semanas (STELINSKI et al., 2007).

2.2.3.3 Nanocompósitos

A nanotecnologia é a manipulação ou automontagem de átomos individuais, moléculas ou grupos moleculares em estruturas para criar materiais e dispositivos com propriedades novas ou muito diferentes. A nanotecnologia pode funcionar de cima para baixo, o que significa reduzir o tamanho das menores estruturas à nanoescala, por exemplo, aplicações fotônicas em nanoeletrônica e nanoengenharia, ou ascendente, que envolve a manipulação de átomos e moléculas individuais em nanoestruturas com maior aplicação na química e biologia (JOSEPH & MORRISON, 2006). A combinação de polímeros com preenchedores orgânicos ou inorgânicos leva a formação de materiais denominados compósitos. Estes apresentam uma interface de separação entre os componentes da mistura que estão inter-relacionados e, ao menos em escala microscópica, esta interface é bem definida e separa os elementos constituintes que formam o material. De forma geral, este material inorgânico participa da massa total do produto em pequenas proporções, geralmente em torno entre 0,5 e 5%, atuando como enchimento ou reforço à matriz polimérica (OLIVEIRA et al. 2006; LAGALY, 1999). O elemento preenchedor desta mistura pode apresentar dimensões nanométricas, como no caso dos nanocompósitos, em que esta escala se apresenta na ordem de nanômetros em ao menos uma direção (PAIVA et al., 2008). Desta forma, um nanocompósito pode ser descrito como um material multifásico onde uma ou mais das fases têm pelo menos uma dimensão na ordem de 100 nm ou menos. Geralmente podem apresentar melhorias sinérgicas de suas propriedades em relação as fases individuais dos componentes (FU et al., 2019).

Diversos tipos de preenchedores podem ser utilizados na produção de nanocompósitos. Estes podem ser categorizados em três tipos principais, dependendo das dimensões das cargas em nanoescala dispersas. No primeiro tipo, os preenchedores se apresentam em nanoescala bidimensional (2D), tais como silicato lamelares, grafeno, dentre outros. Estes apresentam folhas com espessura medindo entre um a algumas dezenas de nanômetros, enquanto o

comprimento pode chegar a algumas centenas ou milhares de nanômetros de comprimento (ALBDIRY et al., 2013). Em um segundo tipo, o material apresenta duas dimensões em escala nanométrica, sendo a terceira maior, o que gera uma estrutura unidimensional alongada. São exemplos as nanofibras ou nanotubos (LIU et al., 2014). Já o terceiro tipo são os nanocompósitos contendo cargas nanométricas com as três dimensões na ordem de nanômetros. Esses preenchedores se caracterizam como nanopartículas iso-dimensionais de baixa razão de aspecto, ou seja, pequena razão entre o diâmetro de Feret mínimo e máximo, como ocorre nas sílicas esféricas, nas nanopartículas semicondutoras e nos quantum dots (HUANG et al., 2016).

A nanotecnologia possui enorme potencial em diversos campos de estudo, com ampla aplicabilidade no desenvolvimento de inseticidas, produtos farmacêuticos, eletrônicos, dentre outros. Especificamente no campo da agricultura, os nanomateriais foram desenvolvidos sobretudo para o manejo de pragas de insetos. A tecnologia de microencapsulação pode reduzir a influência deletéria de ambiente circundante sob o material encapsulado, prolongar a atividade dos compostos ou reduzir sua toxicidade, além de evitar contaminação dos ativos encapsulados (CHEN et al., 2018). Alterações nas técnicas de processamento (tipo e/ou parâmetros) de nanocompósitos argila/polímero são capazes de influenciar enormemente a nanoestrutura final, a morfologia e as propriedades mecânicas dos nanocompósitos (ALBDIRY et al., 2013).

Devido a possibilidade de surgimento de novas características e, geralmente, a ocorrência de melhorias nas propriedades do material, enorme interesse por parte de indústrias de diversas áreas tem intensificado as pesquisas sobre tais materiais (ZARBIN, 2004). Destaca-se nesse cenário a indústria farmacêutica, que realiza inúmeras pesquisas de matrizes nanoestruturadas passíveis de aplicação na área, à priori, com finalidade de liberação controlada de princípios ativos (RATHORE et al., 2013).

Polímeros hidrofílicos são bastante utilizados como matriz de encapsulação, apresentando como característica marcante a alta capacidade de captação de água. Os alginatos são exemplos de biopolímeros de caráter hidrofílico que apresentam esta propriedade. Este comportamento pode influenciar fortemente os perfis de liberação dos ativos encapsulados, e pode ser explicado pela presença de vacâncias desidratadas no interior da malha polimérica, que produzem uma tendência de absorção de água para hidratação da mesma (YOTSUYANAGI et al., 1991). As diferenças de pressão osmótica que podem ocorrer entre o sistema e o ambiente externo são cruciais para que este fenômeno ocorra. O contato da matriz polimérica com fases líquidas hidrofílicas leva ao relaxamento da estrutura polimérica e absorção de água até que seja estabelecido o equilíbrio dinâmico entre as fases (HAUG & LARSEN, 1962). Para nanocompósitos compostos por polímeros hidrofílicos, a capacidade de

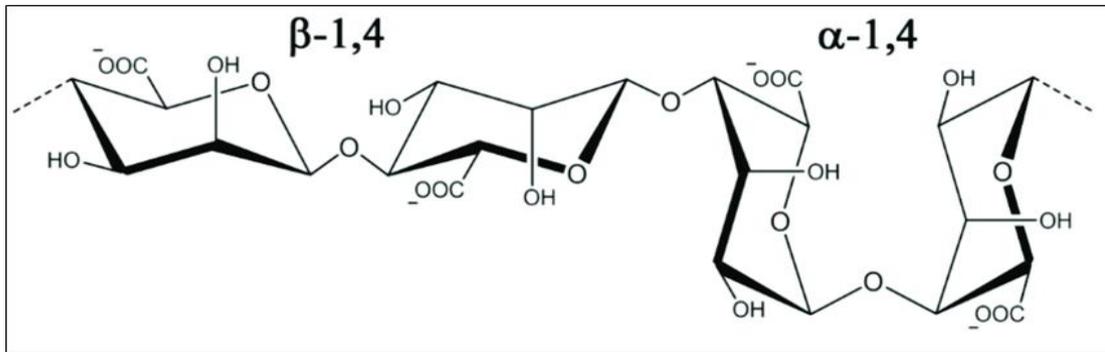
captação de água pode ser alterada, tanto por conta de alterações no arcabouço estrutural da rede polimérica quanto por modificações na taxa de difusão de ativos encapsulados (GROVER et al., 2012).

Hidrogéis formados a partir destes polímeros hidrofílicos se caracterizam por redes tridimensionais formadas a partir de homopolímeros, copolímeros ou macrómeros hidrofílicos (cadeias macromoleculares pré-formadas) reticuladas para formar matrizes poliméricas insolúveis. Esses polímeros, geralmente usados acima de sua temperatura de transição vítrea (Tg), são tipicamente macios e elásticos devido à sua compatibilidade termodinâmica com a água e têm sido usados em muitas aplicações biomédicas, dentre outras (SLAUGHTER et al., 2009).

2.2.3.3.1 Alginato

O alginato é um polissacarídico de origem natural extraído da parede celular de diversas espécies de algas que pertencem à família *Phaeophyceae*, representada principalmente pelas algas marrons. Ele se apresenta como biopolímero de caráter aniônico com estrutura formada por unidades monoméricas de β -D-manuronila e α -L-guluronila unidas através de ligações glicosídicas entre seus carbonos 1 e 4 (1-4) (FISCHER & DÖRFEL, 1955). Estas unidades se mantêm organizadas em blocos ao longo da cadeia (Figura 9). O alginato é solúvel em água e nela formam um gel ou solução coloidal de alta viscosidade. Desta forma, interferem nas características reológicas dos produtos derivados, atuando inclusive como agente tixotrópico, a depender das condições. Isto faz com que os alginatos despertem grande interesse na indústria, sobretudo como excipiente na área farmacêutica (KIM & LEE, 1992). A composição do alginato é determinada principalmente pela espécie utilizada na extração bem como pelas partes da alga marinha utilizadas (MCHUGH, 1987). A sequência de composição dos blocos poliméricos e o peso molecular dos alginatos são importantes pois determinam as propriedades físicas do gel formado (HAUG et al., 1966).

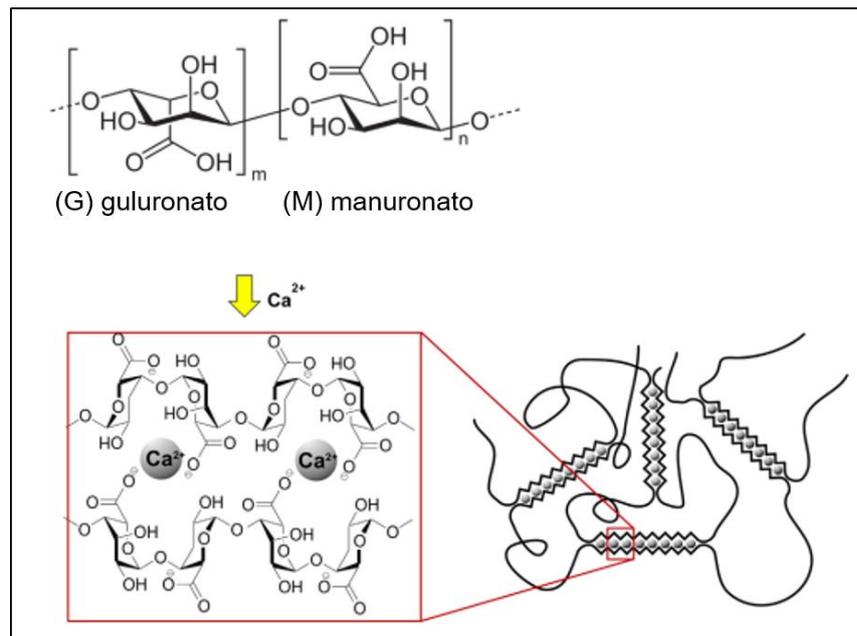
Figura 9 - Estrutura e conformação de ligações glicosídicas do ácido β -D-manurônico e do ácido α -L-gulurônico.



Fonte: ARLOV & SKJÅK-BRÆK, 2017.

Dois fatores muito importantes são determinantes nas propriedades físicas do gel, a sequência dos monômeros na cadeia e o peso molecular. A capacidade gelificante do alginato justifica sua larga utilização em processos de encapsulação, especialmente na área farmacêutica, isto porque o gel formado é termoestável e de produção bastante simples (KIM & LEE, 1992). No caso do alginato de sódio, que apresenta como íon intercambiável moléculas de sódio acopladas ao monômero α -L-guluronila, esta gelificação ocorre através da troca iônica deste íon por cátions divalentes, a exemplo do cálcio (Ca^{2+}) (Figura 10), bário (Ba^{2+}), estrôncio (Sr^{2+}) e zinco (Zn^{2+}). A esta reação de troca iônica que resulta na formação do gel se dá o nome de gelificação ionotrópica, onde os cátions intercalados ficam aprisionados no interior de cavidades com caráter eletronegativo. Esta disposição faz com que a rede polimérica assumam uma conformação complexa, formando redes tridimensionais que são chamadas *egg-box* (GRANT et al., 1973).

Figura 10 - Estrutura do alginato e suas ligações aos íons cálcio no modelo “egg-box”.



Fonte: GRANT et al., 1973.

As primeiras partículas de alginato com propósitos de encapsulamento foram desenvolvidas em 1980 (LIM & SUN, 1980). Desde então, um grande número de pesquisas científicas sobre o seu desenvolvimento e aplicação foram realizadas. Por tal, o alginato se tornou um dos polímeros com maior aplicabilidade na produção de micropartículas de hidrogel (PAQUES et al., 2014). Os fungos saprófitos e simbioses *Trichoderma harzianum* e *Glomus* sp. foram co-encapsulados por De Jaeger et al. (2011) em *beads* formados por este biopolímero, visando testar a compatibilidade e aplicabilidade dos bioativos e os impactos deste complexo no ciclo de vida do fungo *Micorriza arbuscular*, essencial na absorção de nutrientes do solo por raízes de algumas plantas (DE JAEGER et al., 2011). Os autores relataram a importância da encapsulação em matriz de alginato, onde os resultados demonstraram aumento no potencial de virulência de ambos os fungos e adequação dos produtos para aplicação em solo. Outro fungo encapsulado em matriz composta por alginato foi o *Trametes versicolor*, que apresenta alto poder de degradação de vários xenobióticos. Arica et al. (2001), avaliaram o encapsulamento deste fungo para utilização como bioissorvente para remoção de íons de cádmio de meios aquosos. Neste estudo foi verificada cinética de bioissorção de pseudo-segunda ordem, onde os autores atribuíram ao alginato grande sucesso na encapsulação, inclusive possibilitando a regeneração do produto para reutilização com até 97% de recuperação por até três ciclos (ARICA et al., 2001). Lee et al. (2011) encapsularam *Saccharomyces cerevisiae* e demonstraram aumento do rendimento de produção de etanol de 88% para praticamente 100%,

comparando-se o microrganismo imobilizado em *beads* de alginato com o mesmo em sua forma livre. Adicionalmente, o tempo de fermentação se mostrou mais rápido, entre 10 e 14 horas e com menor ou até mesmo nenhuma formação de subproduto metabólico (LEE et al., 2011).

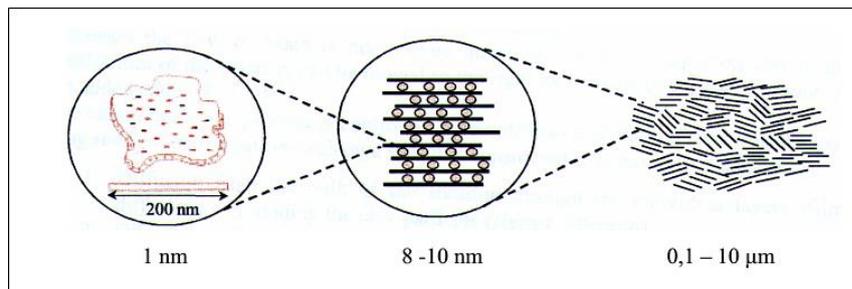
O método de gelificação ionotrópica simples possibilita a obtenção de uma matriz com característica predominantemente hidrofílica e que se apresenta inerte para diversas aplicabilidades (JAN, 2002). Tais Hidrogéis são caracterizados por sua hidrofiliçidade, porém, insolubilidade em água. Este fenômeno ocorre porque quando entram em contato com um meio aquoso eles intumescem (incham) devido a captação de água, até atingir um volume de equilíbrio, contudo, conservam o formato original de sua estrutura. A manutenção do arcaçouço é acessada sobretudo pela presença de forças coesivas da rede tridimensional do hidrogel. A alta capacidade de intumescimento é atribuída sobretudo à presença de grupamentos com alta probabilidade de interação com a água (p.ex.: -OH, -COOH, -CONH, -SO₃H) na estrutura química do polímero (BAVARESCO et al., 2002).

A alta capacidade de absorção de água pela rede polimérica tanto pode ser elencada como uma vantagem do polímero, contudo, também pode representar uma desvantagem, a depender da finalidade e dos objetivos de sua utilização. Como exemplo temos as elevadas taxas de difusão de ativos encapsulados por conta da rápida hidratação da rede polimérica e consequente relaxamento de sua estrutura. Outras características também podem não satisfazer os requisitos necessários a encapsulação de bioativos pelo mesmo motivo. Dentre estas características podem ser destacadas a resistência mecânica relativamente baixa e a alta porosidade da estrutura gelificada. *Beads* de alginato limitam-se a aplicações de liberação a curto prazo (VOO et al., 2015). Este fenômeno pode representar uma limitação de sua utilização isoladamente a depender da finalidade da formulação. Ainda, os cátions responsáveis pela reticulação das cadeias podem ser removidos da rede polimérica, sobretudo na presença de íons monovalentes em contato com o produto, o que resulta em rompimento do hidrogel por desestabilização da rede tridimensional (WU et al., 2012). Uma forma de contornar estas limitações é através da combinação do alginato com outros materiais, afim de proporcionar melhoria de suas propriedades e potencializar sua aplicabilidade. Aumento da resistência mecânica, diminuição da porosidade, melhorias nas propriedades de enchimento e surgimento de efeitos de barreira estão entre as principais melhorias advindas destas combinações (BOURBIGOT et al. 2004).

2.2.3.3.2 Bentonita sódica

As argilas são materiais terrosos naturais compostos por um ou mais argilominerais que compõem o solo, derivados sobretudo de rochas divididas finamente e geralmente de caráter cristalino. Dentre os minerais presentes neste tipo de material estão os carbonatos, os silicatos lamelares de magnésio e de alumínio (filossilicatos), o quartzo, o feldspato, os óxidos metálicos. A unidade nanométrica das argilas é formada pelas lamelas cristalinas que apresentam entre 100 a 200nm de diâmetro médio e aproximadamente 1nm de espessura (BERGAYA et al., 2006). Ocorre naturalmente como partículas primárias que formam agregados irregulares com diâmetro variando entre 0,1 e 10 μm . Estes geralmente possuem de 8 a 10 lamelas acopladas que permanecem unidas pela presença de íons interlamelares. Tal conformação é responsável pela formação da sua estrutura estratificada, demonstrada na figura 11 (ALEXANDRE & DUBOIS 2000; RAY & BOUSMINA, 2005).

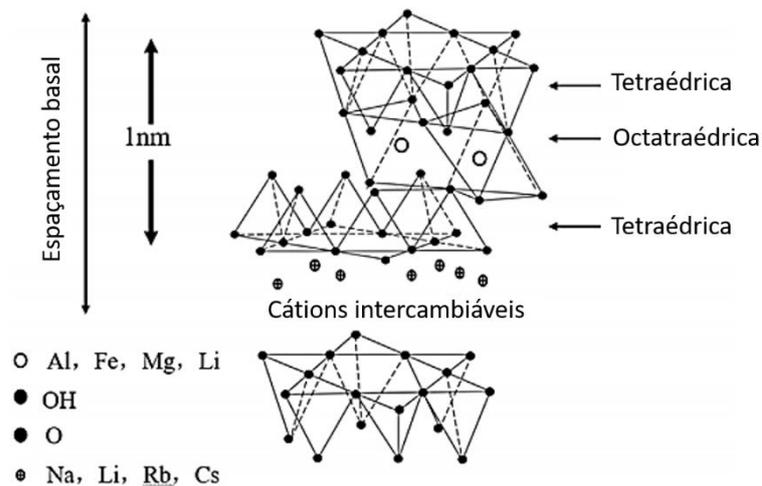
Figura 11 - Microestrutura da montmorilonita.



Fonte: KORNMANN, 2019.

A nomenclatura dos diferentes tipos de argilas é dada pelas conformações que as lamelas mantêm entre si, ou seja, entre as folhas tetraédrica e octaédricas que formam sua estrutura cristalina. Um conjunto de lamelas empilhadas paralelamente forma o espaço interlamelar, mantido por forças eletrostáticas, de van der Waals e ligações de hidrogênio, o que possibilita o afastamento entre elas e possível inserção de compostos de interesse. Esta separação ocorre principalmente quando hidratadas ou submetidas a tensão (PAVLIDOU & PAPASPYRIDES, 2008). A figura 12 representa de forma geral das estruturas lamelares das argilas:

Figura 12 - Diagrama esquemático geral de argilas tipo esmectita 2:1.



Fonte: FU et al., 2019 (Adaptada).

Morfologicamente, os argilominerais cristalinos que compõem as argilas podem ser classificados como lamelares ou fibrosos. Os silicatos lamelares ou em folhas, também chamados de filossilicatos, podem se apresentar em camadas 1:1 (dimórficos) como a caulinita, 2:1 (trimórficos) como a montmorilonita e 2:2 (tetramórfico) como a clorita (NEUMANN et al., 2000). As subdivisões 1:1 e 2:1 estão relacionadas ao número de camadas de tetraedro de óxido de silício (SiO_4) e de octaedros de óxido de alumínio (Al_2O_3), em referência a organização da cela unitária de sua estrutura cristalina. Já as argilas fibrosas como a atapulgita e a sepiolita, também apresentam estrutura 2:1, contudo, sua estrutura está disposta de forma cruzada, onde cada camada tetraédrica sofre inversão de 180° dentro de um intervalo de quatro a seis tetraedros de SiO_4 . O resultado desta conformação é a formação de canais ao longo de toda direção longitudinal da fibra (WHITE & HEM, 1983).

As interações químicas existentes na formação de cada tipo de folha ocorrem da seguinte forma: 1) para as folhas tetraédricas, os grupamentos Si-O possuem extremidades compartilhadas, desta forma, cada tetraedro compartilha três de seus átomos com mais três tetraedros circunvizinhos. Assim, a fórmula estrutural $(\text{Si}_2\text{O}_5)_n$ é observada para este tipo de folha; 2) aplicando o mesmo raciocínio, as folhas que possuem geometria octaédrica, apresentam fórmula geral $\text{AlO}(\text{OH})_2$, já que sua estrutura é composta por cátions Al^{3+} que se ligam aos ânions O^{2-} e OH^- . Por conseguinte, a interação entre estas duas folhas se dá a partir do compartilhamento de um átomo de oxigênio do Si-O da porção tetraédrica com um octaedro Al-O/OH da folha paralela. Tais ligações entre os átomos das folhas apresentam caráter covalente, ou seja, são ligações fortes (RAY & OKAMOTO, 2003).

Um elevado grau de possibilidade de troca catiônica pode ser alcançado com substituições do tipo isomórficas. Neste tipo de substituição, os átomos de silício que se encontram quimicamente ligados às camadas tetraédricas das folhas podem ser trocados por átomos de alumínio (Al^{3+}), o que resulta em aumento da carga negativa no espaço lamelar. Como neste espaço existem muitos cátions intercambiáveis, existe uma grande disponibilidade de realizar estas trocas, fenômeno que é bem característico das argilas lamelares. A partir desta propriedade diversos compostos de intercalação podem ser gerados (ROSETO et al., 2009).

Dentro da conhecida família das argilas esmectitas merece destaque a bentonita, composto inorgânico que possui como constituinte majoritário a montmorilonita (Mt). Suas lamelas são compostas de átomos de silício coordenados de forma tetraédrica fundidos em um plano octaédrico comum de magnésio (Mg^{2+}) e alumínio (Al^{3+}). A Mt representa aproximadamente 60% de sua composição, sendo encontrados ainda compostos provenientes de rochas vulcânicas, cátions diversos, traços de quartzo e feldspato. Funciona muito bem como composto hospedeiro e ainda apresenta alta estabilidade frente a variações de pH (YUXIN et al., 2012). A Mt também apresenta grupos terminais de hidroxila pendentes nas superfícies, grande área superficial específica, boa capacidade de adsorção, excelente capacidade adesiva. É passível de aplicação como carreador de diversos compostos, dentre eles inúmeros tipos de drogas utilizadas na área farmacêutica, pesticidas químicos e biológicos, fertilizantes e muitos outros (JOSH et al., 2009). Por este motivo, esta argila tem recebido significativa atenção de variadas áreas da indústria, especialmente no agronegócio. Por apresentar grande poder de adsorção de substância e se mostrar inócua para seres vivos e para o meio ambiente no geral, desponta como material ecologicamente correto e de baixo custo, ideal para aplicação no controle biológico de pragas (MENEZES et al., 2009).

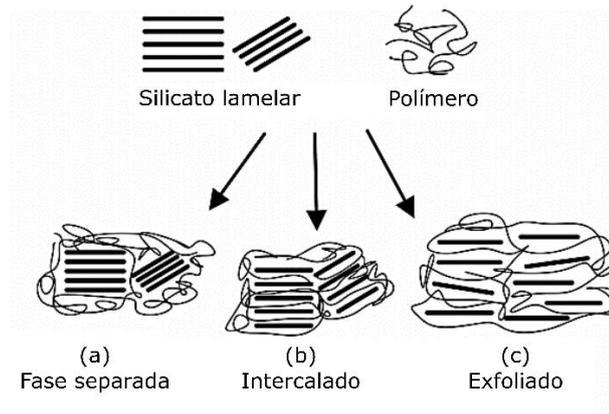
Anadão et al. (2007) obtiveram resistência a degradabilidade frente à temperatura em membranas de nanocompósito preparado com polissulfona e montmorilonita sódica. Eles relataram uma maior temperatura de degradação deste material de 29 a 116°C em um produto contendo o filossilicato em concentração de 3%, quando em comparação com o polímero puro. Esta maior resistência foi atribuída aos efeitos de barreira e de labirinto proporcionados pelas várias camadas lamelares da argila. Além disso, foi relatado que a maior resistência mecânica e de ruptura, atribuídas às interações entre a rede polimérica e os diversos pontos de ligação disponíveis nas lamelas da Mt. Eles também enfatizaram a importância do alinhamento das camadas do silicato na mesma direção da deformação avaliada, que proporciona melhores propriedades mecânicas (ANADÃO et al., 2007).

Oliveira et al. (2008) avaliaram o efeito fotoprotetor de argilas organofílicas em nanocompósito polimérico à base de polímeros estirênicos. Os autores observaram que houve maior resistência à perda de massa molecular média a partir da exposição à luz ultravioleta (UV) nos nanocompósitos com maior conteúdo de argila. Enquanto o polímero puro demonstrou perda de massa de 85% após um período de exposição de 12 semanas, produtos preparados com 2,5; 5,0 e 7,5% de silicato demonstraram perdas de 83,5; 79,5 e 72,6%, respectivamente. Eles atribuíram este fenômeno a presença das camadas lamelares da argila, que agem como uma barreira tanto contra a radiação UV quanto a difusão de oxigênio através da matriz (OLIVEIRA et al., 2008). Este efeito protetor é de suma importância na produção de bioinseticidas, sobretudo pela suscetibilidade dos bioativos a fatores abióticos.

Oh et al. (2009) produziram um hidrogel bentonita/alginato sensível a pH e carregado com uma droga protéica modelo (BSA) para curativos de feridas. Eles descreveram as limitações do uso de alginato para liberação de fármacos, sobretudo pela lixiviação dos ativos e rápida dissolução do polímero em pH mais alto, o que pode resultar em menor eficiência de aprisionamento e *burst* de liberação. Os resultados mostraram menores taxas de intumescimento bem como de liberação dos ativos com o aumento da concentração de bentonita. A liberação também foi mais lenta em pH de 4,5 e mais rápida em pH de 9,2. Eles atribuíram a presença desta argila a diminuição da taxa de dissolução do alginato no pH mais alto, garantindo a liberação controlada do fármaco encapsulado (OH et al., 2009).

Na produção de nanocompósitos poliméricos, a montmorilonita desponta como um dos filossilicatos mais utilizados. As forças que são aplicadas para formação do sistema e as interações interfaciais que existirão entre o silicato e a matriz polimérica utilizada são determinantes para o tipo de material formado. O polímero pode interagir com a argila através de adsorção superficial, ou seja, determinados pontos da estrutura química do polímero podem se ligar superficialmente às lamelas da argila, estando adsorvido a ela sem que haja alterações no espaço interlamelar. Desta forma, fases separadas podem ser notadas, onde existem domínios próprios do silicato em contato com domínios do polímero. A figura 13 demonstra como ocorre esta interação (RAY & BOUSMINA, 2005).

Figura 13 - Tipos de compósitos formados a partir de modificações estruturais em argilas.



Fonte: FU, et al., 2019 (Adaptada).

Os nanocompósitos que possuem a porção inorgânica composta por argilas filossilicatadas associadas à uma matriz polimérica recebem a denominação de nanocompósitos polímero/silicato lamelar, que origina-se do termo em inglês, *polymer-layered silicate nanocomposite* (PLN). Em uma estrutura denominada intercalada, ocorre a inserção de espécies hóspedes móveis no interior das lamelas. Este processo é chamado de intercalação, que só é possível caso o hospedeiro, que neste caso é a estrutura lamelar, apresente sítios livres disponíveis para a acomodação do hóspede. Essa inserção ocorre de forma cristalograficamente regular, onde a disposição entre as camadas da argila e as cadeias poliméricas se dá de forma alternada (KEVADIYA et al, 2009; YUXIN et al., 2012). O processo de delaminação da argila na presença de um polímero resulta na obtenção de uma estrutura esfoliada, ou seja, as lamelas são totalmente separadas umas das outras. Geralmente ocorre a partir da utilização de polímeros de alto peso molecular (VAIA & GIANNELIS, 1993).

Modificações em diversas propriedades podem ser obtidas em associações de argilas com matrizes poliméricas, dentre elas térmicas, mecânicas e de barreira. Melhorias na estabilidade térmica de nanocompósitos tem relação direta com a menor difusão de moléculas de oxigênio para dentro de sua estrutura. Esse fenômeno é possível devido a propriedade de barreira exercida pelas estruturas lamelares da argila, que funcionam como obstáculos a serem transpostos pelas moléculas. Com a diminuição da presença de oxigênio no interior do nanocompósito, ocorre menor grau de degradação oxidativa e conseqüentemente menor deterioração do polímero. Este efeito barreira torna as argilas lamelares passíveis de aplicação em produtos que visem o controle de liberação de compostos voláteis, como é o caso dos

feromônios (RAY & OKAMOTO, 2003). A obtenção de melhorias nestas propriedades é alvo de muitos estudos com estes materiais

2.3 Formulações co-encapsuladas

A entrega direcionada de um agente de controle biológico em um alvo e/ou num local determinado é uma característica muito importante que diminui o número de aplicações e reduz as doses necessárias de bioativo. Especialmente para substâncias co-encapsuladas de baixa dose, o impacto ambiental é reduzido. A entrega direcionada pode ser alcançada com o auxílio de sistemas de liberação prolongada, onde a liberação do ativo depende de determinados desencadeadores, a exemplo das condições ambientais do local, bem como pelas propriedades intrínsecas dos materiais. Assim, co-formulações que seguem a estratégia de atrair e matar (*attract-and-kill*) apresentam grande importância no controle de pragas (VEMMER & PATEL, 2011; SUKOVATA et al., 2012; SCHUMANN et al., 2012; KROSCHEL & ZEGARRA, 2013; MORRISON et al., 2016).

O uso de dispositivos que objetivam atração e morte de insetos-praga aumentou bastante nos últimos anos, pois estas técnicas permitem atrair o inseto para um determinado local sem que haja a necessidade de pulverizar produtos como inseticidas na cultura. Diferentemente da técnica de captura em massa, utilizada no controle comportamental do *R. palmarum* e de outros insetos-praga, a tática de atrair e matar visa a morte dos insetos sem que haja necessariamente a retenção deles em uma armadilha, inclusive ocorrendo disseminação a partir do inseto que foi contaminado para outros indivíduos sadios (NAVARRO-LLOPIS et al., 2013). Como o único produto registrado no MAPA para controle de *R. palmarum* é o Rincoforol, o desenvolvimento de uma formulação que siga estes princípios é de enorme importância para o agronegócio.

A veiculação deste feromônio ainda é, hoje em dia, a principal barreira para sua comercialização. Ele está disponível em dispositivo de liberação tipo microtubo plástico com tampa, que mimetiza a ação de uma cápsula (Eppendorf *safe-lock*[®]) contendo 0,7 mL de Rincoforol. Este é fixado normalmente com auxílio de um arame na parte interna da tampa da armadilha. Para que ocorra a liberação do feromônio se faz necessário fazer um orifício de 1 mm de diâmetro na tampa do dispositivo (NAVARRO et al., 2002). Estes Eppendorfs não conferem proteção adequada ao feromônio, que pode sofrer efeitos deletérios provenientes das condições ambientais do local, tais como a temperatura e o fluxo de ar. Adicionalmente, por

serem tubos feitos de plásticos, geram resíduos não biodegradáveis que poluem o meio ambiente, indo de encontro às práticas ecologicamente corretas demandadas nos dias de hoje.

Muitos grupos dedicam suas pesquisas visando o desenvolvimento de matrizes com alta capacidade de adsorção de feromônios, sobretudo para proporcionar proteção e modulação de sua liberação no ambiente (FUNES et al., 2016; CORREIA et al., 2017; CERIANI-NAKAMURAKARE et al., 2017; LUCHI et al., 2018; VIANA et al., 2018). Tais matrizes podem promover a liberação de feromônios nas concentrações ideais, ou seja, suficiente para o reconhecimento por parte do inseto, mas sem que haja volatilização exacerbada, ao ponto de tornar o produto oneroso pela grande demanda a ser utilizada (LUCHI et al., 2018).

Sistemas *in vitro* são importantes ferramentas de avaliação da velocidade de liberação e da estabilidade dos feromônios adsorvidos em matrizes de liberação antes que estes dispositivos sejam testados em campo. De forma geral, três metodologias significativas são aplicadas para avaliação da cinética de liberação de semioquímicos, a gravimetria, a extração total por solvente e a coleta dinâmica de voláteis. O método gravimétrico se utiliza da porcentagem de perda de massa resultante da volatilização do feromônio. No segundo método, utiliza-se um solvente orgânico para extração total do feromônio que encontra-se adsorvido em uma determinada matriz, ou seja, recupera-se o feromônio que foi incorporado analisando-se a razão entre a concentração final e a inicial. Este solvente contendo o semioquímico é então analisado por cromatografia gasosa. Já a coleta dinâmica de voláteis é realizada em câmara de aeração seguida de uma extração. Os voláteis liberados a partir do dispositivo no interior da câmara são arrastados por fluxo de ar para cartuchos (*traps*) contendo material adsorvente, ficando nele retidos. Segue-se uma extração com solvente orgânico e posterior quantificação por cromatografia gasosa (HEUSKIN et al., 2011).

Além de não existirem produtos registrados baseados no método de atrair e matar para a colebroca de *R. palmarum* por meio de infecção indivíduo-indivíduo, a carência de estudos com este objetivo é notória na literatura científica. Tal cenário impulsiona a realização de pesquisas nesta área e foram o escopo principal deste trabalho.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver e avaliar formulações bioinseticidas co-encapsuladas de liberação modificada contendo conídios fúngicos de *B. bassiana* encapsulados em associação com feromônio de agregação de *R. palmarum* em nanocompósito alginato/bentonita na forma de *beads*.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a susceptibilidade de *B. bassiana* ao Rincoforol;
- Desenvolver formulações co-encapsuladas contendo Rincoforol e *B. bassiana*;
 - Caracterizar os nanocompósitos quanto a(o):
 - Análise estrutural:
 - DRX;
 - FTIR;
 - Rendimento das formulações;
 - Índice de intumescimento;
 - Morfologia:
 - Estereoscopia;
 - MEV;
 - Tamanho de partículas;
 - Esfericidade;
 - Quantificar o Rincoforol e avaliar a taxa de recuperação por CG-MS;
 - Verificar a distribuição dos conídios nos *beads*:
 - Microscopia de fluorescência;
 - Analisar a liberação dos conídios a partir do nanocompósito;
 - Realizar a análise patentária relacionada ao produto.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

O agente bioativo (conídios de *Beauveria bassiana* cepa CPATC032) foi obtido e isolado a partir dos insetos-praga de *Rhynchophorus palmarum* encontrados naturalmente infectados no estado de Sergipe. Este isolado nos foi cedido pela Embrapa Tabuleiros Costeiros. A multiplicação do bioativo fúngico foi realizada em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar, BDA (Himedia, Índia). O agente tensoativo não-iônico Tween 80[®] (Sigma-Aldrich, Alemanha) foi utilizado como espalhante adesivo para a suspensão. Os compostos utilizados no preparo das formulações foram adquiridos comercialmente: alginato de sódio (Sigma-Aldrich, Alemanha), bentonita sódica (Bentec Laviosa Chimica Mineraria S.p.A., Itália) e cloreto de cálcio (CaCl₂) (Vetec, Brasil). O feromônio Rincoforol (6-metil-2 hepten-4-ol) foi doado pela Interacta Química Ltda (Alagoas, Brasil). Adsorvente Porapak[®] (etilvinilbenzeno-divinilbenzeno - Supelco) foi empregado na coleta de voláteis. Foi usado solvente orgânico n-hexano grau HPLC (Dinâmica, Brasil) para extração dos voláteis adsorvidos. A substância 6-metil-5-hepten-2-ona com 99% de pureza (Sigma-Aldrich) foi usada como padrão interno.

4.2 Métodos

4.2.1 Microrganismo e meio de cultura

O isolado CPATC032 foi repicado em placas de Petri contendo meio nutritivo BDA e mantidas em câmara de germinação (Solab, Brasil) a 28 (±1)°C adaptada com fotoperíodo de 12 horas. Para a preparação das formulações foram utilizadas suspensões obtidas a partir da raspagem de colônias com 10-14 dias (ALVES et al., 1996). Este material foi então inoculado em água destilada contendo Tween 80[®] a 0,02%. A biomassa fúngica foi então filtrada através de gaze estéril, visando à retirada das demais estruturas fúngicas, como hifas, conidióforos e fiálides (ALVES et al., 1996). A concentração destes na suspensão obtida foi determinada em câmara de Neubauer (hemacitômetro) (New Optik, Brasil), com o auxílio de microscópio óptico (Metrimpax Hungary/PZO-Labimex, Polônia) (DEMBILIO et al., 2010). A viabilidade desta suspensão foi determinada através do semeio de alíquotas de 50 µL em círculos de 2,5 cm de

diâmetro delimitados em placas de Petri contendo 5 mL de meio de cultura BDA. A alíquota semeada agitada orbitalmente para espalhar os conídios e evitar sobreposição dos mesmos. Estas placas foram incubadas por 16 horas para verificação de germinação. A viabilidade foi determinada através da contagem de 200 conídios observados em até quatro campos diferentes de uma mesma alíquota, classificando-os como viáveis (conídios que apresentam tubo germinativo com comprimento igual ou maior ao seu próprio diâmetro) ou não (SINGH et al., 2009).

4.2.1.1 Teste de susceptibilidade fúngica ao Rincoforol

A suscetibilidade de *B. bassiana* frente ao Rincoforol foi testada a partir da mistura direta da suspensão fúngica com o feromônio. Isto proporcionou contato direto do bioativo com o quimioatratador, visando à verificação de efeito deletério desta exposição. Uma suspensão de conídios fúngicos em concentração de 10^8 conídios/mL foi misturada em diferentes proporções ao Rincoforol. Foram testadas como variáveis a proporção suspensão/feromônio e o tempo de exposição. Quanto a proporção, o Rincoforol foi incorporado às suspensões em concentrações variando entre 2,5; 5,0 e 10,0% (v/v). Quanto ao tempo de exposição, alíquotas de cada mistura foram semeadas em placas de viabilidade contendo BDA como segue: imediatamente pós-mistura e após períodos de 1; 2 e 3 horas de contato suspensão/feromônio. As placas foram mantidas em câmara de germinação e lidas inicialmente 16 horas após terem sido semeadas ou até os primeiros indícios de germinação, com um tempo máximo de 240 horas de observação. Como controle, a suspensão-mãe utilizada nos experimentos foi semeada pelo mesmo método, mas sem exposição ao Rincoforol.

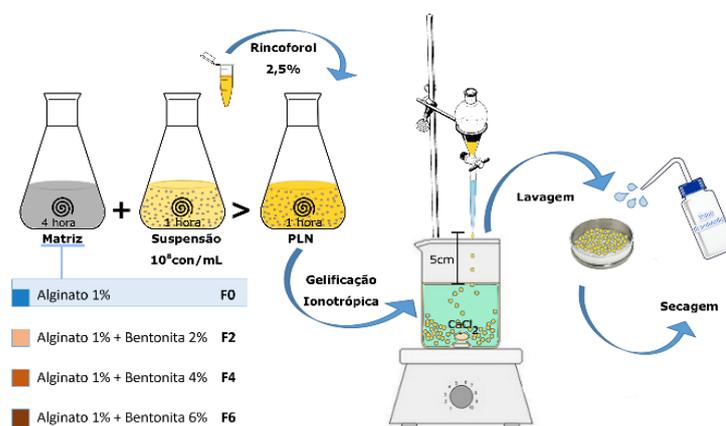
4.2.1.2 Preparo das formulações co-encapsuladas

Os nanocompósitos foram preparados segundo descrito por Batista et al. (2014), como demonstrado no esquema ilustrado na figura 14. Todas as matrizes utilizadas foram preparadas a partir de uma solução do agente reticulante, alginato de sódio, em concentração fixa de 1%. Uma formulação foi preparada apenas com o biopolímero, designada F0, as outras três foram combinadas a uma dispersão aquosa de bentonita sódica nas concentrações de 2; 4 e 6% (designadas F2, F4 e F6, respectivamente). Cada formulação ficou sob agitação por 4 horas em

agitador magnético até completa homogeneização do material. A estas matrizes foi incorporada uma suspensão fúngica contendo 10^8 con/mL como agente bioativo na proporção 1/1 (v/v), seguindo-se mais 1 hora de agitação. Em sequência, foi incorporado Rincoforol em concentração de 2,5% (v/v em relação a suspensão de conídios). Esta mistura foi mantida sob agitação magnética por mais 1 hora. As formulações produzidas foram então submetidas a gelificação ionotrópica, através de gotejamento em cloreto de cálcio 0,25 M e consequente reticulação do alginato e formação dos *beads* (WU et al., 2012). Estes permaneceram na solução de cloreto de cálcio por mais 30 minutos para incorporação de íons cálcio e enrijecimento de sua estrutura. Os *beads* foram submetidos a filtração simples, lavados com água deionizada para interromper o processo de incorporação de cálcio. Logo após, seguiu-se o congelamento em freezer a temperatura de -14°C ($\pm 3^{\circ}\text{C}$) por 48 horas e secagem através do processo de liofilização.

Formulações controle, contendo apenas conídios fúngicos como ativo (em ausência de Rincoforol), foram designadas como F0c, F2c, F4c e F6c, visto que tais produtos foram avaliadas em estudos anteriores e serviram como parâmetro de comparação para o atual estudo (BATISTA et al., 2014). Também foram preparados brancos, ou seja, formulações isentas de ativos, designadas como F0b, F2b, F4b e F6b. A composição de cada produto pode ser melhor visualizada tabela 5.

Figura 14 - Esquema de produção dos *beads* co-encapsulados demonstrando a metodologia e os materiais utilizados, o processo de gelificação ionotrópica e o processo de secagem dos *beads*.



Fonte: Autor, 2014.

4.2.1.3 Análise estrutural

A análise da interação entre os componentes da matriz utilizada na preparação dos *beads* foi realizada com o auxílio das técnicas de Difratometria de raios X (DRX) e Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). A primeira objetivou elucidar o tipo de interação entre o polímero e a argila através de possíveis alterações nos planos cristalinos da bentonita. A espectroscopia por FTIR foi utilizada para identificar os grupamentos químicos presentes nos materiais de partida e verificar a ocorrência de possíveis ligações químicas entre eles nos produtos formulados.

4.2.1.3.1 Difratometria de raios X (DRX)

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

4.2.1.3.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR (*Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*) foram registrados em um espectrômetro de infravermelho Thermoscientific Nicolet iS10[®], no modo operacional de Refletância Total Atenuada - ATR (*Attenuated Total Reflectance*), com resolução de 8 cm⁻¹ e varredura de 16 scans. Foram utilizados os *beads* íntegros para a análise. A utilização do FTIR para identificação das ligações químicas se deu a partir da medida de energia absorvida pela vibração específica de cada ligação química componente do material analisado (BOTTAN et al., 2011).

4.2.1.4 Rendimento das formulações

O peso seco dos *beads* obtidos foi utilizado para avaliar o rendimento dos produtos. Este foi calculado aplicando-se a equação 1 (ZHOU et al. 2017):

$$Y = \frac{W_e}{W_t} \times 100 \quad (1)$$

onde, W_e e W_t representam o peso seco experimental e peso seco teórico dos *beads*, respectivamente. Nesta, $W_t = W_{alginato} + W_{bentonita} + W_{rincoforol}$.

4.2.1.5 Índice de intumescimento (Ii%)

O aumento do peso médio de uma amostra do produto formulado pode ser associado ao índice de intumescimento (Ii%) da matriz após sua imersão em solução aquosa. Este índice pode ser avaliado por um determinado período de tempo para obtenção da cinética de intumescimento destes produtos. Para isso, amostras com 50 *beads* de cada formulação foram pesadas em balança analítica previamente à sua imersão em béquer contendo água destilada (M_D). A cada intervalo de 24 horas, os *beads* foram retirados, secos suavemente entre folhas de papel filtro para retirada da água superficial e em seguida repesados (M_S), até estabilização da captação de água ($Ii\%_{MÁX}$). O Ii% foi calculado de acordo com a equação 2 (SWAMY & YUN, 2015):

$$Ii\% = \frac{M_S - M_D}{M_D} \times 100 \quad (2)$$

onde: M_S é o peso dos *beads* intumescidos e M_D o peso dos *beads* secos.

4.2.1.6 Morfologia dos *beads* – Estereoscopia, tamanho de partículas, esfericidade e MEV

A morfologia dos *beads* foi realizada através de estereoscopia binocular e MEV. Um estereoscópio binocular foi utilizado para avaliar a morfologia dos *beads* secos e íntegros.

Adicionalmente, foi realizada a determinação do tamanho de partículas. Os diâmetros ortogonais de 15 *beads* de cada formulação foram aferidos com auxílio de um paquímetro digital (Zaas Precision 6") a partir da observação dos *beads* no estereoscópio (LUPO et al., 2015).

Os diâmetros obtidos também foram utilizados para avaliar o formato dos *beads*, aplicando-se o fator de esfericidade (*SF* - *Sphericity factor*), que é um indicador adimensional que representa a anisotropia dos produtos. O *SF* foi calculado de acordo com a equação 3:

$$SF = \frac{D_{max} - D_{min}}{D_{max} + D_{min}} \quad (3)$$

onde D_{max} e D_{min} representam, respectivamente, os maiores e os menores diâmetros ortogonais de cada *bead* (LUPO et al., 2015).

Como critério de referência, *beads* perfeitamente esféricos apresentam um *SF* de 0. *Beads* com formatos irregulares apresentam valores de *SF* acima deste valor, sendo que ainda são considerados esféricos até $SF < 0,05$ (YEH et al., 2011).

As análises de MEV foram realizadas 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, e observados em seu formato original.

4.2.1.7 Recuperação do Rincoforol em câmara de aeração e quantificação por CG/MS

As amostras foram injetadas no cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massa GC-MS modelo 2010 PLUS (Shimadzu, Japão), em coluna Nist-05 (5% Fenil, 95% Dimetilpolisiloxano) com (30 m, d. 0,25 mm). As condições do método usado foram as seguintes: injetor com a temperatura 250°C no modo *Splitless* (sem divisão de fluxo), a coluna iniciando com 50°C por 5 minutos, com uma velocidade de aquecimento de 12°C/min até atingir 280°C, que foi mantida por 5 minutos. A fonte de ionização utilizada foi impacto eletrônico (EI) com 70 eV, com a temperatura do detector *ion source* de 220°C. A temperatura da interface foi de 280°C, os valores de fragmentação registrados foram na faixa de massa de 35 m/z até 400 m/z e o tempo total da análise foi 29,17 minutos.

A quantificação do Rincoforol adsorvido na matriz foi realizada da extração total por solvente. 10 mg de *beads* de cada formulação foram triturados manualmente em 10 mL de hexano com o auxílio de grau e pistilo. Em seguida a solução obtida foi filtrada, amostras de 1 μ L foram injetadas e analisadas por GC-MS. O resultado foi expresso em eficiência de encapsulação (EE%), calculada com o auxílio da equação 4 (HOSSEINI et al., 2013).

$$EE\% = \frac{N_T}{N_0} \times 100 \quad (4)$$

onde: N_T é a quantidade total de Rincoforol carregada nos *beads* e N_0 a quantidade inicial de Rincoforol adicionada à formulação.

A recuperação do Rincoforol liberado pelo dispositivo foi realizada a partir da coleta de voláteis, seguindo metodologia descrita por Zarbin et al. (1999). Para tal, foi desenvolvido um sistema de aeração composto por uma câmara (Erlenmeyer adaptado), onde os *beads* foram alocados. Em uma das extremidades foi acoplada uma bomba para propulsão do ar para o interior da câmara. Antecedendo a entrada do fluxo foi acoplado um *trap* contendo carvão ativado, com o objetivo de reter quaisquer contaminantes existentes no ar, bem como um fluxometro para controle do fluxo. Na extremidade de saída foi acoplado um *trap* com polímero adsorvente, Porapak-Q (MESH 80/100), com o objetivo de adsorver os voláteis liberados pelos *beads* alocados no interior do sistema de aeração. O fluxo de ar mantido no interior da câmara foi de 400 mL/min. O *trap* contendo o adsorvente foi trocado a cada 24 horas durante 5 dias. A cada retirada, um fluxo de hexano de 0,5 mL foi passado através do adsorvente para extração dos compostos adsorvidos. O conteúdo da extração foi armazenado em vials para cromatografia e congelados a -20°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) até o momento das análises.

4.2.1.8 Distribuição dos conídios nos *beads* - Microscopia de fluorescência

Com o objetivo de visualizar a distribuição do bioativo no interior da matriz, foram preparados *beads* contendo conídios corados com Iodeto de propídio (IP). Este corante é amplamente utilizado para visualização da parede celular de microrganismos através de microscopia de fluorescência. Sua banda de emissão/excitação é em torno de 490/638nm. Alíquotas de 50 μ L da biomassa fermentada foram espalhadas na superfície de lâminas de microscopia, fixadas por evaporação e cobertas com solução corante durante 3 minutos.

Posteriormente as lâminas foram lavadas com água deionizada para remoção do excesso de corante. Após secagem, estes conídios foram ressuspensos na matriz de encapsulação e submetidos a gelificação ionotrópica como citado anteriormente. Foram visualizados tanto *beads* intumescidos (logo após a gelificação) quanto secos (após 12 horas em papel filtro e fluxo de ar). Estes foram fixados em lâminas de microscopia com o auxílio de fita dupla face. As lâminas foram observadas em microscópio invertido de fluorescência (ZEISS Observer Z.1 ApoTome) selecionando-se comprimento de onda de 543nm.

4.2.1.9 Liberação do microorganismo

5 *beads* de cada amostra foram semeados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA e incubados em câmara de germinação. Os *beads* foram observados em períodos de tempo pré-determinados para verificação de germinação miceliana resultante da liberação do bioativo da matriz (MOEBUS et al., 2009). As observações foram feitas com o auxílio de um estereoscópio binocular (Meije - Japão).

4.2.1.10 Revisão Patentária

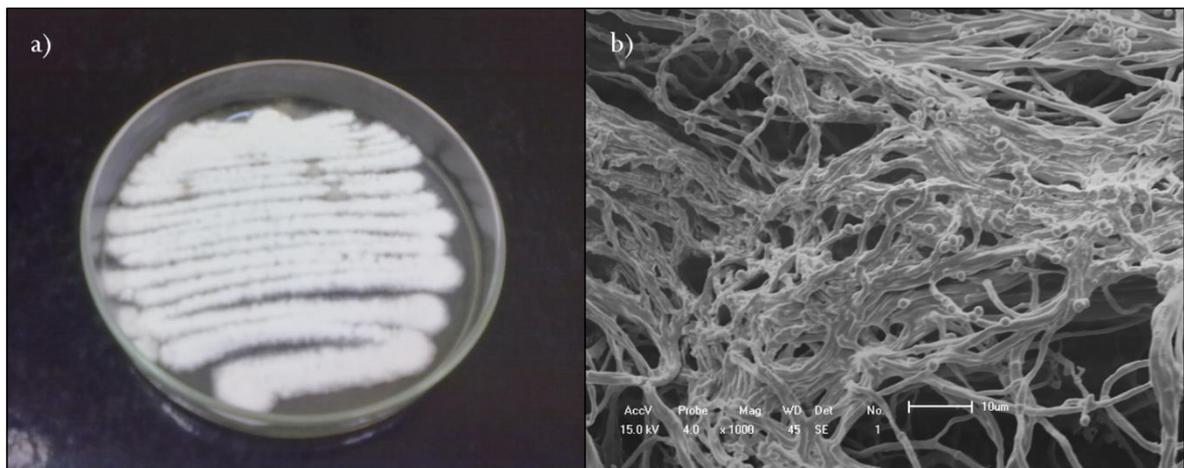
A Revisão Patentária foi realizada utilizando-se a base de dados PATENTSCOPE da Organização Mundial da Propriedade Intelectual (WIPO - *World Intellectual Property Organization*), que fornece acesso aos pedidos do Tratado de Cooperação Internacional de Patentes (PCT - *Patent Cooperation Treaty*) em formato de texto completo (WIPO, 2019).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Microrganismo e Meio de Cultura

A cepa CPATC032 de *B. bassiana* cultivada em BDA por 14 dias foi identificada morfológica e estruturalmente. As colônias de *B. bassiana* apresentaram aspecto macroscópico característico, com micélio de coloração branca, típico desta espécie (Figura 15a). A partir da análise microscópica (Figura 15b) foi evidenciada a presença de hifas septadas, hialinas e com a presença de conidióforos laterais simples em grupos irregulares ou verticilados contendo fiálides em sua extremidade. Destas fiálides brotam conídios hialinos e com formato ovóide ou globuloso. Estas características também foram observadas por Baptista et al. (2008).

Figura 15 - Aspecto macroscópico de *B. bassiana* com 14 dias em substrato BDA (a) e microscópico a partir de microcultivo em BDA (b).



Fonte: Autor, 2014.

5.1.1 Teste de Susceptibilidade Fúngica ao Rincoforol

Nos testes de suscetibilidade dos conídios ao Rincoforol, foi visto que houve uma grande queda na viabilidade para a maioria das suspensões. A primeira verificação foi realizada após 16 horas de semeio, tempo padrão para viabilidade de conídios de *B. bassiana*. Para os casos em que o crescimento do tubo germinativo não ocorreu neste período, seguiu-se a verificação diária até o período máximo de 240 horas pós-semeio. Na maior concentração do

feromônio, 10%, a suspensão se mostrou inviável mesmo após o período máximo do teste, indicando efeito deletério ao bioativo. Estes dados estão elencados na tabela 4. Para a mistura suspensão/Rincoforol contendo 5% do feromônio, a alíquota semeada imediatamente, bem como as semeadas 1 e 2 horas pós-contato demonstraram germinação dos conídios. Contudo, este fato se deu 196 horas pós-semeio, ou seja, 180 horas de retardo quando em comparação com a suspensão utilizada como controle. Já para a menor concentração de feromônio, 2,5%, apenas o tempo de contato de 3 horas não demonstrou viabilidade, para os tempos subsequentes houve atraso de 14 horas na germinação em comparação com o controle, já que os primeiros sinais de germinação se deram após 30 horas do início do experimento.

Apesar dos testes terem indicado inviabilidade ou retardo do crescimento dos conídios em suspensão, estes resultados podem ser considerados positivos, em virtude da alta proporção feromônio/suspensão avaliada. Levando-se em consideração o Rincoforol ser um álcool alifático (RAMOS et al., 2017), a possibilidade de efeito deletério ao bioativo já era prevista. A confirmação pelo teste de suscetibilidade se mostrou importante para decisão da concentração de quimioatrator a ser utilizada, visto que ainda houve resistência dos conídios e manutenção de viabilidade. Adicionalmente, a possibilidade de surgimento de efeito protetor proporcionado pelos componentes da formulação, inclusive com relatos na literatura para outros bioativos (WU et al., 2012; HE et al., 2015; SERRANO-CASAS et al., 2017) abre precedente para co-formulação Rincoforol /*B. bassiana* em um produto único. Desta forma, a concentração de 2,5% foi selecionada para a co-encapsulação e realização de testes subsequentes.

Tabela 4 - Suscetibilidade dos conídios de *B. bassiana* a exposição direta ao Rincoforol. As alíquotas da mistura Rincoforol/suspensão que não demonstraram germinação foram marcadas na tabela como “n” (não-viável).

Rincoforol Concentração (%)	Tempo de contato (horas)			
	0	1	2	3
	Beginning of Germination (hours)			
0 (controle)	16	16	16	16
2.5	30	30	30	n
5.0	194	194	n	n
10.0	n	n	n	n

Fonte: Autor, 2017.

5.1.2 Preparo das formulações co-encapsuladas

A reticulação da matriz polimérica no banho de cloreto de cálcio, ou seja, a formação dos *beads*, ocorreu em todas as concentrações de argila avaliadas. Apesar de nanocompósitos silicatados usualmente conterem um máximo de 5% de material inorgânico em sua mistura (RAY & BOUSMINA, 2005), os *beads* foram formados mesmo na concentração mais alta de bentonita, 6%. Um fator importante em produtos formulados é a manutenção do equilíbrio entre os constituintes. Exceder a capacidade de gelificação da matriz pode resultar em rompimento da rede polimérica e desestabilização do hidrogel (CABALLERO, et al., 2014).

Tabela 5 - Características gerais dos *beads* co-encapsulados preparados com concentrações variadas de bentonita.

Formulação	Alginato (% v/v)	Bentonita (% v/v)	Conídios (con/mL)	Rincoforol (% v/v)	Rendimento (%)	Tamanho (mm)	Eficiência de encapsulação (%)
F0	1,0	0,0	10 ⁻⁸	2,5	64,5	790	43,04
F2	1,0	2,0	10 ⁻⁸	2,5	75,0	810	73,40
F4	1,0	4,0	10 ⁻⁸	2,5	97,1	1131	92,26
F6	1,0	6,0	10 ⁻⁸	2,5	87,5	1193	71,56
F0b	1,0	0,0	-	2,5	66,9	851	40,42
F2b	1,0	2,0	-	2,5	75,3	792	73,25
F4b	1,0	4,0	-	2,5	96,5	1105	89,21
F6b	1,0	6,0	-	2,5	88,5	1040	72,05
F0c	1,0	0,0	10 ⁻⁸	-	56,4	943	-
F2c	1,0	2,0	10 ⁻⁸	-	67,4	1033	-
F4c	1,0	4,0	10 ⁻⁸	-	93,2	1273	-
F6c	1,0	6,0	10 ⁻⁸	-	87,4	1411	-

Fonte: Autor, 2017.

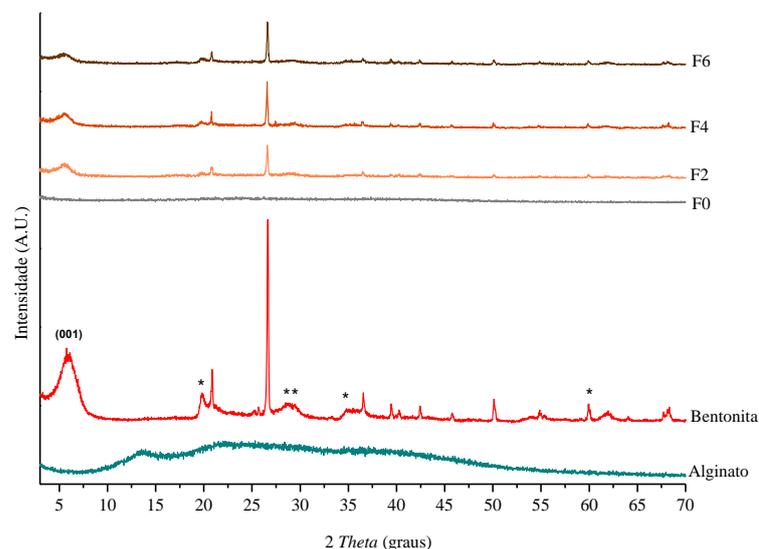
5.1.2.1 Análise estrutural

5.1.2.1.1 Difractometria de raios X (DRX)

A co-formulação de materiais de propriedades diversas pode acarretar em surgimento de potenciais incompatibilidades entre eles, resultando em características indesejáveis ao

produto final. Para tal, a interação entre os componentes da formulação foi verificada. A investigação da interação polímero/argila com possíveis alterações nos planos cristalinos da bentonita bem como a avaliação da presença do bioativo e do feromônio na formulação foi analisada por DRX. Os difratogramas dos materiais de partida e dos produtos co-encapsulados são mostrados na figura 16. Para interpretar os resultados encontrados foram utilizados os índices de Miller dos planos correspondentes a partir de cada valor obtido de distância basal (d), onde o ângulo de difração (2θ) foi determinado através do espaçamento existente entre um conjunto particular de planos. Aplicando-se a equação de Bragg ($n\lambda=2d\cdot\text{sen}\theta$) para calcular d , é utilizado o comprimento de onda já conhecido da fonte e o ângulo mensurado (HOLLER et al., 2009). Os resultados demonstraram que, para o material de partida (alginato de sódio) e os *beads* F0 os difratogramas não apresentaram picos de intensidade significativa. Este resultado é indicativo de ausência de cristalinidade, haja vista o alginato ser um polímero predominantemente amorfo (MLADENOVSKA et al., 2007). Para bentonita pura e para os produtos contendo esta argila em sua composição, F2; F4 e F6; o padrão de difração a reflexão principal d001 ($2\theta = 5,8^\circ$) com espaçamento basal de 15,26 Å. Os picos relacionados a presença de montmorilonita, componente majoritário, podem ser visualizados em $2\theta = 19,82^\circ$; $28,48^\circ$; $29,14^\circ$; $35,14^\circ$ e $61,96^\circ$. As demais reflexões estão ligadas a presença de quartzo e cristobalita e feldspato na amostra (MOORE & REYNOLDS, 1997; SALEM et al., 2015). Os difratogramas dos produtos controle e dos branco se mostraram semelhantes aos do co-encapsulados demonstrados na figura 16, por este motivo não foram mostrados.

Figura 16 - Difratogramas de raios X de pós dos materiais de partida, alginato e bentonita, e dos formulações co-encapsuladas, F0, F2, F4 e F6.



Fonte: Autor, 2018.

O difratograma da argila demonstrou a presença das fases cristalinas características deste silicato. Apesar dos produtos formulados contendo bentonita demonstraram reflexões semelhantes às vistas para a bentonita pura, independente da concentração do silicato presente na formulação, houve uma ligeira redução na intensidade dos picos relacionados. A difração de raios-X é uma ferramenta indispensável na caracterização da estrutura de nanocompósitos. Para argilas lamelares, o deslocamento do pico característico (d001) para ângulos menores indica a formação de uma estrutura intercalada, resultante da expansão do espaço interlamelar. Mesmo com esse aumento do espaço lamelar, as camadas de silicato se mantêm empilhadas e unidas por forças de atração que persistem, mantendo uma estrutura ordenada. Caso haja perda desta configuração, ou seja, as lamelas se separem e formem uma estrutura desordenada, os picos no padrão de DRX são perdidos, já que o material perde sua cristalinidade, caracterizando uma estrutura esfoliada (VAIA et al., 1997; RAY et al., 2006).

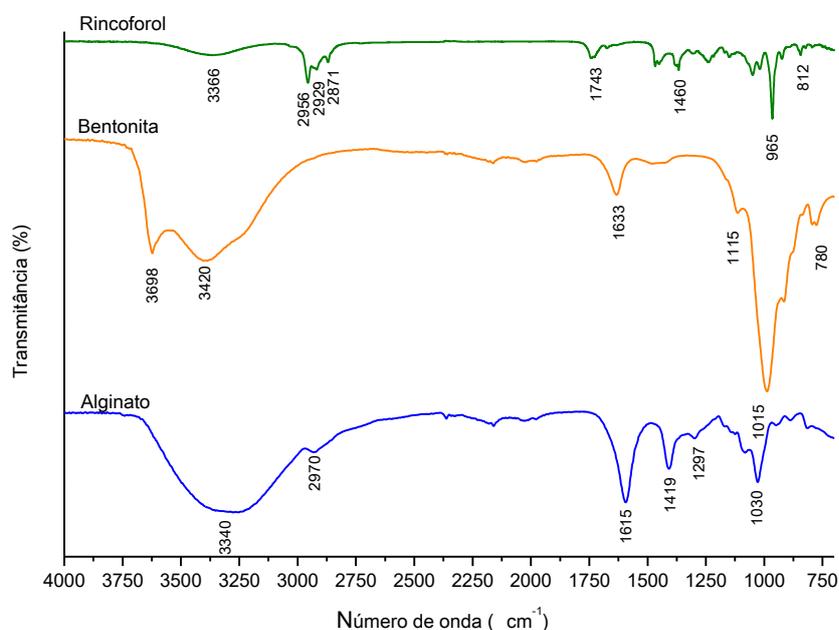
A ausência de deslocamento de d001 indica que o polímero não foi intercalado nas lamelas do silicato. Adicionalmente, não houve perda de cristalinidade, ou seja, as reflexões vistas no DRX da bentonita pura se mantiveram preservadas no produto, indicando a não ocorrência de esfoliação da estrutura lamelar (LONKAR et al., 2009). Quanto ao processo de secagem, a liofilização não causou nenhuma interferência na estrutura da matriz, visto que não houve diferença entre os difratogramas dos produtos submetidos a este método de secagem e os secos de forma convencional (dados não mostrados). A partir destes achados, sugere-se que a mistura polímero/silicato forma uma estrutura de fase separada, onde os compostos interagem de forma superficial através de ligações intermoleculares e eletrostáticas (KEVADIYA et al., 2010).

5.1.2.1.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A figura 17 reúne os espectros de FTIR obtidos a partir dos materiais de partida, alginato de sódio, bentonita sódica e Rincoforol. O espectro do alginato de sódio puro demonstrou uma banda de absorção entre 3400 e 3200 cm^{-1} , atribuídas a vibrações de estiramento dos grupos –OH provenientes da molécula da água e hidroxilas livres. A banda 2970 cm^{-1} é relativa ao estiramento simétrico dos grupos CH_2 . As bandas de absorção 1615 e 1419 cm^{-1} estão associadas a alongamentos assimétricos e simétricos do grupo COO^- . A banda localizada em 1297 cm^{-1} corresponde a vibração dos grupos C–O presentes nos anéis de piranose. Em 1030

cm^{-1} pode ser visto uma banda referente ao estiramento simétrico de $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$ (KEVADIYA et al., 2010; HOSSEINI et al., 2013). No espectro da bentonita as bandas vistas entre 3698 e 3420 cm^{-1} são devidas às hidroxilas ligados a sílica e ao alumínio ($\text{Si}-\text{OH}$ e $\text{Al}-\text{OH}$) presentes nos bordos das lamelas da argila. Estas hidroxilas geram bandas de grande amplitude de forma similar às vistas no alginato, sendo estas derivadas dos grupamentos alcoólicos da sua estrutura molecular. O sinal encontrado em 1633 cm^{-1} indica a presença de água adsorvida e está relacionado a presença de grupamentos $-\text{OH}$. As bandas relacionadas ao $\text{Si}-\text{O}$ da argila podem ser vistas em 1115 cm^{-1} . A banda em 1015 cm^{-1} está associada ao grupamento $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$ das folhas tetraédricas da bentonita (PATEL et al., 2007). O sinal em 780 cm^{-1} confirma a presença de quartzo na amostra, indicando o alongamento do grupo $\text{Si}-\text{O}$ dentro da estrutura cristalina (KEVADIYA et al., 2010; HOSSEINI et al., 2013). O espectro de FTIR do Rincoforol puro exibiu picos característicos em 3366 cm^{-1} do grupamento hidroxila $-\text{OH}$, 2956 cm^{-1} relacionado ao grupamento $-\text{CH}_3$, 2929 cm^{-1} de vibração de alongamento de $-\text{CH}_2$ e 2871 cm^{-1} do $-\text{CH}$. Em 1743 cm^{-1} foram vistas vibrações de estiramento de $\text{C}=\text{C}$ e deformação angular de CH_2 em 1460 cm^{-1} . Vibrações simétricas de estiramento também podem ser vista em 965 cm^{-1} e flexão de $\text{C}-\text{H}$ em 812 cm^{-1} (HOSSEINI et al., 2013).

Figura 17 - Espectros de FTIR dos materiais de partida utilizados no preparo dos produtos co-encapsulados: Alginato de sódio, bentonita e Rincoforol.

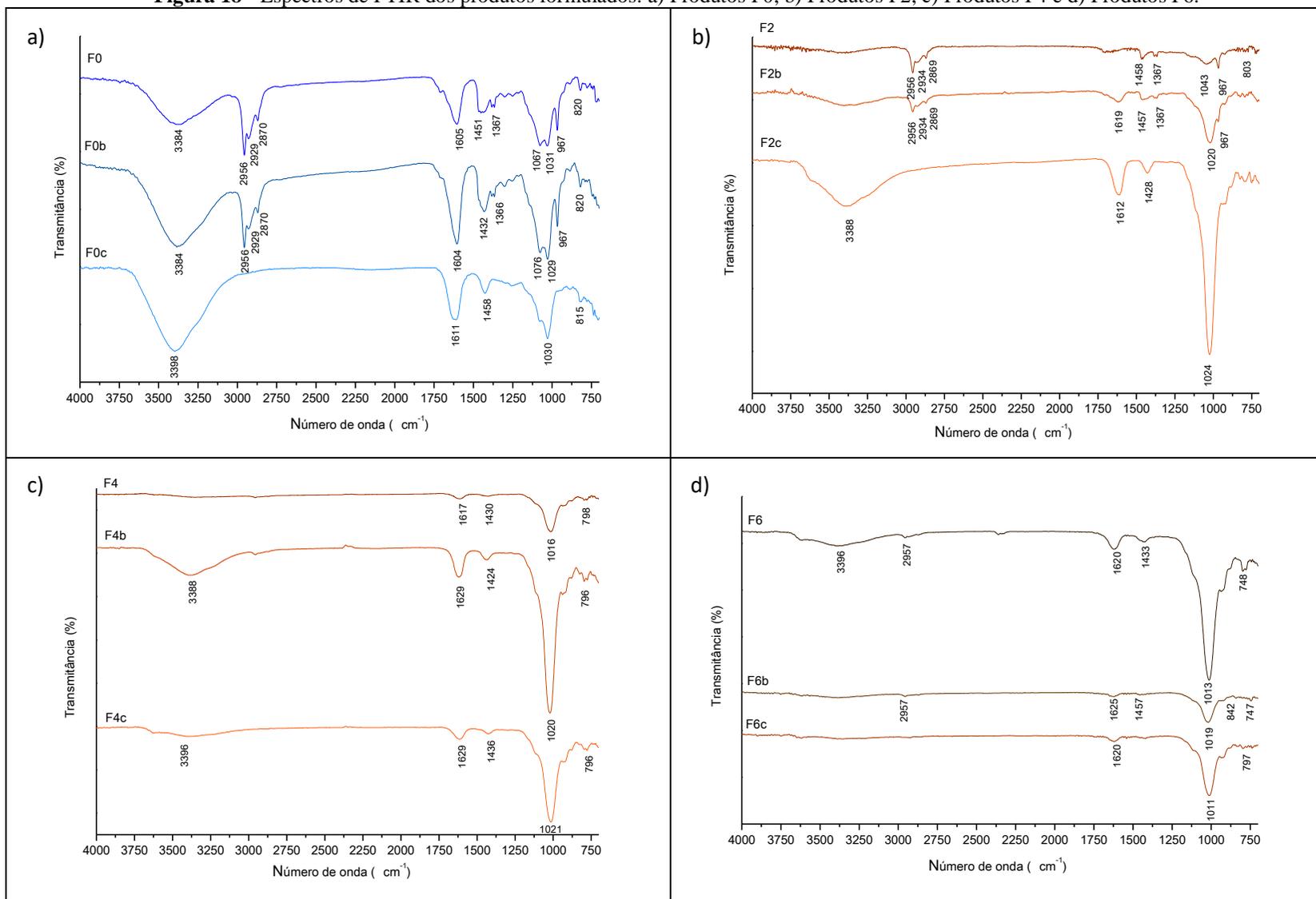


Fonte: Autor, 2017.

A figura 18 reúne todos os espectros de FTIR obtidos a partir dos produtos formulados. A incorporação de bentonita ao alginato resultou no deslocamento dos picos 1615 e 1419 cm^{-1} do COO- para valores acima de 1620 e 1425 cm^{-1} para todas as formulações, bem como diminuição da intensidade, indicando a interação eletrostática do grupo carboxila no alginato com a carga positiva da argila. Houve deslocamento na região dos grupamentos -C-O-O- de 1030 para 1024 cm^{-1} , indicando interação com o grupamento Si-O-Si da bentonita. Thaned et al. (2007) também relataram este fenômeno. Grupamentos carboxílicos do alginato com cargas negativas poderiam interagir com os locais de carga positiva nos bordos da Mt. A região dos grupamentos silanol da bentonita 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.

Observando-se os espectros das diferentes formulações contendo Rincoforol de F0, F2, F4 e F6, pode-se notar que uma parte dos sinais atribuídos ao Rincoforol se mantiveram apenas nos espectros de F0 e F2. Já para F4 e F6 estes sinais não permaneceram ou não foram de intensidade significativa. As bandas entre 2956 e 2871 cm^{-1} relativas ao feromônio foram preservadas, bem como a banda 965 cm^{-1} , que teve um pequeno deslocamento para 967 cm^{-1} no produto. Já para F4 e F6 estes sinais não foram vistos, sugerindo interação entre os grupamentos químicos do feromônio e os presentes nas lamelas da argila.

Figura 18 - Espectros de FTIR dos produtos formulados: a) Produtos F0; b) Produtos F2; c) Produtos F4 e d) Produtos F6.



Fonte: Autor, 2017.

5.1.2.2 Rendimento das formulações

Os resultados de rendimento das formulações estão elencados na tabela 5. De forma geral, as porcentagens de rendimento aumentaram proporcionalmente ao aumento do teor de silicato nas formulações até o máximo de 4% de bentonita, reduzindo levemente para os produtos F6. Estes resultados podem estar relacionados ao aumento da viscosidade das soluções de gotejamento, que resulta em menor lixiviação do material de matriz durante a gelificação ionotrópica da mistura no cloreto de cálcio (WU et al., 2012). A pequena redução do rendimento visto nos produtos F6 se deve à perda de material durante o processo, em grande parte devido a alta viscosidade, que dificultou o total aproveitamento da matriz, inclusive durante o gotejamento.

5.1.2.3 Índice de Intumescimento (Ii%)

O índice de intumescimento (Ii%) avalia a capacidade de captação de água de um produto. Desponta como uma propriedade importante de hidrogéis e também de compósitos poliméricos. Esta capacidade é verificada a partir de métodos gravimétricos, onde a variação de peso entre unidades com dimensões semelhantes, após a imersão em meio aquoso, são mensuradas e utilizadas como parâmetro para a obtenção do Ii% (GROVER, et al., 2012). Polímeros hidrofílicos, a exemplo do alginato, geralmente apresentam alta capacidade de captação de água. Nanocompósitos poliméricos que possuem polímeros com esta característica podem também apresenta-la. Este comportamento ocorre pela tendência de preenchimento dos espaços vazios presentes na rede polimérica, levando a sua hidratação e conseqüente relaxamento. Este fenômeno pode ser definido também como grau de inchamento (*swelling*) e é mantido principalmente por diferenças de pressão osmótica, que sustenta a captação de água e relaxamento estrutural até que haja equilíbrio dinâmico. A passagem da água através da matriz obedece princípios de difusão dos compostos e podem variar entre os nanocompósitos e o polímero de partida. Desta forma, o Ii% pode ser alterado a depender do material utilizado em associação com o polímero, seja por alterações na taxa de difusão, seja por modificações no arcabouço estrutural da rede polimérica (CAVALCANTI et al., 2002; GROVER et al., 2012).

Com relação ao índice de intumescimento dos produtos contendo conídios e Rincoforol associados, os *beads* F0 apresentaram alto valor (Ii%_{MAX} acima de 200%) (Figura 19a),

justificado por se tratar de um hidrogel, que possui grande capacidade de captação de água. Para os *beads* adicionados de bentonita o Ii% reduziu drasticamente, com exceção de F2. Este fenômeno pode ser explicado pelo reforço estrutural que a argila proporciona aos *beads*, reduzindo sua porosidade e diminuindo a penetração da água. Quanto aos *beads* F2, a baixa concentração de silicato mantém o produto com características predominantes do polímero, apresentando Ii% próximo aos vistos para F0. Como pode-se notar na figura 19a, os valores de Ii% de F0 e F2 no início e no final do experimento se mantêm bem próximos, 151,19 e 162,83 nas primeiras 24 horas e 210,70 e 223,00 no sétimo dia, respectivamente.

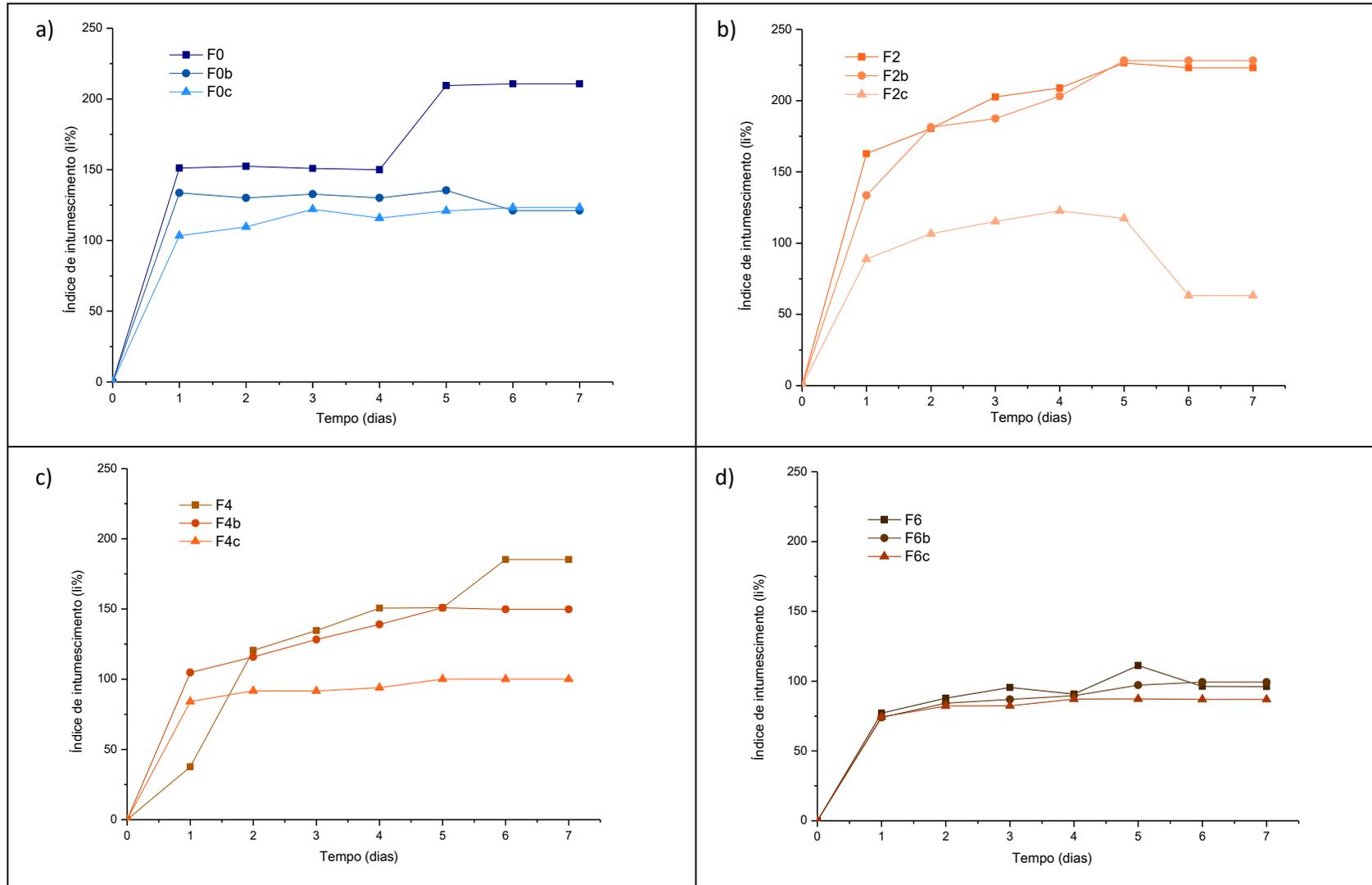
Para os *beads* contendo o feromônio mas com ausência de esporos de *B. bassiana* (Figura 19b), os perfis se mostraram semelhantes, com exceção de F0b, que estabilizou mais rapidamente e demonstrou uma pequena baixa do Ii% ao final do período de teste. Esta redução pode ser atribuída a degradação dos *beads* e perda do material matricial para a solução de imersão.

Para os *beads* contendo apenas conídios (Figura 19c), a captação de água se mostrou menor para todas as formulações, atingindo um máximo de 123,16 para F0c no sexto dia. Diferentemente do observado nos produtos citados anteriormente. F2c demonstrou Ii% ligeiramente menor que F0c, chegando a apresentar uma drástica redução nos dois últimos dias de avaliação, também devido a degradação de sua matriz.

O alto Ii% dos *beads* de F0c comprovam que a matriz unicamente polimérica possui capacidade de captação de água elevada. Esta característica ocorre por conta de sua estrutura, que apresenta inúmeros sítios de ligação para as moléculas de água, principalmente os grupamentos -C-O-O- (carboxilato) (WU et al., 2012).

A modulação da captação de água de formulações deste tipo é essencial na obtenção de sistemas de controle de liberação de ativos encapsulados. Da mesma forma, permite a permanência deste no local de ação, o que revela a importância do Ii% para produtos nanoestruturados pensados para tal finalidade (ALVES, 2002).

Figura 19 - Índice de intumescimento dos produtos formulados: a) Produtos F0; b) Produtos F2; c) Produtos F4 e d) Produtos F6.

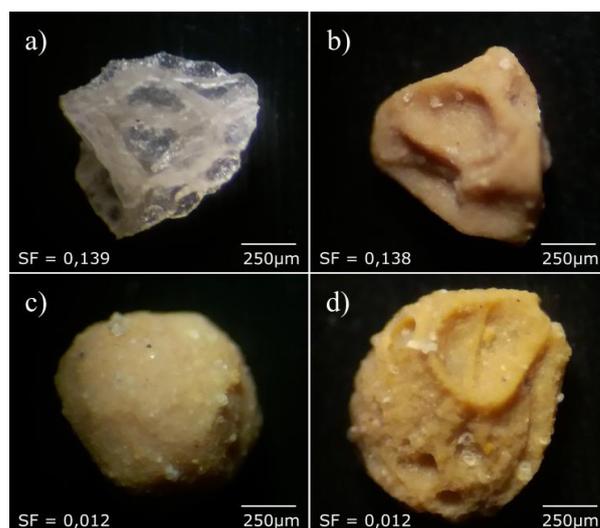


Fonte: Autor, 2017.

5.1.2.4 Morfologia dos *beads* – Estereoscopia, tamanho de partículas, Esfericidade e MEV

A figura 20 mostra as imagens de microscopia óptica dos *beads* Teste contendo diferentes concentrações de bentonita após o processo de secagem. Embora seja observada uma forma esférica inicial para todos os produtos imediatamente após a gelificação ionotrópica, existe uma tendência de retração estrutural após o processo de secagem. Para *beads* F0, essa retração se mostrou mais acentuada e estes exibiram forma mais irregular que as demais formulações, como mostrado na figura 20a. À medida que a concentração de bentonita é aumentada, pode-se notar maior característica de enchimento do *bead* e maior tendência à esferização, conforme exibido nas figuras 20b, 20c, e 20d. Isto sugere que o enchimento foi capaz de agir como um suporte estrutural, controlando o tamanho dos *beads*, diminuindo a retração e mantendo a forma do hidrogel durante a secagem.

Figura 20 - Morfologia e esfericidade dos *beads* co-encapsulados contendo diferentes concentrações de bentonita: a) F0; b) F2; c) F4 e d) F6. Note a tendência de esferização com o aumento de teor do silicato.



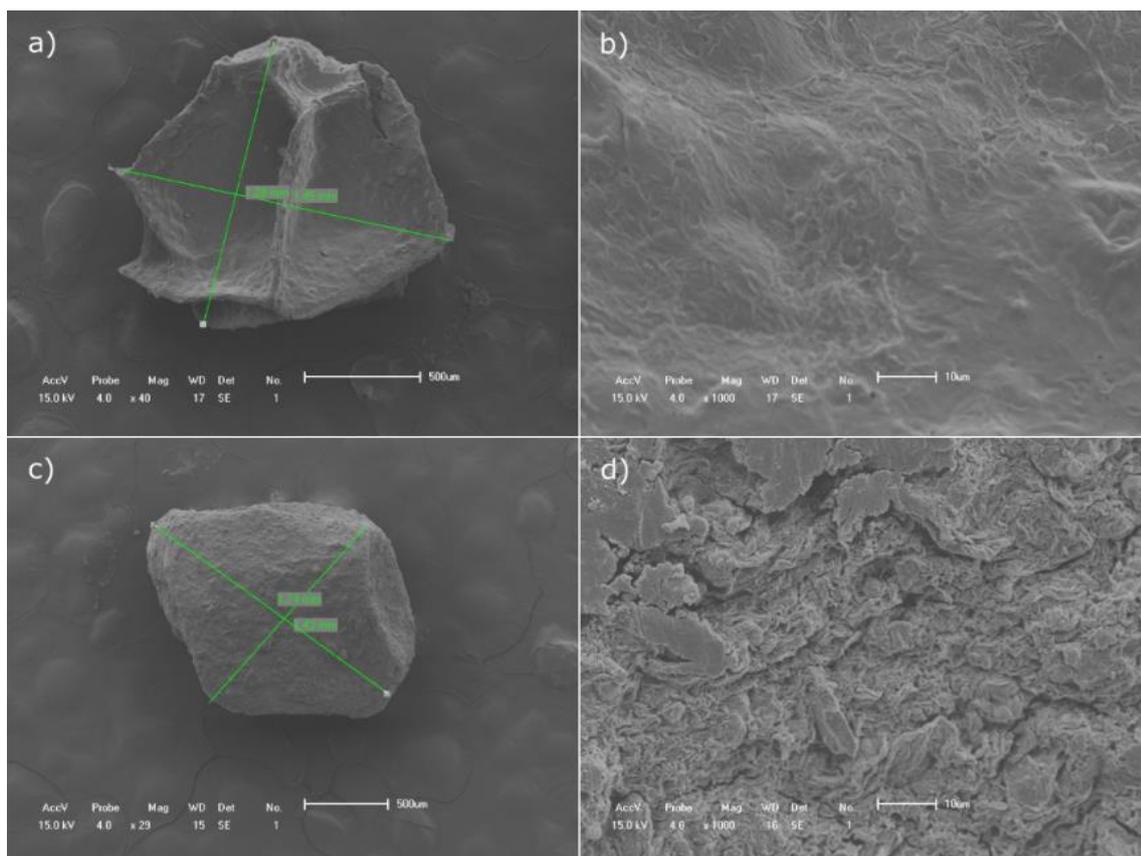
Fonte: Autor, 2017.

O fator de esfericidade pode variar de nulo (esfera perfeita), passando por valores próximos a zero, como visto em F4 e F6, até valores elevados, em produtos com formato bastante irregular, como observado em F0 e F2. Chan et al. (2011) apresentaram resultados semelhantes com produtos à base de alginato, onde o fator de esfericidade foi utilizado para caracterizar as principais diferenças entre *beads* de alginato puro e quando em associação ao

amido. Também foi verificada tendência de esferização a partir do aumento do material de enchimento, neste caso o amido (CHAN et al., 2011).

As imagens obtidas por MEV estão elencadas na figura 21, onde foi possível ver que os *beads* compostos apenas pelo polímero (F0 – Figura 21a-b) apresentam superfície com menor rugosidade quando em comparação com *beads* contendo argila em sua composição (neste caso, F4 – Figura 21c-d).

Figura 21 - MEV dos *beads* compostos por matrizes com diferentes concentrações de bentonita: a) *bead* F0 com aumento de 40x; b) F0 com aumento de 1000x demonstrando superfície com menor rugosidade; c) *bead* F4 com aumento de 40x; d) F4 com aumento de 1000x demonstrando maior rugosidade.



Fonte: Autor, 2017.

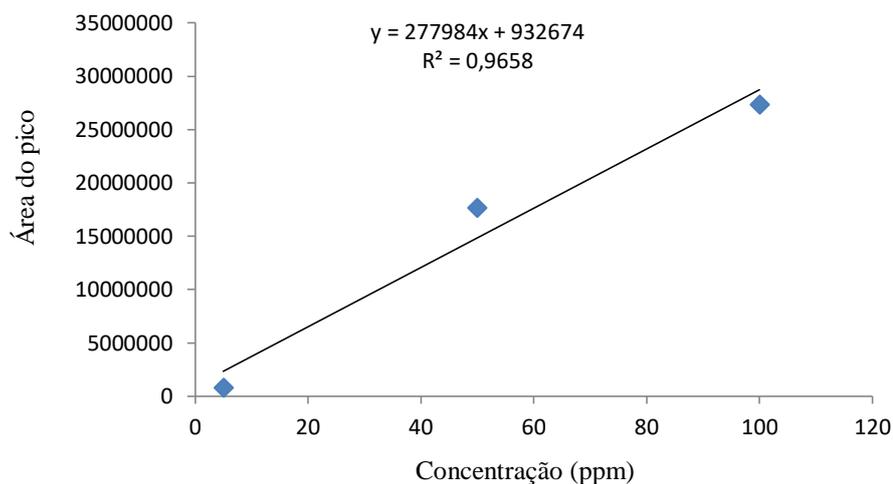
Os valores de tamanho médio de partículas de todas as formulações estão elencados na tabela 5, que reúne os dados gerais dos produtos formulados. Maiores diâmetros nos *beads* foram observados proporcionalmente ao aumento na concentração de bentonita. Este aumento do tamanho proporcional ao aumento do teor de silicato é devido a propriedade de enchimento deste material, que mantém parcialmente a estrutura inicial observada no momento da

gelificação. O reforço estrutural proporcionado pela argila inibe a retração estrutural com a perda de água no momento da secagem e mantém os *beads* com diâmetro médio maior.

5.1.2.5 Recuperação do Rincoforol em câmara de aeração e quantificação por CG/MS

A curva de calibração mostrou-se linear entre 5 e 100 ppm, conforme a equação da reta: $y = 277984x + 932674$ ($R = 0,9658$), como pode ser visto na figura 22. A partir destes dados, as EE% do feromônio pelos produtos co-encapsulados foram calculadas e estão elencadas na Tabela 5. O produto F0 demonstrou EE% de 43,4%. O aumento do teor de bentonita na formulação resultou em aumento da EE% em F2, 73,4%, em F4, 92,26% e em F6, 71,56%. Este resultado sugere que a encapsulação do princípio ativo com o polímero enriquecido com silicato parece reforçar a malha polimérica, retendo o feromônio na matriz de forma mais eficiente. A adição de silicato em menor proporção (F2) já foi capaz de aumentar significativamente a EE%, em comparação com o produto F0.

Figura 22 - Curva de calibração do Rincoforol.



Fonte: Autor, 2019.

Para confirmar a presença de Rincoforol no nanocompósito, o feromônio foi recuperado por extração com n-hexano dos voláteis retidos no adsorvente. O cromatograma da solução de

n-hexano/Rincoforol obtida a partir do processo de extração se mostrou similar ao padrão de Rincoforol puro (dados não mostrados). Também pôde ser evidenciado que não houve formação de novos picos, o que sugere que não houve formação de produtos de degradação do Rincoforol.

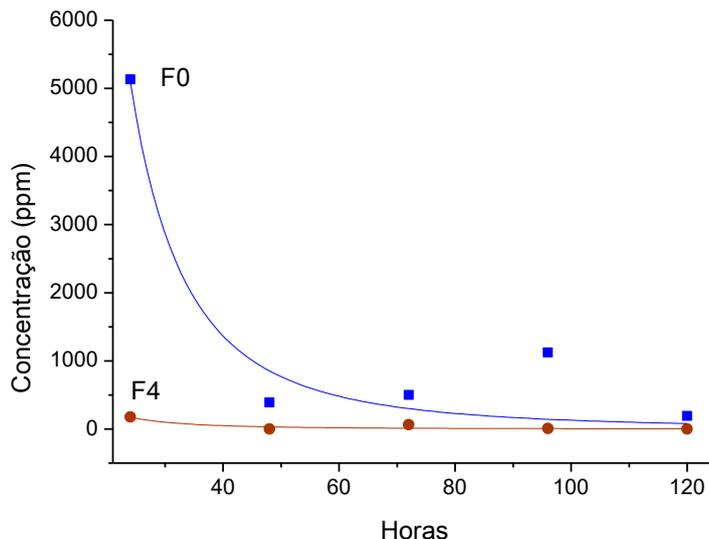
Observando-se a Figura 23, pode-se notar um *burst* de liberação de Rincoforol da matriz F0 nas primeiras 72 horas. A taxa de liberação inicial foi calculada como sendo 68,92% no primeiro dia, caindo para 5,25% no segundo e 6,70% no terceiro dia. Este resultado indica que a matriz não apresenta uma boa capacidade de retenção do feromônio, já que propicia uma liberação rápida mas não sustentada do Rincoforol.

Já para F4, nas primeiras 24 horas houve liberação de 2,36% do feromônio, havendo modulação da liberação de baixas concentrações nas horas subsequentes. Isto indica que a matriz pode funcionar como dispositivo de controle de liberação, evitando altas emissões de Rincoforol em curtos períodos de tempo.

Ao longo dos 5 dias de experimento a matriz F0 liberou 98,52% do conteúdo de Rincoforol encapsulado, enquanto F4 liberou apenas 3,34%. Fica evidente a necessidade de realização da coleta de voláteis por períodos de tempo maiores, com o objetivo de avaliar esta liberação até completa volatilização do feromônio encapsulado, contudo, limitações metodológicas impossibilitaram a concretização dos experimentos. O fato de F4 ter demonstrado alta EE% no experimento de quantificação e baixa volatilização na câmara de aeração sugere que as lamelas da bentonita podem estar agindo como barreira à liberação do Rincoforol, já que o *burst* visto em F0 não ocorreu. A possibilidade de liberação de menores quantidades, contudo, por longos períodos torna essa matriz promissora para a encapsulação de compostos voláteis.

Viana et al. (2017) produziram matrizes inorgânicas estáveis de magadííta de sódio e zeólita L contendo Rincoforol. A metodologia analítica apresentada por eles demonstrou valores satisfatórios de recuperação, linearidade, limite de detecção e de quantificação. Eles relataram estabilidade do feromônio na matriz por período de 180 dias. A taxa de liberação se mostrou mais lenta quando em comparação com o feromônio puro, ideal para contornar os problemas relacionados a altas emissões no meio ambiente. A cinética de liberação prolongada e em níveis adequados para atração dos insetos.

Figura 23 - Concentração de Rincoforol volatilizado e retido no adsorvente.



Fonte: Autor, 2019.

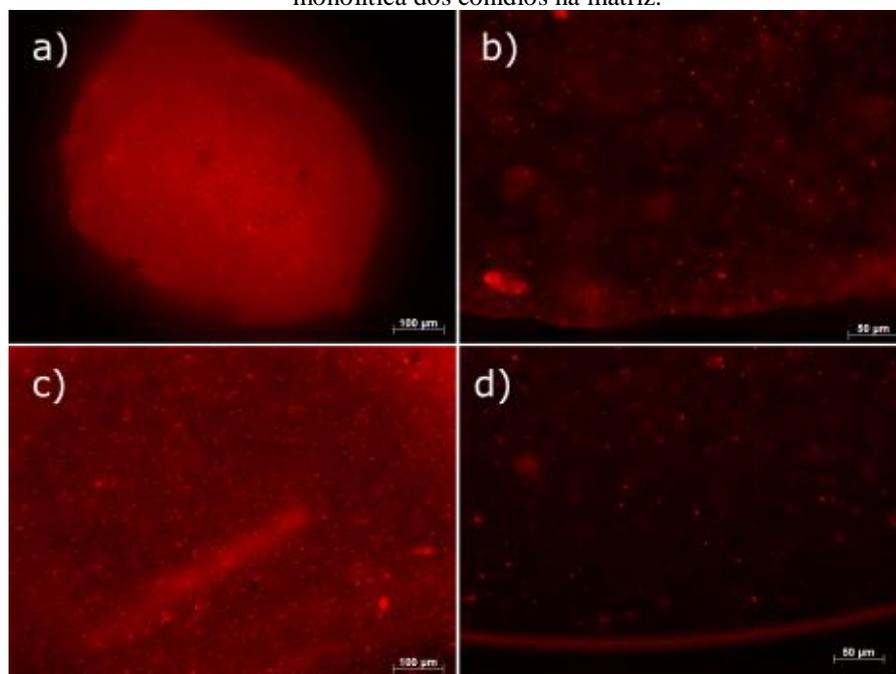
As características da matriz adsorvente são determinantes para a estabilidade dos feromônios, evitando a degradação durante o processo de adsorção. Desta forma, o nanocompósito avaliado surge como uma promissora matriz para liberação prolongada de Rincoforol, podendo ser utilizada em sistemas de captura sem a necessidade de utilização de dispositivos plásticos e ainda proporcionando proteção ao ativos encapsulados.

Apesar destes resultados indicarem boas propriedades da matriz na encapsulação do feromônio, estudos adicionais se fazem necessários. Para a análise de recuperação do Rincoforol encapsulado, o ideal é que a coleta dos voláteis seja realizada por períodos de tempo longos, contudo, limitações metodológicas dificultam a concretização desses objetivos. Tais limitações também foram determinantes na escolha dos produtos a serem analisados, já que os experimentos foram realizados apenas com duas formulações, F0 e F4, ao invés das quatro produzidas neste estudo. F4 foi selecionada por ter demonstrado resultados mais satisfatórios que as demais.

5.1.2.6 Distribuição dos Conídios nos *Beads* - microscopia de fluorescência

A microscopia de fluorescência possibilitou a visualização dos conídios encapsulados no interior dos *beads* (Figura 24). *Beads* intumescidos (Figura 24a-b) e *beads* secos (Figura 24c-d) foram utilizados nos experimentos. Como pode ser verificado, os conídios corados com IP apresentam-se distribuídos de forma homogênea em toda a extensão da matriz. *Beads* produzidos da mesma forma, contudo, com ausência de conídios, foram preparados e não demonstraram emissão de fluorescência. A matriz polimérica possibilitou a obtenção de um sistema monolítico de distribuição (PEZZINI et al. 2007), caracterizado pela localização aleatória e igualitária dos conídios por toda a massa interna dos *beads*.

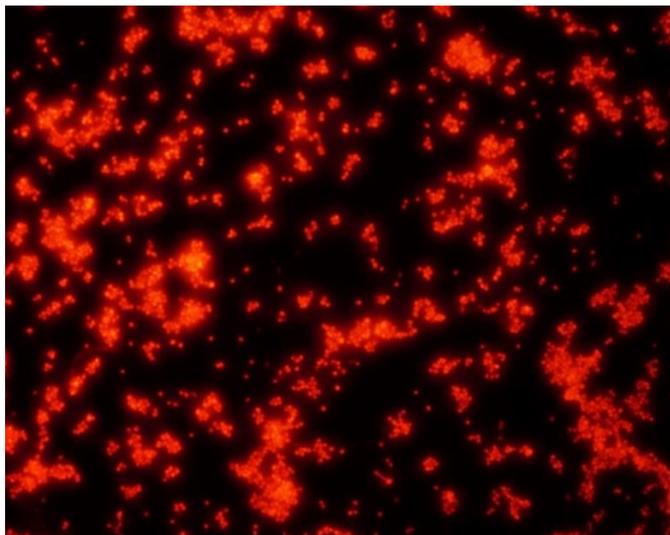
Figura 24 - Imagens de microscopia de fluorescência de conídios corados com IP encapsulados na matriz em diferentes aumentos. *Bead* F4 seco – a) e b); *bead* F4 intumescido – c) e d). Note o perfil de distribuição monolítica dos conídios na matriz.



Fonte: Autor, 2017.

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 (Figura 25).

Figura 25 - Imagens de microscopia de fluorescência de conídios fixados em lâmina e corados com IP.



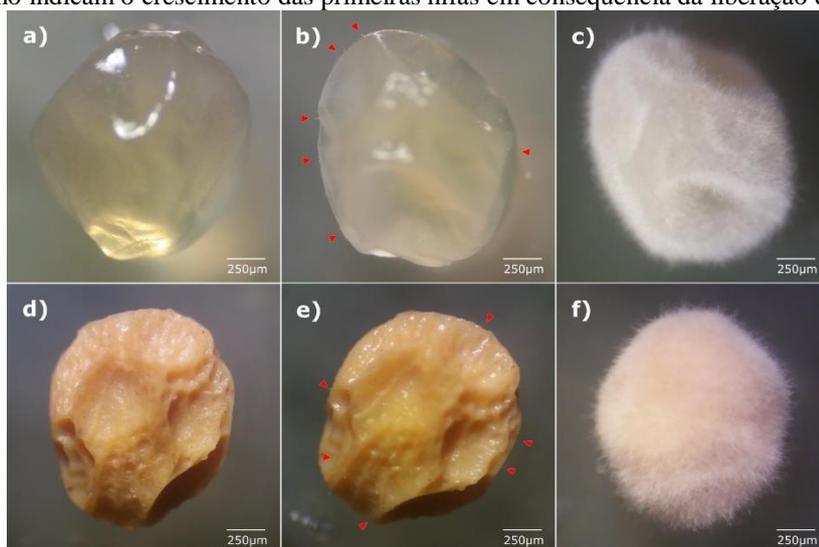
Fonte: Autor, 2017.

5.1.2.7 Liberação do microorganismo

Para os produtos formulados, a liberação do fungo das formulações contendo o bioativo mas sem a presença de Rincoforol, se iniciou 25 horas após o semeio. Como pode ser visto nas figuras 26a e 26d, após 17 horas do semeio em BDA os *beads* já se apresentam intumescidos por captarem água do meio. Após 25 horas foi possível visualizar na superfície os primeiros sinais de crescimento hifal como consequência da liberação dos conídios da matriz (Figuras 26b e 26e – as inserções em vermelho indicam alguns locais de crescimento). As figuras 26c e 26f mostram o crescimento hifal disseminado por todo o *bead*, recobrimo-o.

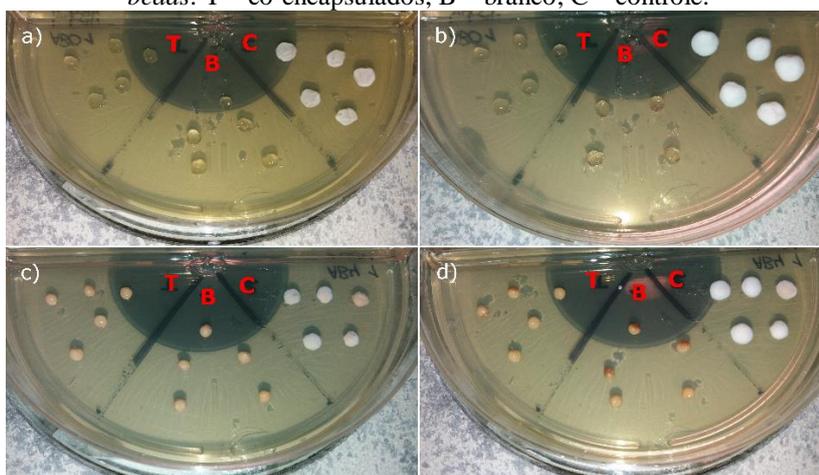
Contudo, para os produtos co-encapsulados, ou seja, que apresentam o feromônio em sua composição, não houve crescimento fúngico, exceto para o produto F6, onde foi vista germinação inicial após 66 horas. Estes dados indicam que a argila pode estar agindo como agente protetor do bioativo, visto que, embora a presença do semioquímico seja deletéria para o fungo mesmo nos produtos formulados, maiores concentrações do argilomineral podem manter a viabilidade dos conídios. Como forma de controle, formulações contendo o feromônio mas sem conídios também foram semeadas em BDA. Como previsto, estes *beads* não demonstraram crescimento fúngico, como mostrado na figura 27.

Figura 26 - Teste de liberação dos conídios encapsulados em matrizes com diferentes concentrações de bentonita. *Beads* contendo apenas conídios encapsulados semeados em BDA: a) F0c após 17 horas; b) F0c após 25 horas; c) F0c após 50 horas; d) F4c após 17 horas; e) F4c após 25 horas; f) F4c após 50 horas. As inserções em vermelho indicam o crescimento das primeiras hifas em consequência da liberação dos conídios.



Fonte: Autor, 2017.

Figura 27 - Placas de Petri contendo BDA utilizadas na liberação dos conídios de *B. bassiana* encapsulados em matrizes com diferentes concentrações de bentonita: a) produtos F0 após 50 horas; b) produtos F0 após 66 horas; c) produtos F4 após 50 horas; d) produtos F4 após 66 horas. As letras na parte superior de cada imagem indicam *beads*: T – co-encapsulados; B – branco; C – controle.



Fonte: Autor, 2017.

5.1.2.8 Revisão Patentária

As palavras-chave utilizadas na busca estão elencados na tabela 6, bem como o número de patentes resultantes da pesquisa. Nenhuma das patentes encontradas demonstraram concordância com os objetivos, tipos de produtos e técnicas utilizadas do presente trabalho.

Tabela 6 - Palavras-chave utilizadas na revisão patentária e números de patentes encontradas na base de dados da WIPO.

Palavras chaves	Patentes encontradas
Alginate; Bentonite; Rhynchophorol	0
Alginate; Bentonite; Rhynchophorus palmarum	3
<i>Beauveria bassiana</i> ; Rhynchophorus palmarum	94
<i>Beauveria bassiana</i> ; Rhynchophorol	0
Nanocomposite; <i>Beauveria bassiana</i>	2
Nanocomposite; Rhynchophorol	0

Fonte: Autor (2019).

A ausência de produtos com patente registrada ressalta a importância da pesquisa por matrizes que sirvam como dispositivo de liberação para o Rincoforol. A possibilidade da co-encapsulação com o bioativo com uso já consolidado no controle do *R. palmarum* corrobora com esta demanda.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstraram potencial aplicabilidade da matriz avaliada na co-encapsulação dos bioativos utilizados. A exposição do fungo livre ao Rincoforol demonstrou potencial efeito deletério ao bioativo. Contudo, a encapsulação no nanocompósito com maior teor de bentonita avaliada, 6%, foi capaz de proporcionar proteção aos conídios, mesmo após exposição do bioativo encapsulado ao feromônio e ao congelamento utilizado no método de secagem. Os difratogramas de raios X mostraram que não houve intercalação nem esfoliação das lamelas da bentonita, visto que não ocorreu diminuição ou deslocamento do seu plano cristalino principal. A elucidação das interações entre os componentes da matriz foi verificada com o auxílio de espectrometria de FTIR, onde foi possível evidenciar presença de ligações de hidrogênio intermoleculares e forças eletrostáticas que causam inúmeros pontos de contato para a criação da rede tridimensional. Matrizes com maior concentração de silicato demonstraram melhor rendimento, importante na redução de custos de formulação. Também houve reforço estrutural da rede polimérica, gerando *beads* com menor retração pós-secagem e com maior grau de esferização. O silicato proporcionou menor captação de água por retardar o relaxamento da rede polimérica, fenômeno essencial na obtenção de controle de liberação dos ativos. A eficiência de encapsulação do feromônio aumentou de forma proporcional ao maior teor de silicato incorporado, bem como houve modulação da volatilização do Rincoforol no produto F4, que liberou pequenas quantidades de feromônio sem que houvesse um *burst* de liberação, como visto em F0. A distribuição do bioativo na matriz, observada por microscopia de fluorescência, se deu de forma homogênea, caracterizando um perfil monolítico. Crioproteção frente aos efeitos deletérios do congelamento aplicado na liofilização foi alcançada no produto F6, corroborando com o efeito protetor visto na exposição ao feromônio. Desta forma, a matriz de encapsulação demonstra grande potencial para co-encapsulação de bioativos e produção de dispositivos eficazes de liberação feromônios. Há a necessidade de realização de estudos adicionais, sobretudo com relação a cinética de liberação do feromônio por longos períodos, a estabilidade dos ativos na matriz e os testes de atratividade em campo. Contudo, os resultados aqui expostos indicam que o nanocompósito avaliado desponta como um material promissor na obtenção de dispositivos de liberação que possam contribuir para a erradicação do uso de agrotóxicos em diversas culturas. A pesquisa e obtenção de bioinseticidas eficazes e acessíveis aos produtores pode gerar benefícios diretos ao meio ambiente, aos trabalhadores que se expõem constantemente à estes riscos, como também ao consumidor final dos produtos.

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: 08/09/2017.
- AGROLINK, 2014. Anel vermelho. Disponível em: <http://www.agrolink.com.br/agricultura/problemas/busca/anel-vermelho_2990.html>. Acesso em: 22/08/2017.
- ALBDIRY, M.T.; YOUSIF, B.F.; KU, H.; LAU, K.T. A critical review on the manufacturing processes in relation to the properties of nanoclay/polymer composites. **Journal of Composites Materials**, 47, 1093-1115, 2013.
- ALEXANDRE, M.; DUBOIS, P. Polymer-layered silicate nanocomposites: preparation, properties and uses of a new class of materials. **Materials Science and Engineering**, 28, 1-63, 2000.
- 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, 54, 2003.
- 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, 69-110, 2008.
- ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: _____. **Controle microbiano de insetos**. 1998. Piracicaba, SP, FEALQ, 11, 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**, 6, 575-581, 1996.
- ANADÃO, P. et al. Processo de obtenção de membranas nanocompósitas de polisulfona com argila bentonita sódica para microfiltração e membranas nanocompósitas resultantes”, BR Patent n. PI 0701474-0, 2007.
- ANADÃO, P.; WIEBECK, H.; VALENZUELA-DÍAZ, F. R. Panorama da Pesquisa Acadêmica Brasileira em Nanocompósitos Polímero/Argila e Tendências para o Futuro. **Polímeros**, 21 (5), 443-452, 2011.
- 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**, 80 (2), 121-129, 2001.
- ARLOV, Ø.; SKJÅK-BRÆK, G. Sulfated Alginates as Heparin Analogues: A Review of Chemical and Functional Properties. **Molecules**, 22, 778, 2017.

ATTERHOLT, C.A.; DELWICHE, M.J.; RICE, R.E.; KROCHTA, J.M. Controlled release of insect sex pheromones from paraffin wax and emulsions. **Journal of Controlled Release**, 57, 233-247, 1999.

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**, 418-424.

BARBARIN, A.M. et al. A preliminary evaluation of the potential of *Beauveria bassiana* for bed bug control. **Journal of Invertebrate Pathology**, 111, 82-85, 2012.

BARBOSA, P.; SCHULTZ, J. C. Insect outbreaks. **Academic Press**, New York, 578, 1987.

BATISTA FILHO, A. et al. Formulações de entomopatógenos. In: ALVES, S.B. (Ed.) **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba, SP, FEALQ, 11, 917-965, 1998.

BATISTA, D. P. C. et al. Encapsulation and release of *Beauveria bassiana* from alginate–bentonite nanocomposite. **RSC Advances**, 7, 26468-26477, 2017.

BATISTA, D. P. C. et al. Polymer/Layered Silicate Nanocomposite as Matrix for Bioinsecticide Formulation, **Macromolecular Symposia**, 344, 14-21, 2014.

BAVARESCO, V.P.; MACHADO, L.D.B.; ZAVAGLIA, C.A.C.; REIS, M.C. Caracterização Mecânica de Hidrogéis de PVAl para serem utilizados como cartilagem artificial reticulados por irradiação. **Revista Brasileira de Pesquisa e Desenvolvimento**. 4(3), 1679-1681, 2002.

BENETTI, F.; PAGOTTO, J.F. **O anel vermelho e os coqueiros**. **Revista Eletrônica de Ciências**. n.32. 2006. Disponível em:
<http://cdcc.sc.usp.br/ciencia/artigos/art_32/aprendendo1.html>. Acesso em: 22/07/2017.

BERGAYA, F.; THENG, B.K.G.; LAGALY, G., eds.; Handbook of Clay Science, **Elsevier: Amsterdam**, 1, 2006.

BLAIR, G.; DARLING, D. Red ring disease on the coconut palm, inoculation studies and histopathology. **Nematologica**, 14, (3), 395-403, 1968.

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. (Aquifoliaceae)**. 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**, 1, 1-10, 2011.

BOURBIGOT, S. et al. Solid state NMR characterization and flammability of styrene-acrylonitrile copolymer montmorillonite nanocomposite. **Polymer**, 45, 7627-7638, 2004.

BURI, P.; DOELKER, E. Formulation des comprimés à libération prolongée II. Matrices hydrophiles. **Pharmaceutica Acta Helveticae**. Amsterdam, 55 (7-8), 189-197, 1980.

BUTT, T.M.; COATS, C.J.; DUBOVSKIY, I.M.; RATCLIFFE, N.A. Entomopathogenic Fungi: New Insights into Host-Pathogen Interactions, **Advances in Genetics**, 94, 1-58, 2016.

- CABALLERO, F. et al. Characterization of alginate *beads* loaded with ibuprofen lysine salt and optimization of the preparation method. **International Journal Pharmaceutics**, 460, 181-188, 2014.
- CASTRO, J. M. C.; LIMA C. R. F.; SANTANA, M. L. M. P. Nematóides do Anel Vermelho do Coqueiro e Medidas de Manejo. **Instruções Técnicas da Embrapa Semiárido**. Petrolândia, Dezembro, 2009.
- CERIANI-NAKAMURAKARE, E.; SLODOWICZ, M.; CARMARAN, C.; GONZALEZ-AUDINO, P. Development of natural waxes dispensers for pheromones and use in mating disruption of the ambrosia beetle *Megaplatypus mutatus* in poplar (*Populus* spp) plantations. **Agroforest Systems**, 91, 415-421, 2017.
- CHAN, E.S. et al. Effects of starch filler on the physical properties of lyophilized calcium–alginate *beads* and the viability of encapsulated cells. **Carbohydrate Polymers**, 83, 225-232, 2011.
- CHEN, Y. et al. Preparation, characterisation, and controlled release of sex pheromone-loaded MPEG-PCL diblock copolymer micelles for *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **Plos One**, 13(9), 1-17, 2018.
- CORREIA, P.R.C. et al. Development of composite membrane PBAT: Zeolite Y for application as rhynchophorol release system. **Journal of Applied Polymer Science**, 135, 45757, 2017.
- COUTINHO, A. **Produção de Biopesticidas**: Projecto FEUP. Dissertação (Mestrado integrado em engenharia química) Universidade do Porto, Porto, 2010.
- CYSNE, A. Q. et al. Manejo de *Rhynchophorus palmarum* em campo de produção de sementes de palma de óleo. **Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental**, 28, 2013.
- 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**, 111, 125-135, 2011.
- DEMBILIO, Ó. et al. Potential of an indigenous strain of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* as a biological control agent against the Red Palm Weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, 104, 214-221, 2010.
- DING, W. K., SHAH, N. P. An improved method of microencapsulation of probiotic bacteria for their stability in acidic and bile conditions during storage. **Journal of Food Science**, 74 (2), 53-61, 2009.
- 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, 25 (1), 2003.
- EMBRAPA. Boas práticas agrícolas para produção de alimentos seguros no campo: controle de pragas. **Embrapa Transferência de Tecnologia**. 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.

EZHILARASI, P. N.; KARTHIK, P.; CHHANWAL, N.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: a review. **Food Bioprocess Technology**, 6, 628-647, 2013.

FAO 2014. World Production. Disponível em: <www.faostat.org.br>. Acesso em: 19/08/2017

FARIA, M. R.; MAGALHÃES, B. P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. 22, 2001.

FENG, M.G. et al. Production, Formulation and Application of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* for Insect Control: Current Status. **Biocontrol Science and Technology**, 4, 3-34, 1994.

FERREIRA, J. M. S. (Ed.) Coco: fitossanidade. **Embrapa Informação Tecnológica**. 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.

FISCHER, F.; DÖRFEL, H. Die Polyuronsäuren der Braunalgen (Kohlenhydrate der Algen I). **Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie**, 302, 186-203, 1955.

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.

FU, S.Y., et al. Some basic aspects of polymer nanocomposites: A critical review. **Nano Materials Science**, <https://doi.org/10.1016/j.nanoms.2019.02.006>.

FUNES, H.; ZERBA, E.; GONZALEZ-AUDINO, P. Monolithic dispensers for pheromones and their use in mating disruption of the ambrosia beetle *Megaplatypus mutatus* in poplar plantations. **Agricultural and Forest Entomology**, 18, 52-58, 2016.

GHADIRI, M.; CHRZANOWSKI, W.; ROHANIZADEH, R. Biomedical Applications of Cationic Clay Minerals. **RSC Advances**, 5, 29467-29481, 2015.

GRANT, G.T.; MORRIS, E.R.; REES D.A.; SMITH P.J.C.; THOM, D. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model, **FEBS Letters**, 32, 195-198, 1973.

GRIFFITH, R. Red ring disease of coconut palm. **Plant Disease**, 71, 193-196, 1987.

GRIFFITH, R. The relationship between the red ring nematode and the palm weevil. **Journal of the Agricultural Society of Trinidad and Tobago, Port-of-Spain**, 68, 342-356, 1968.

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**, 10, 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**, 73, 714-725, 2010.

HAGLEY, E.A.C. The Role of the Palm Weevil, *Rhynchophorus palmarum*, as a Vector of Red Ring Disease of Coconuts. I. Results of Preliminary Investigations. **Journal of Economic Entomology**, 56(3), 375-380, 1963.

HAUG, A.; LARSEN, B. Quantitative determination of the uranic acid composition of alginates. **Acta Chemica Scandinavica**, 16, 1908-1918, 1962.

HAUG, A.; LARSEN, B.; SMIDSRØD, O. A study of the constitution of alginic acid by partial acid hydrolysis. **Acta Chemica Scandinavica**, 20, 183-190, 1966.

HE, Y. et al. Encapsulation and characterization of slow-release microbial fertilizer from the composites of bentonite and alginate. **Applied Clay Science**, 109-110, 68-75, 2015.

HEUSKIN, S.; VERHEGGEN, F.J.; HAUBRUGE, E.; WATHELET, J.P.; LOGNAY, G. The use of semiochemical slow-release devices in integrated pest management strategies. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, 15(3), 2011, 459-470.

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.**

HOLSTEGE, C. P., BAER, A. B. Current Treatment Options in Neurology, **Insecticides**, 6, 17-23, 2004.

HOSSEINI, S. M. et al. Incorporation of essential oil in alginate microparticles by multiple emulsion/ionic gelation process. **International Journal of Biological Macromolecules**, 62, 582-588, 2013.

HUANG, P. et al. Greatly decreased redshift and largely enhanced refractive index of mono-dispersed ZnO-QD/silicone nanocomposites, **Journal of Material Chemistry**, 4, 8663–8669, 2016.

IBGE. Produção Agrícola Municipal. Disponível em:
<<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pesquisa>> 2015. Acesso em: 14/09/2017.

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

JIMÉNEZ-PRANTEDA, M. L. et al. Stability of *lactobacilli* encapsulated in various microbial polymers. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 113 (2), 179-184, 2012.

JOSEPH, T.; MORRISON, M.; (2006) Nanotechnology in agriculture and food. Institute of Nanotechnology, **European Nanotechnology Gateway**. Disponível em:
<http://www.nanoforum.org> (Acessado em 12 de março de 2017).

JOSH, G.V. et al. Montmorillonite as a drug delivery system: Intercalation and in vitro release of timolol maleate. **International Journal of Pharmaceutics**, 374, 53-57, 2009.

JUTSUM, A.R., GORDON, R.F.S. Insect Pheromones in Plant Protection. **Wiley and Sons**, 1, 368, 1989.

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

- 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**, 25, 2010.
- KIM, C.K.; LEE, E.J. The controlled release of blue dextran from alginate *beads*. **International Journal of Pharmaceutics**, 79, 11-19, 1992.
- KIM, I. Y. et al. Controlled release of *Pantoea agglomerans* E325 for biocontrol of fire blight disease of apple. **Journal of Controlled Release**, 161 (1), 109-115, 2012.
- KOGAN, M. Integrated pest management: Historical perspective and contemporary developments. **Annual Review of Entomology**, 43, 2043-70, 1998.
- KORNMAN X. Disponível em:
http://www.mb.luth.se/a_mpp_staff/Xavier.Kornmann/introduction.pdf. Acessado em 20/02/2019.
- KROSCHER, J.; ZEGARRA, O. Attract-and-kill as a new strategy for the management of the potato tuber moths *Phthorimaea operculella* (Zeller) and *Symmetrischema tangolias* (Gyen) in potato: evaluation of its efficacy under potato field and storage conditions. **Pest Management Science**, 69 (11), 1205-15. 2013.
- KYDONIUS, A.F.; BEROZA, M. Insect Suppression with Controlled Release Pheromone Systems. **CRC series in pesticide chemistry**, 1(2), 1982.
- LAGALY, G. Introduction: from clay mineral-polymer interactions to clay mineral-polymer nanocomposites. **Applied Clay Science**, 15, 1-9, 1999.
- LAW, J.H.; REGNIER F.E. Pheromones. **Annual review of biochemistry**, 40, 533-548, 1971.
- LEE, K.H. et al. Enhanced production of bioethanol and ultrastructural characteristics of reused *Saccharomyces cerevisiae* immobilized calcium alginate *beads*. **Bioresource Technology**, 102, 8191-8198, 2011.
- LEONHARDT, B.A.; BEROZA, M. Insect Pheromone Technology: Chemistry and Applications. **ACS Symposium Series**, 190, 1982.
- LI, H.; HUANG, D.; WANG, Z. Potential of *Beauveria bassiana* for control of *Apriona germari*. **Frontiers of Agriculture in China**. 5 (4), 666-670, 2011.
- LIM. F.; SUN, A.M. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. **Science**, 220, 908-910, 1980.
- LIU, M.X; JIA, Z.X.; JIA, D.M.; ZHOU, C.R. Recent advance in research on halloysite nanotubes-polymer nanocomposite. **Progress in Polymer Science**, 39, 1498-1525, 2014.
- 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**, 50, 1505-1515, 2009.

LUCCHI, A. et al. Eco-friendly pheromone dispensers - a green route to manage the European grapevine moth? **Environmental Science and Pollution Research**, 25, 9426-9442, 2018.

LUPO B. et al. Characterization of alginate *beads* with encapsulated cocoa extract to prepare functional food: Comparison of two gelation mechanisms, **Food Hydrocolloids**, 49, 25-34, 2015.

MARTINS, C. R.; JESUS JÚNIOR, L. A. Produção e Comercialização de Coco no Brasil Frente ao Comércio Internacional: Panorama 2014. **Documentos / Embrapa Tabuleiros Costeiros**, 51, 184, 2014.

MCHUGH, D.J. Production and utilization of products from seaweeds. **Food & Agriculture Organization of UN**, 58-115, 1987.

MENEZES R. R. et al. Argilas bentoníticas de Cubati, Paraíba, Brasil: Caracterização física-mineralógica. **Cerâmica**. 55, 163-169, 2009.

MEXZÓN, R.; CHINCHILA, C.; CASTRILLO, G.; SALAMANCA, D. Biología y hábitos de *Rhynchophorus palmarum* L. asociado a la palma aceitera em Costa Rica. **ASD Oil Palm Papers**, 8, 14-21, 1994.

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

MOEBUS, K.; SIEPMANN, J.; BODMEIER, R. Alginate-ploxamer microparticles for controlled drug delivery to mucosal tissue. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. 72, 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, 33 (1), 53-64, 2012.

MOLIN, 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**, 33(1), 53-64, 2012.

MOORE, D.M.; REYNOLDS, R.C. X-Ray Diffraction and The Identification and Analysis of Clay Minerals. 2nd Ed., **Oxford University Press**, New York. EUA, 1997.

MORRISON, W. R. Establishing the behavioral basis for an attract-and-kill strategy to manage the invasive *Halyomorpha halys* in apple orchards. **Journal of Pest Science**, 89, 81-96, 2016.

NATH, J.; DOLUI, S.K. Synthesis of carboxymethyl cellulose-g-poly(acrylic acid)/LDH hydrogel for in vitro controlled release of vitamin B12. **Applied Clay Science**, 155, 65-73, 2018.

NAVARRO, D. M. A. F. Aspectos práticos relacionados ao uso do Rincoforol, o feromônio de agregação da broca-do-olho-do-coqueiro *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) no controle de pragas do coqueiro. Análise de sua eficiência em campo. **Química Nova**, 25 (1), 32-36, 2002.

NAVARRO-LLOPIS, V.; PRIMO, J.; VACAS, S. Efficacy of attract-and-kill devices for the control of *Ceratitidis capitata*. **Pest Management Science**, 69, 478-482, 2013.

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. 233, 14-23, 2009.

NEUMANN, M. G. et al. Interações entre corantes e argilas em suspensão aquosa. **Química Nova**, 23 (6), 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.

NORDLUND, D. A.; LEWIS, W. J. Terminology of chemical Releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions, **Journal of Chemical Ecology**, 2(2), 211-220, 1976.

OEHLSCHLAGER, A. C. et al. Chirality and field activity of *Rhynchophorus*, the aggregation pheromone of the american palm Weevil. **Naturwissenschaften**, 79, 134-135, 1992.

OEPP, 2005. *Rhynchophorus palmarum*. **European and Mediterranean Plant Protection Organization**, Boletim 35, 468-471, 2005.

OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO **Bulletin**, 37, 571-579, 2007.

OH, ST.; KWON, OJ.; CHUN, BC.; CHO, J.W.; PARK, J.S. The Effect of Bentonite Concentration on the Drug Delivery Efficacy of a pH-sensitive Alginate/Bentonite Hydrogel. **Fibers and Polymers**, 10(1), 21-26, 2009.

OLIVEIRA, C. F. P. et al. Photooxidative Behavior of Polystyrene–Montmorillonite Nanocomposites. **Polymer Engineering and Science**, 48 (8), 1511-1517, 2008.

OLIVEIRA, M. M. et al. A simple two-phase route to silver nanoparticles/polyaniline structures. **The Journal of Physical Chemistry B**, 110, 17063- 17069, 2006.

OMAR, M.F.; AKIL, H.M.; RASYID, M.F.A.; SHARIF, J.M. Thermal properties of polypropylene/ muscovite layered silicate composites: effects of organic modifications and compatibilisers. **Journal of Composite Materials**, 49(10), 1195-1209, 2015.

PAIVA, L. B.; MORALES, A. R.; DÍAZ, F. R. V. Argilas organofílicas: Características, metodologias de preparação, compostos de intercalação e técnicas de caracterização. **Cerâmica**, 54, 213-226, 2008.

PALESCH, E.; KNOB, A.; PLICHTA, T.; CECH, V. Functional interlayers with controlled adhesion developed for polymer composites. **Thin Solid Films**, 656, 37-43, 2018.

PAQUES, J.P.; LINDEN, E.V.D.; VAN RIJN, C.J.M.; SAGIS, L.M.C. Preparation methods of alginate nanoparticles. **Advances in Colloid and Interface Science**, 209, 163-171, 2014.

- PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, S.; BENTO, J. M. S. **Controle Biológico: Terminologia**, 143-164. In: Parra, J. R.; Botelho, P. S. M.; Corrêa-Ferreira, S.; Bento, J. M. S. *Controle Biológico no Brasil, Parasitóides e Predadores*, São Paulo: Manole, 635, 2002.
- 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**, 35, 194-200, 2007.
- PATEL, J. S. The coconut, a monograph. **Madras, Government Press**, 315, 1938.
- PAVLIDOU, S.; PAPASPYRIDES, C. D. A review on polymer-layered silicate nanocomposites. **Progress in Polymer Science**, 33, 1119-1198, 2008.
- PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A. S.; FERRAZ, H. G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **RBCF**, 43 (4), 2007.
- PICANÇO, M. C. Manejo integrado de pragas. **Apostila do Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa**, 144, 2010.
- RANASINGH, N. Biopesticides : an Economic Approach for Pest Management. **Orissa Review**, 2007.
- RATHORE, S. et al. Microencapsulation of microbial cells. **Journal of Food Engineering**, 116, 369-381, 2013.
- RAY, S. S.; BOUSMINA, M. Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites: In greening the 21st century materials world. **Progress in Materials Science**, 50, 962-1079, 2005.
- RAY, S. S.; OKAMOTO, M.; Polymer/layered silicate nanocomposites: a review from preparation to processing. **Progress in Polymer Science**, 28, 1539, 2003.
- RAY, S.; QUEK, S. Y.; EASTEAL, A.; CHEN, X. D.; The potential use of polymer-clay nanocomposites in food packaging. **International Journal of Food Engineering**, 2(4), 5, 2006.
- ROCHAT, D. et al. Male-produced aggregation pheromone of the american palm weevil, *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera, Curculionidae): Collection, identification, electrophysiological activity, and laboratory bioassay. **Journal of Chemical Ecology**, 17, 2127, 1991.
- ROCHAT, D.; GONZALEZ, V. A.; MARIAU, D.; VILLANUEVA, G. A.; ZAGATTI, P.; Evidence for a male-produced aggregation pheromone in the American palm weevil, *Rhynchophorus palmarum*. **Journal of Chemical Ecology**, 17, 1221-1230, 1991.
- ROSETTO, E. et al. Caracterização de argilas bentonitas e diatomitas e sua aplicação como adsorventes. **Química nova**, 32 (8), 2009.
- SALEM, S., SALEM, A., BABAEI, A.A. Preparation and characterization of nano porous bentonite for regeneration of semi-treated waste engine oil: applied aspects for enhanced recovery. **Chemical Engineering Journal**, 260, 368-376, 2015.

SANTOS, L. P. S. Caracterização óptica e estrutural de PbTiO₃ nanoestruturado obtido por moagem mecânica de alta energia. Tese de Doutorado, São Carlos, SP, 2002.

SCHUMANN, M.; PATEL, A.; VITAL, S. Evaluation of an attract and kill strategy for western corn rootworm larvae. **Applied Soil Ecology**, 64, 178-189 2012.

SEO, S. M. et al. Synthesis of nanoporous materials to dispense pheromone for trapping agricultural pests. **Journal of Porous Materials**, 23(2), 557-562, 2016.

SEO, S. M.; LEE, J. M.; LEE, H. Y.; AN, J.; CHOI, S. J.; LIM, W. T. Synthesis of nanoporous materials to dispense pheromone for trapping agricultural pests. **Journal of Porous Materials**, 23(2), 557-562, 2016.

SEO, S.M.; LEE, J.M.; LEE, H.Y.; AN, J.; CHOI, S.J.; LIM, W.T. Synthesis of nanoporous materials to dispense pheromone for trapping agricultural pests. **Journal of Porous Materials**, 23(2), 557-562, 2016.

SERRANO-CASAS, V.; PÉREZ-CHABELA, M.L.; CORTÉS-BARBERENA, E.; TOTOSAUS, A. Improvement of lactic acid bacteria viability in acid conditions employing agroindustrial co-products as prebiotic on alginate ionotropic gel matrix co-encapsulation. **Journal of Functional Foods**, 38, 293-297, 2017.

SILVA, M. S. et al. Nanopartículas de alginato como sistema de liberação para o herbicida clomazone. **Química Nova**, 33 (9), 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**, 161, 208-216, 2009.

SLAUGHTER, B.; KHURSHID, S.; FISHER, O.; KHADEMHOSEINI, A.; PEPPAS, N. Hydrogels in Regenerative Medicine. **Advanced Materials**, 21, 32-33, 2009.

STELINSKI, L.L.; MILLER, J.R.; LEDEBUHR, R.; SIEGERT, P.; GUT, L.J. Season-long mating disruption of *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) by one machine application of pheromone in wax drops (SPLAT-OFM). **Journal of Pest Science**, 80, 109-117, 2007.

STIPANOVIC, A.J.; HENNESSY, P.J.; WEBSTER, F.X.; TAKAHASHI, Y. Microparticle Dispensers for the Controlled Release of Insect Pheromones. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 52, 8, 2004.

SUKOVATA, L. et al. An attempt to control *Cameraria ohridella* using an attract-and-kill technique. **Journal of Pest Science**, 84, 207-212, 2012.

SULTANA, K. et al. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **International Journal of Food Microbiology**, 62, 47-55, 2000.

SWAMY, B. Y.; YUN, Y, S. In vitro release of metformin from iron (III) cross-linked alginate-carboxymethyl cellulose hydrogel *beads*. **International Journal of Biological Macromolecules**, 77, 114-119, 2015.

VAIA R.A.; KLAUS D.; KRAMER E.J.; GIANNELIS E.P. Structure and dynamics of polymer-layered silicate nanocomposites. **Chemistry of Materials**, 8(8), 1728-1734, 1996.

- VALAPA, R.B. et al. An Overview of Polymer–Clay Nanocomposites. **Clay-Polymer Nanocomposites**, 2, 29-81, 2017.
- VEGA, F. E. et al. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. **Fungal Ecology** 2, 149-159, 2009.
- VEMMER, M.; PATEL, A. V. Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agentes. **Biological Control**, 67, 380-389, 2013.
- VIANA, A.C. et al. Validation of analytical method for Rhynchophorol quantification and stability in inorganic matrix for the controlled release of this pheromone. **Chemistry Central Journal**, 12, 54, 2018.
- VOO, W.P.; LEE, B.B.; IDRIS, A.; ISLAM, A.; TEYAF, B.T.; CHAN, E.S. Production of ultra-high concentration calcium alginate *beads* with prolonged dissolution profile. **RSC Advances**, 5, 36687-36695, 2015.
- WHITE, J.L., HEM, S.L. Pharmaceutical Aspects of Clay-Organic Interactions. **Industrial Engenering Chemistry Production Research and Development**, 22, 665-671, 1983.
- WILSON, E.O.; BOSSERT, W.H.. Chemical communication among animals. **Recent Progress in Hormone Research**, 19, 673-716, 1963.
- 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**, 39, 317-327, 2012.
- XIAO, G. et al. Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. **Scientific Reports**, 2, 483, 2012.
- YEH, K. W. et al. Release model of alginate microcapsules containing volatile tea-tree oil. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 380, 152-155, 2011.
- YOTSUYANAGI, T., YOSHIOKA, I., SEGI, N.; IKEDA, K. Acid-induced and calcium-induced gelation of alginic acid: *Bead* formation and pH-dependent swelling. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 39, 1072-1074, 1991.
- YUXIN, M. A. Preparation and characterization of PSf/clay nanocomposite membranes with PEG 400 as a pore forming additive. **Desalination**, 286, 131-137, 2012.
- ZARBIN, A. J. G. Química de (nano)materiais. **Química Nova**, 30, 1469-1479, 2007.
- ZHAI, P.; CHEN, X.B.; SCHREYER, D.J. PLGA/alginate composite microspheres for hydrophilic protein delivery. **Materials Science and Engineering C**, 56, 251-259, 2015.
- ZHOU, T. et al. Preparation of polyurea microcapsules containing phase change materials in a rotating packed bed. **RSC Advances**, 7, 21196-21204, 2017.