



LUCAS SILVEIRA TAVARES

**CULTIVO, ENCAPSULAÇÃO E ESTABILIDADE
DE UM AGENTE BIOPROTETOR DA
QUALIDADE DO CAFÉ**

**LAVRAS-MG
2011**

LUCAS SILVEIRA TAVARES

**CULTIVO, ENCAPSULAÇÃO E ESTABILIDADE DE UM AGENTE
BIOPROTETOR DA QUALIDADE DO CAFÉ**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Prof. Dr. Carlos José Pimenta

Coorientadores

Dra. Sára Maria Chalfoun de Souza

Dra. Deila Magna dos Santos Botelho

**LAVRAS-MG
2011**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Tavares, Lucas Silveira.

Cultivo, encapsulação e estabilidade de um agente bioprotetor da
qualidade do café / Lucas Silveira Tavares. – Lavras : UFLA, 2011.
76 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.
Orientador: Carlos José Pimenta.
Bibliografia.

1. Crioproteção. 2. Vida de prateleira. 3. Solubilidade. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 664

LUCAS SILVEIRA TAVARES

**CULTIVO, ENCAPSULAÇÃO E ESTABILIDADE DE UM AGENTE
BIOPROTETOR DA QUALIDADE DO CAFÉ**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 25 de Fevereiro de 2011.

Dra. Sára Maria Chalfoun de Souza UFLA/EPAMIG

Dra. Deila Magna dos Santos Botelho EPAMIG

Dr. Carlos José Pimenta

Orientador

LAVRAS-MG

2011

Dedico

*Primeiramente, aos meus pais por todo apoio,
A minha avó "Duta" e minha tia Tânia pelos
incentivos,
A minha namorada Ívina por todo amor e
carinho,
E a todos que de alguma forma contribuíram para
que esse trabalho fosse concluído.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Ciência dos Alimentos pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela bolsa de estudo.

A EPAMIG e TestScience onde foram realizados os testes.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura, onde foram tiradas as fotografias.

Ao professor Dr. Carlos José Pimenta pela orientação e confiança.

Aos Pesquisadores da EPAMIG, Sara Maria Chalfoun de Souza, Marcelo Claudio Pereira e Deila Magna dos Santos Botelho por toda amizade, colaboração e profissionalismo.

As estagiárias, Juliana, Vanessa e Tamires por todo apoio.

OBRIGADO!

RESUMO

O presente estudo visou o desenvolvimento de tecnologias para permitir a utilização prática de um agente bioprotetor da qualidade do café, o *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries. Para tanto, estudou-se novos métodos de cultivo, formulação e secagem buscando maior vida útil, praticidade, e proteção do agente bioprotetor durante sua estocagem, aplicação e desenvolvimento no campo. A pesquisa foi dividida em três ensaios: no ensaio 1, estudou-se o cultivo do microrganismo em meio semissólido; no ensaio 2, estudou-se a imobilização utilizando diferentes formulações em dois métodos de secagem (liofilização e estufa); e o ensaio 3, avaliou-se a vida de prateleira das formulações obtidas no ensaio 2 testada de duas formas distintas, com ou sem mistura de sais (adubo foliar). O método de cultivo empregado apresentou elevado rendimento de esporos por litro ($1,81 \times 10^{11}$ esporos/L), entretanto o tempo de cultivo foi relativamente alto. A extração de esporos do arroz em meio líquido mostrou-se uma técnica promissora para elaboração de formulações com concentrações específicas. As formulações obtidas apresentaram alta resistência ao processo de secagem por liofilização, com destaque para a formulação 4 a base de Vixil S, glicerol e leite em pó desnatado, que não apresentou perdas significativas. O processo de secagem em estufa a 35°C foi inadequado para a secagem das matrizes em forma de gel, causando 100% de inativação celular. Ao final dos períodos de armazenamento estudados todas as formulações não diferiram estatisticamente quanto à viabilidade, o que pode estar relacionado ao aumento expressivo do teor de umidade em todas as formulações ao longo do tempo. Os resultados obtidos nesta pesquisa confirmam que o método utilizado na secagem das matrizes de imobilização é tão importante quanto os materiais de imobilização para promover proteção ao agente bioprotetor da qualidade do café. Observou-se através da caracterização morfológica das matrizes por microscopia eletrônica de varredura que o encapsulamento produz uma matriz sólida com as hifas e esporos imobilizados no interior dos grânulos.

Palavras-chave: *Cladosporium cladosporioides*. Encapsulação. Liofilização.

ABSTRACT

This study aimed to develop technologies to allow the practical use of an agent bioprotector of quality coffee, *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries. To this end, It was studied new methods of cultivation, formulation and drying seeking greater shelf life, practicality, and protection of the agent bioprotector during storage, application and development in the field. The research was divided into three tests: test 1, was studied the cultivation of microorganisms in semi-solid, in experiment 2, was studied the immobilization using different formulations of two drying methods (freeze drying and kiln drying); and testing 3, was evaluated the shelf life of formulations obtained in experiment 2 tested of two different forms, with or without salts (foliar fertilizer). The cultivation method used showed a high yield of spores per liter (1.81×10^{11} esporos/L), but the time of planting was relatively high. The extraction of spores of rice in liquid proved a promising technique for preparation of formulations with specific concentrations. The formulations obtained showed high resistance to freeze-drying process with emphasis on the formulation of the base 4 Vixil S, glycerol and skimmed milk powder, which showed no significant losses. The process of kiln drying at 35 ° C was unsuitable for drying gel matrices, causing 100% cell inactivation. At the end of the storage periods studied all the formulations did not differ according to its viability, which may be related to the significant increase in moisture content in all formulations over time. The results of this study confirm that the method used for drying the immobilization of matrix is as important as the materials of immobilization to promote the protection of the agent bioprotector of quality coffee. It was observed by morphological characterization of the matrix by scanning electron microscopy that the encapsulation produces a solid matrix with hyphae and spores immobilized inside the granules.

Keywords: *Cladosporium cladosporioides*. Encapsulation. Lyophilization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Diferentes métodos de imobilização celular de microrganismos.....	27
Figura 2	<i>Cladosporium cladosporioides</i> a. Conidióforo (Cf) e célula conidiogênica (Cg); b. Ramoconídio (Rc) e conídio (C). Barra = 10 µm.....	34
Figura 3	Fluxograma simplificado da pesquisa.....	36
Figura 4	Placa contendo <i>Cladosporium Cladosporioides</i> (Fres.) de Vries.....	38
Figura 5	Preparo da solução de inoculo.....	38
Figura 6	Vedação térmica das embalagens de polipropileno de alta densidade contendo arroz.....	39
Figura 7	Preparo das Matrizes de Imobilização.....	43
Figura 8	Métodos e condições de secagem das matrizes de imobilização....	45
Figura 9	Avaliação da resistência aos processos de secagem.....	47
Figura 10	A) Pote plástico (Sem Sais) e B) Saco laminado (Com Sais) utilizados durante armazenamento.....	49
Figura 11	Agente bioprotetor em diferentes etapas do processo produtivo...	51
Figura 12	Aspecto das matrizes obtidas após liofilização (1, 2, 3, 4 e 5) e após secagem em estufa a 35°C (C).....	54
Figura 13	Equação de regressão da umidade (%) em função do tempo (horas).....	56
Figura 14	Fotomicrografias obtidas por MEV das matrizes de imobilização 1, 2, 3, 4 e 5 após secagem por liofilização, e em estufa a 35°C (C).....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Procedimentos para obtenção de microcápsulas.....	25
Tabela 2	Composição química das formulações.....	42
Tabela 3	Viabilidade do agente bioprotetor antes e após os processos de secagem por liofilização e secagem em estufa.....	53
Tabela 4	Solubilidade das formulações.....	59
Tabela 5	Viabilidade do agente bioprotetor (10^4 x UFC/mL) em função do tempo de estocagem.....	61
Tabela 6	Teor de umidade (%) ao longo do armazenamento.....	62
Tabela 7	pH em função do tempo de estocagem.....	63
Tabela 8	Viabilidade do agente bioprotetor (10^4 x UFC/mL) em função do tempo de estocagem na presença de sais.....	65
Tabela 9	Teor de umidade (%) durante período de estocagem na presença de sais.....	66
Tabela 10	Médias do pH nas diferentes matrizes de imobilização armazenados na presença de sais.....	67
Tabela 11	Médias do pH ao longo do tempo armazenados na presença de sais.....	67

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Produção de Microrganismos em Escala Comercial	16
2.2 Qualidade e Potencial Produtivo de Agentes Biológicos	18
2.3 Estabilidade de Microrganismos Durante a Estocagem (<i>Shelf Life</i>).....	19
2.5 Métodos Utilizados para Imobilização e Microencapsulação	25
2.6 Materiais Utilizados na Imobilização e Microencapsulação	28
2.6.1 Vixil [®] S	29
2.6.2 Glicerol.....	29
2.6.3 Capsul [®]	30
2.6.4 Amido Modificado	30
2.6.5 Quitosana.....	31
2.6.6 Celulose Microcristalina.....	31
2.6.7 Leite em Pó	32
2.7 Secagem de Microrganismos.....	32
2.8 <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fres.) de Vries e a Qualidade do Café...33	
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
Caracterização e Localização do Experimento	36
ENSAIO 1 VIABILIDADE E RENDIMENTO DE <i>Cladosporium</i> <i>Cladosporioides</i> (Fres.) de Vries CULTIVADO EM MEIO SEMISSÓLIDO.....	37
Preparo do Inóculo	37
Preparo do Arroz no Estado Semissólido	39
Inoculação e Incubação	40
Contagem de Esporos e Rendimento.....	40
ENSAIO 2 IMOBILIZAÇÃO E SECAGEM DE <i>Cladosporium</i> <i>Cladosporioides</i> (Fres.) de Vries.....	41
Preparo da Matriz de Imobilização	41
Secagem	44

Secagem da Matriz de Imobilização por Liofilização.....	45
Secagem da Matriz de Imobilização em Estufa a 35° C	46
Avaliação do Teor de Umidade.....	46
Avaliação do pH.....	47
Avaliação da Resistência de Diferentes Formulações com <i>Cladosporium cladosporioides</i> (fres.) de Vries aos Processos de Secagem	47
Caracterização Morfológica das Matrizes por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	48
Avaliação da Solubilidade	48
Análise Estatística	48
ENSAIO 3 ESTABILIDADE DURANTE A ESTOCAGEM (<i>SHELF LIFE</i>).....	49
Análise Estatística	50
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
ENSAIO 1 VIABILIDADE E RENDIMENTO DE <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fres.) de Vries CULTIVADO EM MEIO SEMISSÓLIDO.....	51
ENSAIO 2 IMOBILIZAÇÃO E SECAGEM DE <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fres.) de Vries.....	53
Caracterização Morfológica das Matrizes por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	57
Solubilidade	59
ENSAIO 3 ESTABILIDADE DURANTE A ESTOCAGEM (<i>SHELF LIFE</i>).....	60
Estabilidade Durante a Estocagem Sem a Presença de Sais	61
Viabilidade Durante a Estocagem Com Mistura de Sais	64
5 CONCLUSÕES.....	68
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	70
REFERÊNCIAS.....	71

1 INTRODUÇÃO

Os consumidores em diversos setores da economia estão cada vez mais exigentes, sendo assim, os produtos de qualidade superior são os mais procurados. Como o café vem acompanhando o novo cenário mundial cabe o desenvolvimento de novas tecnologias para produção dos cafés de melhor qualidade. Vindo de encontro a esta necessidade, o presente estudo trata do desenvolvimento de tecnologias que permitam a utilização prática de um agente bioprotetor da qualidade do café, o *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries.

O agente biológico evita a perda de qualidade e promove a segurança do café através da competição com outros microrganismos, além de acelerar a digestão da mucilagem através da produção de enzimas. Sua predominância em frutos que secam na planta evita a colonização por fungos prejudiciais à qualidade. Os biocontroladores (ou bioprotetores) tornam-se uma alternativa ao uso de agrotóxicos (fungicidas, inseticidas, acaricidas e fertilizantes) que acumulam resíduos tóxicos nos alimentos, causando sérias consequências à saúde humana.

Entretanto, a formulação atual do agente bioprotetor composta apenas de arroz e fungo apresenta uma série de limitações técnicas e econômicas como pequena solubilidade, baixa vida de prateleira, processo produtivo em escala laboratorial, baixa concentração do princípio ativo, elevado tempo de produção, baixa proteção ao fungo às condições de campo e elevado custo de produção. Nesse sentido esta pesquisa trata do desenvolvimento de novos métodos de cultivo, formulação e secagem para conferir maior vida útil, praticidade e proteção do agente bioprotetor antes e durante sua estocagem, aplicação, bem como em seu desenvolvimento no campo.

A pesquisa foi dividida em três ensaios: o ensaio 1, que trata do cultivo do microrganismo em meio semissólido; o ensaio 2, que trata da imobilização por 5 diferentes formulações em dois métodos de secagem (liofilização e estufa); e o ensaio 3, que estuda a vida de prateleira das formulações obtidas no ensaio 2 testadas de duas formas distintas, com ou sem mistura de sais (adubo foliar).

O estudo da vida de prateleira do agente bioprotetor na presença de sais (adubos foliares) justifica-se devido à necessidade técnico/econômica de se viabilizar a aplicação do agente bioprotetor no campo. Caso o fungo apresente boa estabilidade na presença de sais, o mesmo poderá ser pulverizado na lavoura associado aos adubos foliares, poupando custos desnecessários de sua aplicação isolada.

Cabe ressaltar que não existe produto no mercado com atuação similar ao agente biológico com possibilidade de proteger, continuamente, a qualidade do café de forma segura aos consumidores finais. Por ser um microrganismo GRAS (*Generally Recognized as Safe*¹), o produto respeita a qualidade de vida, conserva os recursos naturais, e visa em primeiro lugar à saúde da população envolvida direta ou indiretamente com a atividade cafeeira.

As soluções tecnológicas positivas obtidas para este agente bioprotetor específico (*Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries) terão grande alcance no setor de biotecnologia, uma vez que serão de grande contribuição para outros produtos biológicos que apresentam problemas tecnológicos semelhantes.

Os objetivos do presente trabalho foram os seguintes:

Ensaio 1:

- Avaliar o rendimento de cultivo de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries em meio semissólido;

¹ Em português: “amplamente reconhecido como seguro”.

Ensaio 2:

- Elaborar diferentes formulações contendo *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries;
- Avaliar a resistência de formulações contendo *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries frente aos processos de secagem por liofilização e em estufa a 35°C;
- Caracterizar morfológicamente as matrizes de imobilização obtidas após secagem por microscopia eletrônica de varredura (MEV);

Ensaio 3:

- Avaliar a estabilidade de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries durante a estocagem;
- Avaliar o efeito da presença de uma mistura de diferentes sais (adubo foliar) sobre a viabilidade de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries;

2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

Muitas pesquisas no campo de cultivo, desenvolvimento de formulações e estabilidade de microrganismos estão sendo conduzidas por cientistas em busca de proteção de patentes, sendo que os resultados experimentais não estão disponíveis. Entretanto, existem muitas informações de grande valor disponíveis para auxílio em pesquisas nesta área com diferentes fungos, conforme descrito a seguir.

2.1 Produção de Microrganismos em Escala Comercial

Os conídios de muitas espécies fúngicas apresentam fortes paredes hidrofóbicas que conferem estabilidade ambiental. Estas características contribuem significativamente para uma produção eficiente e estabilidade de armazenamento, tendo feito dos conídios os propágulos escolhidos para a maioria das formulações comerciais. No entanto, mesmo sob condições favoráveis, os conídios individuais de entomopatógenos hifomicetos comuns não são altamente infecciosos. Tal fato é responsável, em grande parte, pelas altas doses (10^{13} - 10^{14} esporos ha^{-1}) normalmente necessárias para controlar pragas no campo (Bartlett e Jaronski, 1988).

Historicamente, o método mais conhecido para produção em grande escala de conídios de *Metarhizium* tem sido a cultura em meio de cultura sólido, utilizando-se grãos de arroz como substrato (Alves e Pereira, 1989).

Mendonça (1992) relatou que este sistema de baixa tecnologia pode gerar rendimentos de 10^{13} conídios kg^{-1} de *Metarhizium anisopliae* em arroz. Apesar dos avanços observados para esta espécie na cultura em substrato sólido, dificuldades permanecem com muitas espécies. *Paecilomyces fumosoroseus*, por exemplo, requer luz para produção de conídios aéreos (Sakamoto et al, 1985), e

a eficiente produção de conídios desta forma requer cultura superficial ou agitação periódica das partículas de substrato para aumentar a exposição a luz.

No Brasil, a produção massal de fungos entomopatogênicos é tradicionalmente realizada com o emprego de arroz cozido como substrato. Após a colonização do arroz pelo microrganismo, a mistura “arroz + fungo” é triturada e comercializada na forma de pó-molhável (Faria e Magalhães, 2001), sendo esta mistura pouco solúvel.

Atualmente, em termos de número de propágulos que podem ser produzidos em um meio de cultura unitário, a produção de blastosporos e outros propágulos submersos são menos eficientes do que a produção de conídios aéreos (Butt et al, 2001).

Segundo Faria e Magalhães (2001), o fungo *Beauveria bassiana* é empregado em escala comercial em alguns países, entre eles os Estados Unidos e o México. Volumes consideráveis desse fungo foram comercializados no Brasil para o controle de ácaros do mamão e da broca-do-café, além de um volume menor ter sido destinado ao controle de cochonilhas.

O fungo *Cladosporium cladosporioides* tem sido produzido em pequena escala para o combate a pulgões, controle da mosca branca *Bemisia tabaci* (Faria e Magalhães, 2001), como bioprotetor da qualidade do café (Elizei, 2009), dentre outras finalidades.

Carvalho (2007) estudando o tempo de cultivo em arroz no estado semissólido do *Cladosporium cladosporioides*, verificou que até o 10º dia de incubação houve um aumento rápido no diâmetro da colônia, porém, após o 10º dia de cultivo, o crescimento do fungo sofreu um declínio. Segundo Elizei (2009), o fungo *Cladosporium cladosporioides* apresenta temperatura mínima de crescimento -4 °C e temperatura ótima 22 °C. Segundo Sautour et al. (2002), as faixas de temperatura até 22 °C são as ideais para o bom funcionamento metabólico de *Cladosporium cladosporioides* atingindo assim seus níveis

ótimos de desenvolvimento micelial, mantendo sua capacidade de propagarem descendentes.

As discussões baseadas apenas em rendimento de esporos por meio de litro fermentado devem ser vistas com cautela. Outros fatores devem ser considerados como a qualidade produtiva, conforme descrito a seguir.

2.2 Qualidade e Potencial Produtivo de Agentes Biológicos

A evolução lógica dos esforços para evitar a perda de virulência de patógenos tem envolvido tentativas de empregar manipulações fisiológicas não apenas para preservar, mas para melhorar a virulência. Lane et al (1991), por exemplo, reportaram que blastosporos produzidos por *Beauveria bassiana* cultivadas em meio de cultura com condições de nitrogênio limitado aderiram e germinaram melhor em cigarrinhas do que aquelas com limitação de carbono no meio de cultura. Estudos recentes tem também focado a manipulação das condições de cultura para produzir conídios com elevadas reservas de polihidroxi álcoois (polióis), material conhecido por acumular nas células fúngicas permitindo atividades metabólicas em baixa atividade de água (a_w) (Butt et al, 2001).

Hallsworth e Magan (1995) relataram que conídios de vários hifomicetos com elevados níveis de glicerol e eritrol foram capazes de germinar e crescer mais rapidamente em atividades de água reduzidas (menor que 0,887 no caso de *Metarhizium anisopliae*) e foram mais virulentos do que conídios não modificados de *Galleria larvae* incubadas a 86,5% de umidade relativa.

Os sustratos para cultivo de microrganismos podem ser de diferentes formas físicas como líquido, sólido e semissólido, cada qual apresentando vantagens e desvantagens conforme descrito a seguir.

Há um potencial considerável para aumentar a eficiência da produção em sistemas de substrato sólido. Bradley et al. (1992) relataram que sistemas pilotos têm produzido rendimentos de 3×10^{13} conídios kg^{-1} de substrato (1 litro de volume fermentado), um rendimento maior que o dobro sobre os sistemas operacionais atuais. Entretanto, a produção de propágulos fúngicos em meio de cultura líquido nos mesmos níveis de eficiência é um desafio mais difícil. Concentrações de 5×10^{12} blastosporos L^{-1} tem sido obtidas para linhagens de esporos pequenos de *Verticillium lecanii*, mas rendimentos de outros fungos são substancialmente menores.

Por outro lado, o rendimento por litro é apenas um fator na análise de custos. Comparado com substratos sólidos tal como grãos, meios líquidos apresentam muito menos nutrientes na base seca. Isto pode ser entendido como menor produção e custos com eliminação de resíduos do processo produtivo. Mas o rápido crescimento dos fungos em fermentação líquida é outra consideração importante (Butt et al, 2001). Fargues et al (1979) relataram o crescimento de *Beauveria bassiana* com concentrações de 2×10^{12} blastosporos L^{-1} com 45h de cultivo.

Por outro lado, a produção máxima de conídios aéreos em substratos sólidos requer, geralmente, muito mais tempo, por exemplo de 10 a 14 dias para a produção de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (formalmente identificado como *Metarhizium flavoviride*) e *Beauveria bassiana* (Jenkins et al, 1998).

A seguir são descritos aspectos gerais sob a estabilidade de diferentes microrganismos durante a estocagem.

2.3 Estabilidade de Microrganismos Durante a Estocagem (*Shelf Life*)

Outra restrição importante para o desenvolvimento de fungos como agentes biocontroladores tem sido a baixa estabilidade de armazenamento a

longo prazo (definidos como a manutenção da viabilidade dos propágulos). O alcance da estabilidade por 18-24 meses a temperatura ambiente (25°C), necessária para aumentar a competitividade no mercado, manteve-se uma meta distante, entretanto, consideráveis progressos têm sido alcançados. A estabilidade tem sido alcançada mais frequentemente pela mistura dos esporos com vários materiais (Butt et al, 2001).

Inicialmente, estudos da estabilidade de armazenamento de fungos entomopatogênicos foram conduzidos com pequenas amostras de conídios (sem formulações) expostos a um amplo intervalo de temperatura e condições de umidade. Estes estudos mostraram que a umidade relativa foi um fator importante em temperaturas de armazenamento moderadas de vários fungos, incluindo *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Paecilomyces* ssp (Clerk e Mandelin, 1965; Kawakami e Mikuni, 1965; Daoust e Roberts, 1983). Conídios de *Metarhizium anisopliae* mantêm altos níveis de viabilidade por pelo menos 18 meses sob condições controladas de umidade (97% de umidade relativa) a 26°C; contudo, nenhum conídio seco de nenhum outro fungo mantém-se estável por mais que alguns meses a esta temperatura (incluindo àqueles mantidos a 0% de umidade relativa sob cloreto de cálcio anidro) (Butt et al, 2001).

A primeira formulação seca de conídios de fungos entomopatogênicos com alta viabilidade por 1 ano sem refrigeração foi descrita em uma nota por Ward e Roberts (1981); 78% de conídios de *Beauveria bassiana* formulados com argila atapulgita mantiveram-se viáveis por 12 meses em temperatura de armazenamento de 26°C, comparado com apenas 6% de conídios não formulados. As condições de umidade não foram reportadas neste estudo e, embora a argila tenha prolongado a sobrevivência dos esporos, seu modo de ação não é conhecido (Butt et al, 2001).

Shi (1998) relatou que conídios em formulações com argila permaneceram armazenados com umidade < 10% a temperatura ambiente com viabilidade de 91% por 480 dias e 70% viáveis por 780 dias. Chen et al (1990) também encontraram estabilidade similar em argila atapulgita armazenada por 12 meses a 26°C.

Segundo Feng et al (1994) estes e outros estudos levaram a estabelecer uma secagem com teor de umidade menor que 5% como um protocolo padrão para produção de *Beauveria bassiana* na China.

A composição da atmosfera é outro importante fator na estabilidade fúngica durante o armazenamento. O armazenamento sob a atmosfera modificada com nitrogênio ou CO₂ e também sob vácuo tem sido relatadas desde 1960 como promotora do aumento da estabilidade a curto prazo de conídios aéreos (Miller, 1995). Segundo o mesmo autor, a remoção de oxigênio da atmosfera de armazenamento preservou a viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae* por 12 meses a 37°C.

Formulações estabilizadas pela secagem e armazenadas sob vácuo requerem embalagens a prova de água e que também sejam impermeáveis a gases atmosféricos, incluindo vapor de água. As embalagens mais comumente utilizadas com esta propriedade são os laminados de polietileno com alumínio (Jenkins et al, 1998). Por outro lado, formulações contendo fungos que necessitam de oxigênio para sobreviver requerem embalagens diferentes. Neste caso, o polietileno pode formar uma barreira efetiva contra a umidade (ganho ou perda), enquanto permite a troca de oxigênio e CO₂ (Miller, 1995).

Estudos recentes sobre a estabilidade do produto são relevantes e representam importantes avanços em técnicas de formulação e embalagem. Segundo a empresa Mycotehc Corp., sua segunda geração de pós-molháveis de conídios de *Beauveria bassiana* (Mycotrol® 22WP) tem vida de prateleira superior a 12 meses a 25°C (S. Jaronski, citado por Butt et al, 2001).

Jenkins et al (1998) avaliando a viabilidade de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* armazenado em embalagens plásticas com pequenos pacotes de sílica gel foram estáveis por mais de 12 meses a 30°C. A descoberta de que a rápida reidratação seguida de estocagem a seco poderia matar conídios de *Metarhizium* e resultar em erros de medida de viabilidade mostrou avanços nesta área (Moore et al, 1997).

Um importante problema associado com a aplicação de biocontroladores hifomicetos está relacionado com a hidrofobicidade dos conídios aéreos. Esta característica torna o pó difícil de suspender em água. Estudando *Beauveria bassiana* e *Paecilomyces fumosoroseus*, Wraight e Carruthers (1999) observaram que o uso de agentes organolisiliconados facilitou muito a preparação de soluções aquosas dos fungos.

Esporos fúngicos são extremamente susceptíveis a radiação solar. Segundo Butt et al (2001) esforços têm sido realizados com o objetivo de desenvolver um protetor ultravioleta econômico que não interfira no processo de biocontrole, não afetando, por exemplo, a infecção ao hospedeiro.

Muitos materiais que aumentam o tempo de sobrevivência dos esporos à radiação solar têm sido identificados em laboratório, entretanto, os propágulos fúngicos exibem extrema sensibilidade à radiação solar (a maioria é morta com 2 horas de exposição direta). Entre os mais promissores protetores UV identificados até agora estão o Tinopal LPW (Calcofluor branco) (Shapiro, 1992).

Elizei (2009), estudando a viabilidade de *Cladosporium cladosporioides* imobilizados em grânulos de alginato de sódio em diferentes temperaturas observou boa viabilidade de desenvolvimento micelial em todas as temperaturas até 180 dias após o processo de imobilização. Neste estudo o ponto máximo de crescimento micelial para os grânulos armazenados na temperatura ambiente foi aos 103 dias, após esse período ocorre o declínio do desenvolvimento.

2.4 Imobilização e Microencapsulação de Microrganismos

Os termos imobilização e microencapsulação têm sido citados alternadamente na maioria das referências consultadas. Enquanto o encapsulamento é o processo de formação contínua de um revestimento em torno de uma matriz interna, sendo esta totalmente contida dentro da parede da cápsula na forma de um núcleo de material encapsulado, a imobilização refere-se ao aprisionamento de material com ou sem a presença de uma matriz. Em se tratando de imobilização, uma pequena quantidade de material pode estar exposta a superfície, o que não é o caso do encapsulamento (King, 1995).

A imobilização pode ser definida como um processo no qual um material de parede envolve um recheio, com o objetivo de protegê-lo das condições adversas do meio, tais como luz, umidade, oxigênio e interações com outros compostos, estabilizando o produto, aumentando a vida útil e promovendo a liberação controlada da microcápsula em condições pré-estabelecidas (Shahidi & Han, 1993).

O uso de células encapsuladas para aplicação no meio ambiente tem muitas vantagens em relação as formulações feitas com células livres, incluindo a proteção do estresse biótico como a predação por protozoários e bacteriófagos, proteção do estresse abiótico como o efeito inibitório dos compostos tóxicos. Além disso, garante a sobrevivência e promove a atividade fisiológica, aumenta a densidade celular e o crescimento celular preferencial em várias zonas aeróbias e anaeróbias do gel encapsulado (Passos, 2006).

De acordo com Ré (1998), para ser considerada uma microcápsula, a partícula deve apresentar um tamanho entre 0,2 e 500 μm . Abaixo de 0,2 μm é considerada nanocápsula e acima de 500 μm , macrocápsula.

Nos últimos anos, as definições e empregos da microencapsulação têm sido ampliados, devido às novas necessidades que a indústria de alimentos apresenta em propriedades cada vez mais complexas nas formulações, que muitas vezes só podem ser conferidas através da microencapsulação (Gouin, 2004).

Algumas características das microcápsulas podem ser alteradas para atender necessidades específicas de aplicação, tais como: composição, mecanismo de liberação, tamanho de partícula, morfologia e custo. Quando as micropartículas são utilizadas em outros processos industriais, há uma série de questões que devem ser levadas em consideração na escolha do processo de microencapsulação: a funcionalidade que o ingrediente a ser microencapsulado deve fornecer ao produto final; o tipo de material de parede que pode ser utilizado; as condições de processamento às quais o material microencapsulado deve resistir sem liberar seu conteúdo; a concentração ótima de material ativo na microcápsula; o mecanismo de liberação do recheio; necessidades de tamanho de partícula, densidade e estabilidade e o limite de custo do material microencapsulado (Desai e Park, 2005).

A caracterização morfológica das microcápsulas é uma análise essencial, pois através dela pode-se observar visualmente se ocorreu a formação das microcápsulas, a integridade das paredes e também a distribuição de tamanho das mesmas e do material encapsulado (Rosenberg et al., 1988).

A imobilização de células ou esporos de microrganismos constitui uma alternativa que proporciona algumas vantagens, tais como: 1) não há problema de toxicidade; 2) é biodegradável; 3) fornece adequado crescimento de microrganismos; 4) é estável e possível de secar e esterilizar; 5) pode ser usada mais de uma vez em vários processos; 6) possibilita maior sobrevivência dos microrganismos quando inoculados no solo; 7) oferece vantagens bem estabelecidas envolvendo o sistema microbiano e a produção de ácidos, em

relação ao método de utilização de células ou esporos livres (Mofide et al., 2000; Wang, 2000).

Vesículas intactas e hifas do fungo *Glomus intraradices* encapsulados em alginato de sódio mostraram ser viáveis para inoculação de plantas de alho mesmo após longo tempo de armazenamento (Plenchette & Strullu, 2003).

2.5 Métodos Utilizados para Imobilização e Microencapsulação

A seleção da técnica de produção das microcápsulas, bem como a definição do material formador da parede ou casca depende da função que as microcápsulas deverão desempenhar, do tamanho desejado, do meio de liberação e do material a ser encapsulado. Alvim (2005) relata que os procedimentos para obtenção das microcápsulas podem ser divididos nos grupos básicos representados na Tabela 1.

Tabela 1 Procedimentos para obtenção de microcápsulas (Alvim, 2005).

Físico-Químicos	Químicos	Físicos
Coacervação simples ou complexa	Polimerização interfacial	<i>Spray drying</i>
Separação por fase orgânica	Inclusão molecular	<i>Spray coating</i>
Envolvimento lipossômico		Leito Fluidizado
		Extrusão
		Centrifugação com múltiplos orifícios
		Co-cristalização
		Liofilização

De acordo com Pilkington et al. (1998), as técnicas clássicas de imobilização celular podem ser classificadas em: a) naturais, as quais incluem a

formação de biofilmes e a adesão/adsorção microbiana em suportes sintéticos ou naturais, e b) artificiais, as quais incluem a encapsulação em matrizes como alginato de cálcio ou uso de agentes ligantes. A imobilização natural ocorre espontaneamente por meio de interações eletrostáticas. Já no caso da imobilização artificial, as células são ligadas às matrizes por ligações covalentes, utilizando-se agentes ligantes como glutaraldeído ou carbodiimida. A célula permanece viável independente dos possíveis danos causados pelo procedimento. A Figura 1 ilustra os diferentes tipos de imobilização celular utilizados em pesquisas e em plantas industriais.

Os métodos usados para imobilização de células podem ser classificados em 3 categorias básicas, segundo Chibata et al. (1986):

- Imobilização física por suporte inerte: é baseada na ligação das células diretamente aos suportes insolúveis em água;
- Método da ligação transversal: a imobilização é feita através de ligações transversais intermoleculares obtidas por meio de reagentes bifuncionais ou multifuncionais;
- Método de aprisionamento por hidrogéis: as células são aprisionadas diretamente dentro de matrizes poliméricas, tais como alginato, pectina, etc.

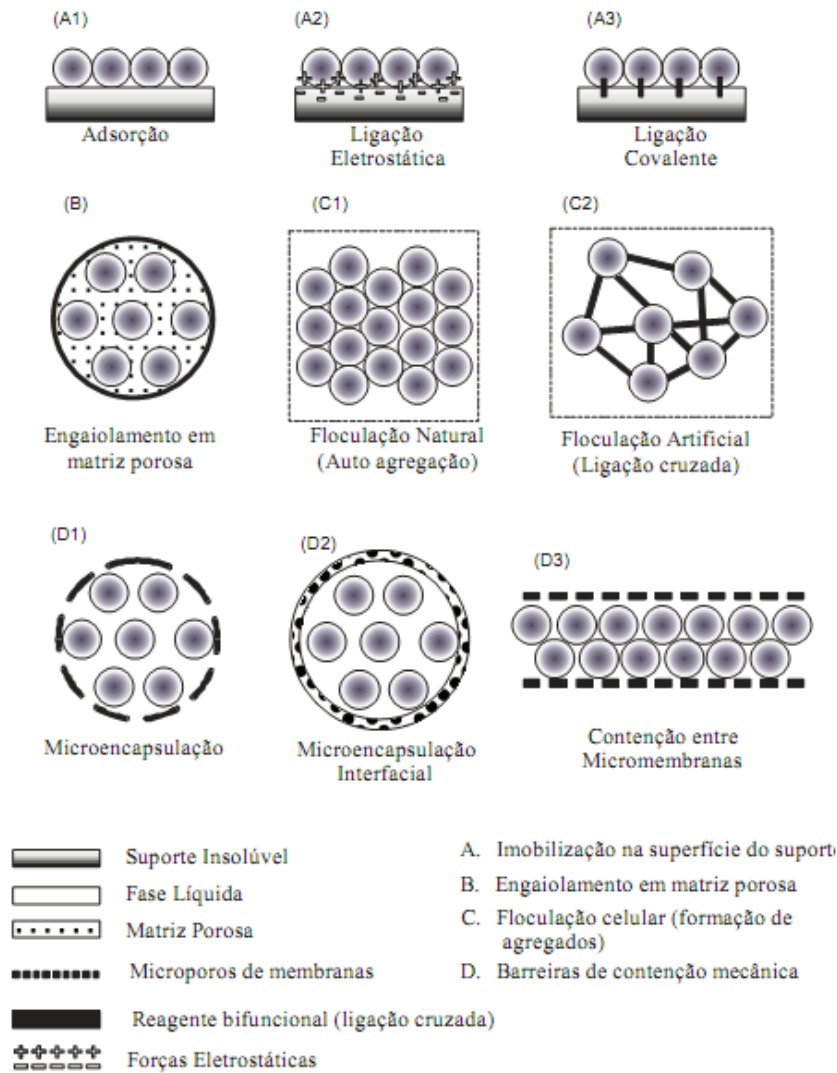


Figura 1 Diferentes métodos de imobilização celular de microrganismos, adaptado de Pilkington et al. (1998).

A seguir são apresentados os principais materiais utilizados na imobilização e microencapsulação de microrganismos, assim como uma breve descrição dos principais ingredientes utilizados na elaboração das formulações desta pesquisa.

2.6 Materiais Utilizados na Imobilização e Microencapsulação

O aprisionamento de células em matrizes de alginato é a forma de imobilização mais comumente citada na literatura. Entretanto, diversos materiais de parede podem ser utilizados na microencapsulação. Estes materiais podem ser de origem natural, semissintética, sintética, biodegradáveis ou não, no qual podemos citar a goma arábica, alginato, os carboidratos, amido, maltodextrina, proteínas, caseína, gelatina, derivados de celulose, carboximetilcelulose, etilcelulose e os polímeros derivados do ácido acrílico e metacrílico (Jackson; Lee, 1991).

O polímero encapsulador deve ser capaz de formar um filme que seja coesivo com o material a ser encapsulado, quimicamente compatível, que não reaja com o núcleo e que ofereça desejáveis propriedades de revestimento, tais como: resistência, flexibilidade, impermeabilidade e estabilidade (Donbrow, 1992).

Os materiais utilizados para imobilização são em geral alginatos de sódio, cálcio ou bário, ágar, poliacrilamida e poliuretano (Mofide et al., 2000).

Para ser considerado um bom material de parede, ele deve apresentar, segundo Cardoso (2000), as seguintes características: boa propriedade emulsificante e de formação de filmes, baixa viscosidade (mesmo em soluções com alta concentração de sólidos), baixa higroscopicidade, boas propriedades de secagem, estabilidade, ausência de sabores desagradáveis e boa proteção ao recheio.

A seguir serão apresentadas as principais características dos componentes utilizados nesta pesquisa.

2.6.1 Vixil[®] S

Segundo informações do fabricante, Vixil[®] S é composto predominantemente de lignosulfonato de sódio, contendo cerca de 13 a 19% de açúcares redutores em sua composição. Por essa razão, apresenta além de suas propriedades dispersantes, grande poder adesivo, sendo muito adequado para a fixação de microrganismos em plantas. Além disso, o alto teor de açúcares do produto atua como crioprotetor durante o congelamento, favorecendo o processo de liofilização.

As soluções de Vixil[®] S poderão fermentar se armazenadas por longo tempo. O produto pode ser dissolvido em água, formando soluções de até 40-45%, sem maiores problemas de viscosidade.

2.6.2 Glicerol

Dentre os crioprotetores mais comumente utilizados na conservação de fungos está o glicerol. Pereira et al (2010), estudando o isolamento e avaliação de diferentes concentrações de glicerol (10, 20 e 30%) na criopreservação a -80 °C de bactérias associadas a organismos marinhos, observaram que a concentração de glicerol ideal variou para cada grupo de microrganismo. O Glicerol é comumente adicionado a uma concentração de 10% (vol/vol) (Cefar, 2006).

Além da atividade crioprotetora, o glicerol é utilizado para alterar o microambiente no qual o fungo irá operar, atuando como agente umectante. O glicerol neste caso provém ao esporo do fungo umidade para germinação e penetração no hospedeiro. Alguns dos mais significantes trabalhos nesta área têm envolvido formulações com *Verticillium lecanii*. A adição de nutrientes e

umectantes nas formulações deste patógeno aumentou a eficácia contra pulgões e moscas brancas em casas de vegetação (Burgess, 1998).

2.6.3 Capsul®

O Capsul® é um amido modificado quimicamente pela incorporação de um componente lipofílico. Esta modificação dá ao material uma excelente capacidade de retenção de voláteis durante a atomização em *spray dryer* (Marchal et al., 1999). De acordo com o laudo analítico fornecido pelo fabricante, o Capsul® é um amido alimentício modificado obtido do milho ceroso, com valor de pH em torno de 3,25 e altamente solúvel em água (97%).

2.6.4 Amido Modificado

Os amidos em sua forma natural apresentam desvantagens para o uso industrial, tais como insolubilidade em água fria e retrogradação. A produção de amidos modificados é uma alternativa que vem sendo utilizada com o objetivo de superar uma ou mais limitações dos amidos nativos. As modificações alteram as propriedades do amido, aumentando sua utilidade nas aplicações industriais (Silva et al., 2006). A funcionalidade do amido pode ser modificada por meios físicos, químicos e biotecnológicos.

De acordo com Bemiller (1997), os objetivos da modificação dos amidos são: diminuir a retrogradação e a tendência das pastas em formar géis; aumentar a estabilidade ao resfriamento e descongelamento e a adesividade; melhorar a textura das pastas ou géis e a formação de filmes; adicionar grupamentos hidrofóbicos e introduzir poder emulsificante.

2.6.5 Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo formado por unidades de (1 - 4) 2-amino-2-deoxi-D-glucose (ou D-glucosamina) derivado da quitina, um polímero de ocorrência natural encontrado nas paredes celulares dos fungos, leveduras, insetos e principalmente nas carapaças dos crustáceos, notadamente camarão, lagosta e caranguejo, constituindo cerca de 30% do exoesqueleto destes últimos (Goosen, 1996).

Na natureza a quitosana é biosintetizada pela desacetilação enzimática da quitina no denominado “ciclo da quitina”. Em biotecnologia, a quitosana é utilizada na imobilização de células e enzimas e no empacotamento de colunas (Goosen, 1996).

2.6.6 Celulose Microcristalina

A celulose microcristalina, também conhecida por CMC, é uma molécula relativamente inerte, apresenta elevado grau de solubilidade e forma soluções de baixa viscosidade mesmo em concentrações mais elevadas. Tais características tornam CMC um ingrediente com potencial para elaboração de formulações contendo microrganismos. A CMC possui entre 5 e 10 nm de diâmetro e comprimento que varia de 100 nm a alguns micrômetros, o que corresponde a uma elevada área superficial específica, representando uma vantagem dessa celulose quando comparada a outras fibras de celulose. A celulose microcristalina é obtida a partir de polpa de madeira, sendo as regiões não cristalinas removidas por hidrólise ácida, correspondendo por isso a uma celulose com elevado índice de cristalinidade (Mathew; Oksman; Sain, 2005).

2.6.7 Leite em Pó

Dentre os crioprotetores que agem externamente nas células, o leite desnatado é o mais comumente usado. O leite desnatado pode ser preparado pela diluição do pó em água destilada na proporção de 20% (vol/vol) (Cefar, 2006).

2.7 Secagem de Microrganismos

A secagem, ou desidratação, é uma técnica comumente utilizada na industrialização de alimentos e baseia-se na redução de água disponível para os microrganismos e reações químicas (Fito et al., 1996). A secagem de microrganismos por ser realizada através de diversos métodos, como em estufa para secagem, por *spray drying* e por liofilização, técnica esta que será detalhada a seguir.

A dessecação com ar aquecido é, sem dúvida, a forma de secagem mais utilizada na indústria alimentícia. Nesse método há transferência simultânea de calor e massa. A energia é transferida para o alimento (proporcionando o calor latente de vaporização da água) e o vapor d'água migra na direção oposta, do alimento para o ar (Ordonez, 2005). Estufas para secagem com renovação e circulação de ar são equipamentos que utilizam este tipo de secagem.

A liofilização é considerada um dos métodos mais eficientes de se obter viabilidade de conservação por períodos de tempo extenso para a maioria dos microrganismos. Essa eficácia se deve ao fato de que a remoção de água intracelular, por sublimação, promovida pelo método, evita a formação de cristais de gelo que danificam as enzimas diluídas no citoplasma, causando a morte do microrganismo. Algumas leveduras, protozoários e a maioria dos vírus não podem ser processadas por este método (Cefar, 2006).

Para proteger os organismos de possíveis danos durante o processo de congelamento, estocagem e descongelamento, agentes crioprotetores são normalmente adicionados à suspensão da cultura. Existem dois tipos de agentes crioprotetores: àqueles que adentram a célula e protegem o ambiente intracelular e outros que protegem a célula externamente. Glicerol e dimetil-sulfóxido (DMSO) são mais comumente usados no primeiro caso; sacarose, lactose, glicose, manitol, sorbitol, dextran, pirrolidona e poliglicol são usados no segundo caso. A combinação de agentes é também comumente utilizada. Outros produtos que também têm sido utilizados como crioprotetores incluem detergentes como o Tween 80 (Cefar, 2006).

2.8 *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries e a Qualidade do Café

Os primeiros relatos da influência de fungos sobre a qualidade do café datam de 1936, quando Krug (1940) verificou, com auxílio de uma lupa de bolso em amostras de cafés ardidos, a presença de um fungo de micélio avermelhado identificado, inicialmente, como do gênero *Fusarium*. A partir daí, na série de trabalhos denominada “A origem dos cafés duros”, o autor procura relacionar a má qualidade da bebida à presença de fungos, principalmente dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*.

Dentre os fungos associados a grãos de café, o *Cladosporium cladosporioides*, um ascomiceto da ordem Eurotiales (Alexopoulos e Mims, 1979), é frequentemente encontrado e tem sido associado aos cafés de melhor qualidade, classificados como de bebida dura e mole.

Segundo Pereira et al. (2001), o fungo *Cladosporium sp.* tem sido relatado associado a cafés de boa qualidade em várias regiões, o que despertou o interesse para o seu uso como agente antagonista aos fungos deletérios a qualidade do café.

Alves e Castro (1998) relataram a ocorrência de *Cladosporium sp.* em frutos nas fases, verde-cana, cereja, passa, seco no pé, grãos no chão e até no café beneficiado, com incidência maior na fase de passa e seco no pé.

Segundo Pereira (2005), o conidióforo de *Cladosporium cladosporioides* mede em torno de 100µm, é pouco pigmentado, liso ou pouco rugoso. O ramoconídio com 0 a 1 septo tem 2-5(-7) mm de largura e 15-32 mm de comprimento e apresenta cicatriz aparente. Os conídios medem 2-5 x 2-6 mm (maioria 2 x 4-6 mm), com formato elipsoidal a limoniforme, raramente subgloboso, de parede geralmente lisa, com pigmentação verde-oliva clara, formando longas cadeias (Figura 2).

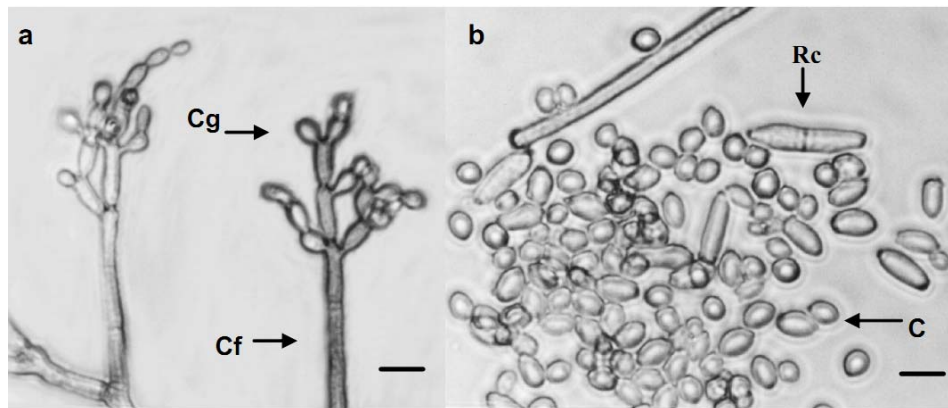


Figura 2 *Cladosporium cladosporioides* a. Conidióforo (Cf) e célula conidiogênica (Cg); b. Ramoconídio (Rc) e conídio (C). Barra = 10 µm. Fonte: Pereira (2005).

O gênero *Cladosporium* apresenta aproximadamente 500 espécies descritas, sendo 15 de importância de ocorrência comum. O fungo apresenta colônias de coloração verde-oliva, podendo ser cinza, amarelo, marrom ou negro, de textura aveludada ou flocosa. Por se tratar de um microrganismo considerado seguro ao homem, resistente aos raios solares (coloração escura), excelente propagação (pequenos e numerosos esporos anemófilos), pode-se

considerar que o *Cladosporium cladosporioides* apresenta excelentes características para ser empregado em formulações como agente bioprotetor. Vários relatos comprovam que *Cladosporium* sp está associado à bebida de boa qualidade do café. Um provável mecanismo de ação do *Cladosporium* seria o consumo muito rápido da mucilagem presente no fruto impedindo ou amenizando o estabelecimento de outros fungos (Pereira et al., 2005). Trata-se de uma espécie cosmopolita onde a maioria das espécies não é patogênica para os seres humanos, podendo ainda ser comumente encontrada no ar, solo, plantas, e carnes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Caracterização e Localização do Experimento

O cultivo, preparo das formulações, secagem, embalagem e avaliação da viabilidade dos microrganismos foram realizados no Laboratório de Análises Avançadas e Biotecnologia - LAAB, localizado no CEPE/Café da UFLA. As análises de teor de umidade e pH foram realizadas no Laboratório Central de Análises do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA. O preparo dos meios de cultura e contagem total de esporos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia da EPAMIG/Lavras-MG. As fotografias foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Fitopatologia da UFLA.

A seguir é representado na Figura 3 um fluxograma simplificado da pesquisa que foi dividida em três ensaios:

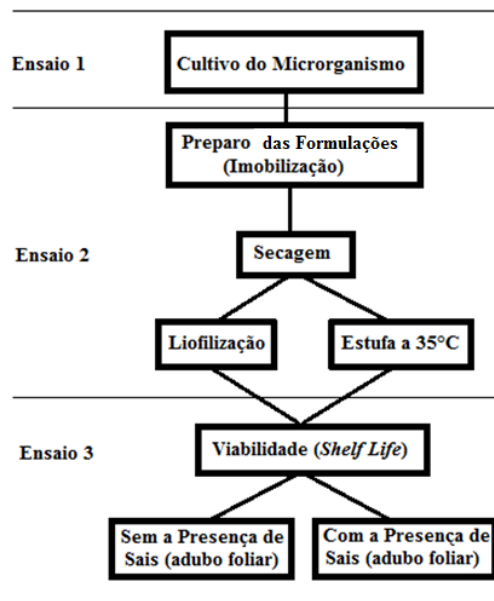


Figura 3 Fluxograma simplificado da pesquisa.

No Ensaio 1 foram avaliadas a viabilidade e rendimento de *Cladosporium cladosporioides* (fres.) de Vries cultivado em meio semissólido. Com os microrganismos cultivados no Ensaio 1 foi realizado o Ensaio 2, que consiste na imobilização e secagem do microrganismo, liofilizado e em estufa com renovação de ar a 35°C. O Ensaio 3 consiste na avaliação da vida de prateleira do microrganismo nas formulações obtidas no Ensaio 2 (*Shel Life*).

ENSAIO 1 VIABILIDADE E RENDIMENTO DE *Cladosporium Cladosporioides* (Fres.) de Vries CULTIVADO EM MEIO SEMISSÓLIDO

Preparo do Inóculo

Para inoculação do arroz semissólido preparou-se um inóculo a partir de uma colônia pura de *Cladosporium Cladosporioides* (Fres.) de Vries fornecida pela EPAMIG. O fungo foi cultivado sob condições controladas em placas de Petri de 9 cm de diâmetros, contendo o meio de cultura BDA (batata-dextrose-água) por 7 dias a 25 °C, com fotoperíodo de 12h. Após o cultivo adicionou-se na superfície da placa contendo o fungo (Figura 4) água destilada e Tween 20² (3 gotas por placa). Em seguida raspou-se levemente a superfície da placa com um bastão de vidro para auxiliar na remoção dos esporos.

² Auxilia na extração dos esporos e hifas.

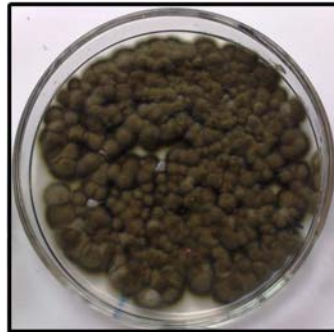


Figura 4 Placa com meio BDA contendo *Cladosporium Cladosporioides* (Fres.) de Vries utilizada para preparo do inóculo.

A solução resultante contendo os esporos na superfície da placa foi então ajustada para a concentração de 10^7 esporos/ml através da diluição em água destilada (Figura 5).

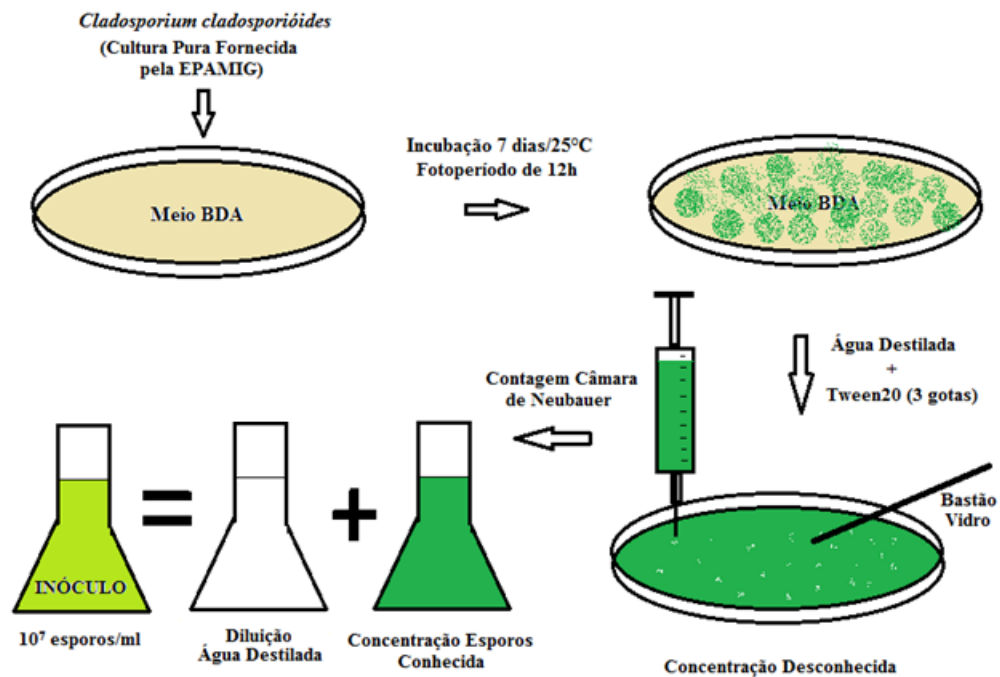


Figura 5 Preparo da solução de inóculo.

Preparo do Arroz no Estado Semissólido

Para o preparo do meio semissólido, adicionou-se 300g de arroz branco polido a 150ml de água em embalagens de polipropileno de alta densidade (PEAD) de tamanho 25 x 40 x 0,1cm (largura x comprimento x espessura), resistentes a autoclavagem, perfazendo um total de 12 embalagens.

Para evitar que as embalagens contendo o arroz estourassem durante a autoclavagem, reforçou-se a embalagem através da utilização de um saco externo extra (um saco dentro do outro). A vedação das embalagens foi feita em uma máquina de selagem térmica (Figura 6). Tomou-se o cuidado de evitar a selagem do saco com excesso de ar para que não estourasse durante a autoclavagem.

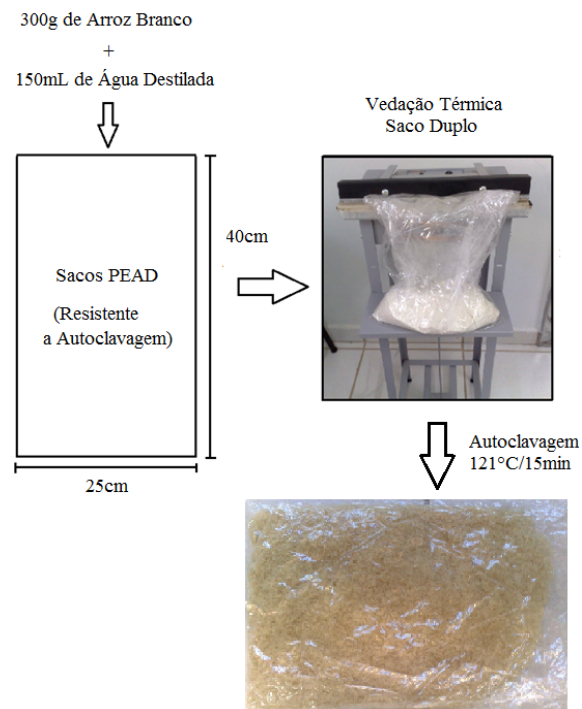


Figura 6 Vedação térmica das embalagens de polipropileno de alta densidade contendo arroz.

Após vedação as embalagens foram submetidas à esterilização em autoclave a 121°C por 15 minutos a 15 psi. Cabe mencionar que a obtenção de grãos de arroz cozidos mais “soltos” é tecnologicamente desejável, uma vez que favorece o desenvolvimento mais homogêneo do microrganismo pelo interior do saco de arroz.

Para a obtenção de grãos mais “soltos” basta evitar abrir o autoclave logo após a autoclavagem, aguardando cerca de 15 minutos antes de abrir o equipamento, contados a partir do retorno da pressão do equipamento à pressão inicial (pressão ambiente).

Inoculação e Incubação

Após a autoclavagem inoculou-se 25ml da solução de inóculo em cada uma das 12 embalagens através de injeção por uma seringa. A inoculação foi feita distribuindo os 25ml de inóculo em 6 pontos na superfície do saco em posições distintas para facilitar o espalhamento do inóculo no meio. Após a inoculação borrifou-se externamente álcool 70% sob os pontos onde foram feitos os furos, para assepsia do local.

Após a aplicação do álcool 70% agitou-se manualmente o saco contendo o arroz inoculado para melhorar o espalhamento dos esporos no arroz.

O meio inoculado foi incubado em BOD a 25°C com fotoperíodo de 12 horas por 20 dias.

Contagem de Esporos e Rendimento

Após o período de incubação realizou-se a contagem de esporos utilizando a câmara de Neubauer (Vieira, 2007), e calculou-se o rendimento industrial de esporos por litro de meio.

ENSAIO 2 IMOBILIZAÇÃO E SECAGEM DE *Cladosporium Cladosporioides* (Fres.) de Vries

Preparo da Matriz de Imobilização

Esta etapa consiste no preparo das 5 Formulações e do Controle (arroz com o fungo seco em estufa a 35°C, sem adição de nenhum produto). As composições das formulações estão representadas na Tabela 2. A composição e quantidade de cada componente foram definidas com base nas necessidades tecnológicas da formulação e em pré-testes.

Tabela 2 Composição química de diferentes formulações contendo o fungo *Cladosporium cladosporioides*.

Matriz	Formulações					Controle
	1	2	3	4	5	
Vixil S	315g	315g	315g	315g	-	-
Glicerol	70 ml	70 ml	70 ml	70 ml	-	-
Capsul	315g	-	-	-	-	-
Amido Solúvel	-	315g	-	-	-	-
Quitosana	-	-	105g	-	-	-
Celulose (CMC)	-	-	210g	-	-	-
Leite em Pó	-	-	-	315g	-	-
Solução de Esporos	1000 ml	1000 ml	1000 ml	1000 ml	1000 ml	-
Arroz c/ Fungo	-	-	-	-	700g ¹	700g ²

¹ Arroz moído, produto da filtração do arroz integral com o fungo.

² Arroz integral com o fungo.

O Vixil S foi empregado como matéria-prima base nas formulações 1, 2, 3 e 4 na concentração de 45% devido a suas características físico-químicas desejáveis como alto poder dispersante (necessário para garantir a dispersão dos

esporos na água), excelente solubilidade, presença de 13 a 19% de açúcares redutores em sua composição (efeito de crioproteção externa da célula), poder adesivo (fixa os esporos na planta) e biodegradabilidade. Cabe mencionar que a coloração âmbar/marrom escura deste componente confere potencial efeito de proteção dos esporos à radiação solar.

O Glicerol também foi utilizado nas formulações 1, 2, 3 e 4 como matéria-prima base na concentração de 10% por ser esta a concentração mais utilizada na literatura para crioproteção interna das células. Além de proteger o fungo durante o congelamento e liofilização, o Glicerol também auxilia na retenção de água em condições de campo favorecendo o desenvolvimento do fungo.

Os demais componentes específicos de cada formulação como o Capsul, Amido Solúvel, Quitosana e Leite em Pó foram empregados na concentração de 45% com base em suas características encapsulantes, crioprotetoras, elevada solubilidade e disponibilização de nutrientes para crescimento do fungo no campo.

Dentre as 12 embalagens obtidas após o término do Ensaio 1, 10 foram reunidas em um único recipiente e misturadas para homogeneização. Após mistura, reservou-se 2 embalagens do arroz com o fungo para elaboração do controle.

Da matéria prima-remanescente preparou-se a solução de esporos. Para tanto, adicionou-se em um liquidificador industrial de 500W (previamente higienizado com água a 100°C e álcool 70%) 1000ml de água destilada para cada 900g de arroz com o fungo. Para auxiliar na remoção dos esporos e hifas, utilizou-se cerca de 1ml de Tween 20 para cada batelada. O arroz foi triturado por 20 segundos em cada batelada. Após triturado o arroz foi peneirado em peneira de 80 mesh, sendo reservada a solução de esporos e o arroz (Figura 7).

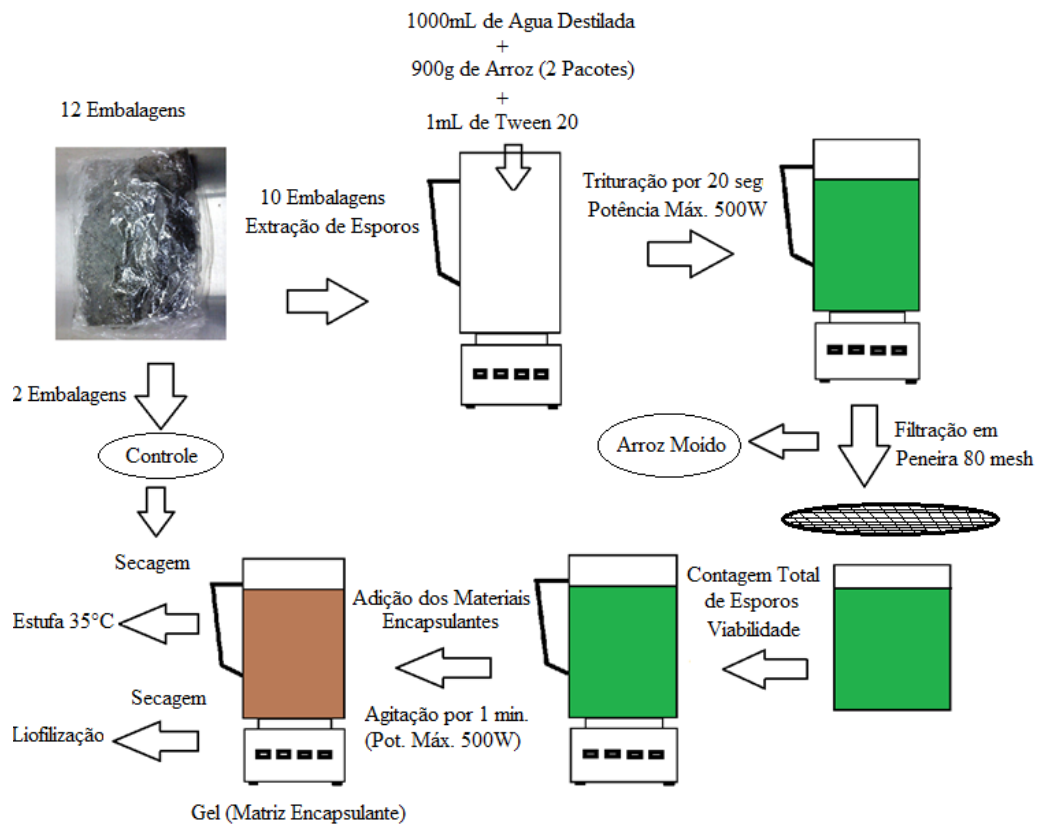


Figura 7 Preparo das Matrizes de Imobilização.

Logo após o término da extração dos esporos foi realizada a contagem total de esporos da solução resultante, assim como foi avaliada a viabilidade destes esporos através da enumeração dos fungos em meio BDA (Batata-Agar-Dextrose). As inoculações foram feitas pela técnica de semeadura em superfície. As diluições seriadas foram preparadas usando uma solução de peptona a 1%. As placas de Petri contendo as amostras foram incubadas em estufa do tipo *Biochemistry Oxygen Demand* (BOD) à temperatura de 25°C, com fotoperíodo de 12 horas, durante 5 dias.

De posse da solução de esporos preparou-se a matriz de imobilização no liquidificador industrial. Adicionou-se, inicialmente 1000ml da solução de esporos ao liquidificador industrial, seguido do Vixil S (315g), do Glicerol (70ml) e por último os demais componentes específicos (315g). Após a adição de todos os componentes ao liquidificador industrial, aguardou-se 1 minuto em agitação na potência máxima para formação do gel.

Cabe mencionar que todos os componentes das matrizes utilizados neste trabalho foram previamente testados quanto a sua solubilidade, sendo todos os componentes de alta solubilidade, com exceção do arroz e seus resíduos provenientes da extração no liquidificador industrial.

Secagem

As matrizes obtidas na etapa anterior contendo o *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries foram secas por dois diferentes métodos: liofilização e estufa a 35°C (Figura 8).

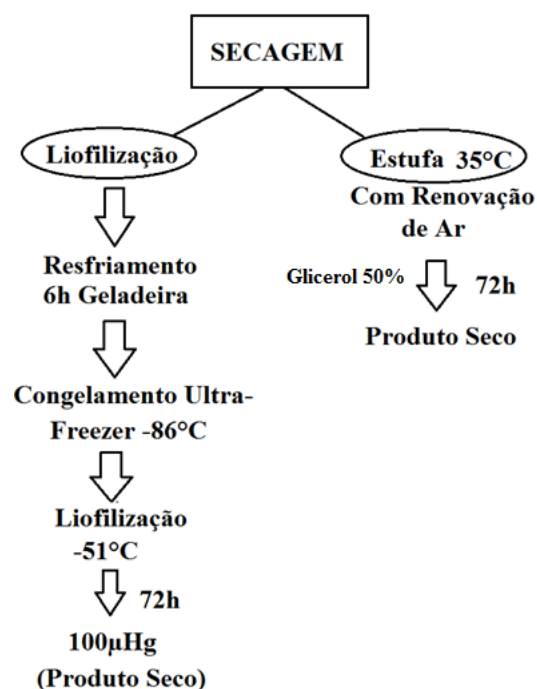


Figura 8 Métodos e condições de secagem das matrizes de imobilização.

Secagem da Matriz de Imobilização por Liofilização

Antes de proceder a Liofilização realizou-se o resfriamento do gel contendo o agente bioprotetor por 6 horas em geladeira. Após o resfriamento realizou-se o congelamento em um ultrafreezer Sanyo *VIP™ Series* (modelo MDF-U53VA) a -86°C . Já congeladas as matrizes de imobilização contendo *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries foram secas em liofilizador modelo L101 (Liobras do Brasil Ltda), sendo realizadas três repetições. A temperatura de operação do liofilizador foi de -50°C . O término da secagem foi estabelecido após o equipamento atingir a pressão de $100\mu\text{Hg}$, pressão ocorrida após 72h de operação.

Secagem da Matriz de Imobilização em Estufa a 35°C

As matrizes de imobilização obtidas na etapa anterior foram secas em estufa de secagem Tecnal (modelo TE-394/3) na temperatura de 35°C, sendo realizadas três repetições, com renovação de ar. A espessura máxima da camada de secagem foi de 1cm. O tempo total de secagem foi de 72h.

Para secagem do controle (arroz + fungo), borrifou-se superficialmente glicerol a 50% no início da secagem para minimizar a perda de esporos durante a renovação de ar. A curva de secagem do controle foi caracterizada mediante determinações de umidade inicial com pesagem das amostras a cada 6 horas até o peso constante, sendo realizadas 3 repetições. Cerca de 450g de arroz foi colocado em bandeja (79 cm de comprimento x 59 cm de largura x 15 cm de profundidade) e distribuído de forma homogênea em camadas de no máximo 2cm de espessura em estufa de secagem com circulação forçada de ar quente (Tecnal - modelo TE-394/3).

Caracterização das Matrizes de Imobilização Após Secagem

Após o processo de secagem avaliou-se o teor de umidade, pH, viabilidade e realizou-se a microscopia eletrônica de varredura, conforme metodologias a seguir.

Avaliação do Teor de Umidade

O teor de umidade foi determinado, gravimetricamente, após secagem em estufa a 65°C, segundo Association of Official Analytical Chemistry - AOAC (1990).

Avaliação do pH

O pH foi determinado utilizando-se o método eletroanalítico (potenciométrico) em peagâmetro Tecnal^R Tec 3MP, segundo IAL (1985).

Avaliação da Resistência de Diferentes Formulações com *Cladosporium cladosporioides* (fres.) de Vries aos Processos de Secagem

Visando determinar o efeito das condições de secagem na viabilidade dos microrganismos, foram feitas contagens de unidades formadoras de colônias (UFC) nos pós-obtidos após os processos de secagem.

Os fungos foram enumerados no meio BDA (Batata-Agar-Dextrose), sendo as inoculações feitas pela técnica de semeadura em superfície. As diluições seriadas foram preparadas usando uma solução de peptona a 1%. As placas de Petri contendo as amostras foram incubadas em estufa do tipo *Biochemistry Oxygen Demand* (BOD) à temperatura de 25°C, com fotoperíodo de 12 horas, durante 5 dias (Figura 9).

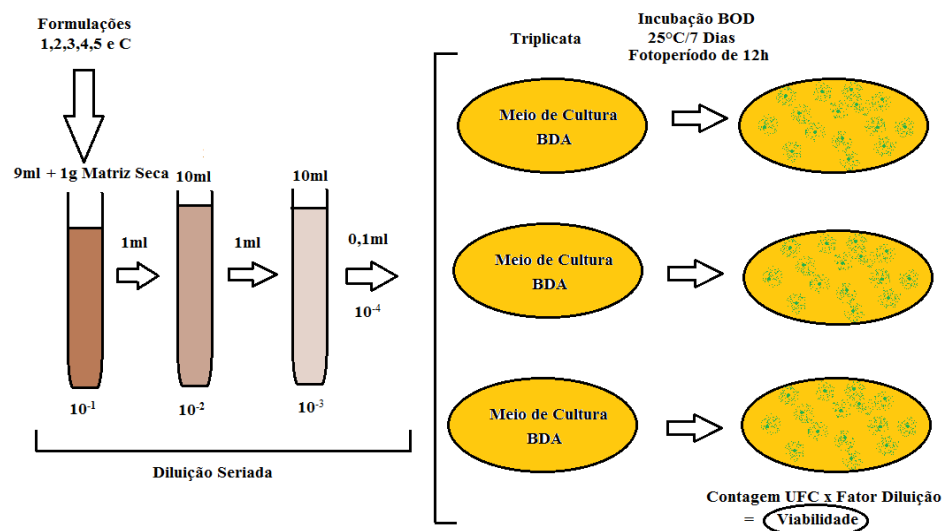


Figura 9 Avaliação da resistência aos processos de secagem.

Caracterização Morfológica das Matrizes por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras foram preparadas e fotografadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural – LME da UFLA, Lavras- MG, de acordo com o protocolo para preparação de amostras para microscopia eletrônica de varredura, proposto por Alves, 2004.

Avaliação da Solubilidade

A solubilidade foi avaliada diluindo-se 2g da formulação em 50ml de água destilada sob agitação em banho-maria a 27°C por 10 minutos. Em seguida filtrou-se em papel de filtro Whatman n°4 previamente pesado. Após a filtração o papel de filtro foi seco em estufa a 65°C por 48h. O percentual de solubilidade foi determinado pela diferença entre os sólidos retidos no papel de filtro e o peso da matriz inicial.

Análise Estatística

Para avaliar a resistência de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries frente aos processos de secagem utilizou-se o Delineamento Experimental Inteiramente Casualizado (DIC) considerando os efeitos dos seis tratamentos após os processos de secagem, com 3 repetições por tratamento.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o teste de Scott-Knot, adotando-se 5% como nível crítico de probabilidade para ocorrência do erro tipo I, por meio do *software* estatístico SISVAR versão 5.3 (UFLA).

ENSAIO 3 ESTABILIDADE DURANTE A ESTOCAGEM (*SHELF LIFE*)

As matrizes obtidas no Ensaio 2 contendo *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries foram avaliadas quanto á viabilidade, umidade e pH nos tempos 30, 60, 90, 120 e 150 dias, seguindo os mesmos procedimentos descritos no Ensaio 2 para estas análises.

Foram avaliadas duas formas de armazenamento, com e sem a presença de sais (adubo foliar). As matrizes sem o adubo foliar foram armazenadas em potes de plástico de 500ml com rosca, que facilitam o processo de congelamento e liofilização. Já as matrizes com o fertilizante foliar (Boro 3,8%; Enxofre 9,5%; Magnésio 1,2%; Manganês 5,4%; Potássio 15%; Zinco 9%) foram armazenadas em embalagens metálicas laminadas de 500ml (Figura 10) que garantem impermeabilidade a luz.

Com base na concentração por litro requerida para cada um dos componentes, estabeleceu-se a quantidade a ser misturada de cada componente: 8 partes de adubo para cada 5 partes da matriz de imobilização.

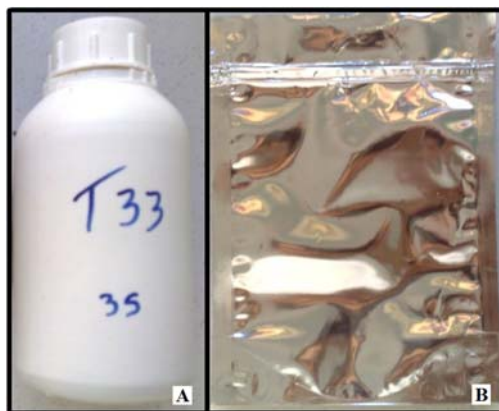


Figura 10 A) Pote plástico (Sem Sais) e B) Saco laminado (Com Sais) utilizados durante armazenamento.

Análise Estatística

Para a avaliação da estocagem das matrizes de imobilização (*shelf life*) sob o número de células viáveis, considerou-se o Delineamento de Parcela Subdividida, com desdobramento dos graus de liberdade de tratamentos em esquema fatorial 6x5. Nestas análises, o modelo estatístico considerou como parcela as 6 diferentes matrizes de imobilização, e os períodos de monitoramento (0, 30, 60, 90 e 120 dias) como subparcela. Em caso de interações significativas ($P < 0.05$), procedeu-se o desdobramento do tempo de estocagem dentro de cada um das diferentes matrizes de imobilização, e vice-versa.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o teste de Scott-Knot, adotando-se 5% como nível crítico de probabilidade para ocorrência do erro tipo I, por meio do *software* estatístico SISVAR versão 5.3 (UFLA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

ENSAIO 1 VIABILIDADE E RENDIMENTO DE *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries CULTIVADO EM MEIO SEMISSÓLIDO

Para que o cultivo seja considerado eficiente e viável para utilização em escala industrial para este agente, espera-se a produção mínima de 10^8 esporos/ml (10^{11} esporos/L) de meio cultivado, e uma viabilidade mínima de $8,5 \times 10^7$ UFC/ml ($8,5 \times 10^{10}$ UFC/L) de meio cultivado. A seguir na Figura 11 pode-se observar o arroz inoculado com o agente bioprotetor nas embalagens de arroz na BOD, e o arroz completamente tomado pelo fungo (máximo crescimento) antes e após a secagem.



Figura 11 Agente bioprotetor em diferentes etapas do processo produtivo.

O rendimento obtido foi de $1,81 \times 10^9$ esporos/ml ($1,81 \times 10^{12}$ esporos/L) de meio cultivado, em um período de 20 dias. A viabilidade média foi de $2,1 \times 10^8$ UFC/ml ($2,1 \times 10^{11}$ UFC/L) de meio cultivado. Segundo Mendonça (1992), sistemas de baixa tecnologia podem gerar rendimentos de 10^{13} conídios kg^{-1} de *Metarhizium anisopliae* em arroz; entretanto, outros pesquisadores indicam

rendimentos consistentes de $1-5 \times 10^{12}$ conídios kg^{-1} (Dorta e Arcas, 1998; Jenkins et al., 1998), valores estes próximos ao observado neste trabalho ($1,81 \times 10^{11}$ esporos/L).

Já Bradley et al. (1992) relataram que sistemas pilotos têm produzido rendimentos de 3×10^{13} conídios kg^{-1} de substrato (1 litro de volume fermentado), rendimento este muito superior ao observado neste trabalho.

Entretanto, considerando que o fungo foi cultivado em um meio de baixo custo e de processamento simples, pode-se considerar que do ponto de vista técnico e econômico o rendimento observado foi bastante satisfatório.

Carvalho (2007) estudando o tempo de cultivo em arroz no estado semissólido de *Cladosporium cladosporioides* verificou que até o 10º dia de incubação houve um aumento rápido no diâmetro da colônia, porém, após o 10º dia de cultivo, o crescimento do fungo sofreu um declínio. Para garantir um crescimento máximo, o tempo de cultivo deste trabalho foi de 20 dias. Maiores estudos mostram-se necessários para se estabelecer com precisão o tempo de produção máxima de esporos de *Cladosporium cladosporioides* cultivado em arroz.

Em estudo realizado por Jenkins et al (1998), a produção máxima de conídios aéreos em substratos sólidos requereu menos tempo que o empregado neste trabalho, de 10 a 14 dias para a produção de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (formalmente identificado como *Metarhizium flavoviride*) e *Beauveria bassiana*.

ENSAIO 2 IMOBILIZAÇÃO E SECAGEM DE *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries

É inegável o crescimento significativo de pesquisas em busca de métodos de preservação de microrganismos. Atualmente, o método mais utilizado, para este fim, consiste na liofilização (Oliveira, 2006).

No presente trabalho, logo após o término da extração dos esporos foi avaliada a viabilidade destes esporos em solução, obtendo-se valores de $1,37 \times 10^7$ UFC/ml. Após o preparo das matrizes de imobilização, procedeu-se aos processos de secagem e verificou-se a resistência do agente bioprotetor aos processos de secagem (Tabela 3). Na Figura 12 pode ser observado o aspecto das matrizes obtidas após os processos de secagem.

Tabela 3 Viabilidade do agente bioprotetor antes e após os processos de secagem por liofilização e secagem em estufa.

Formulações	Liofilizado UFC/mL		Estufa 35°C UFC/mL	
	Antes	Depois	Antes	Depois
1	$1,37 \times 10^6$ Ba	$8,60 \times 10^5$ Ab	$1,37 \times 10^6$ Ba	0Bb
2	$1,37 \times 10^6$ Ba	$8,13 \times 10^5$ Ab	$1,37 \times 10^6$ Ba	0Bb
3	$1,37 \times 10^6$ Ba	$7,76 \times 10^5$ Ab	$1,37 \times 10^6$ Ba	0Bb
4	$1,37 \times 10^6$ Ba	$1,20 \times 10^6$ Aa	$1,37 \times 10^6$ Ba	0Bb
5	$1,95 \times 10^6$ Aa	$1,09 \times 10^6$ Ab	$1,95 \times 10^6$ Aa	0Bb
C	NA	NA	$2,14 \times 10^7$ Aa	$4,89 \times 10^6$ Ab
CV	8,95%		5,50%	

*Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Scott-knot ao nível de 5% de probabilidade.

NA – Não Avaliado.

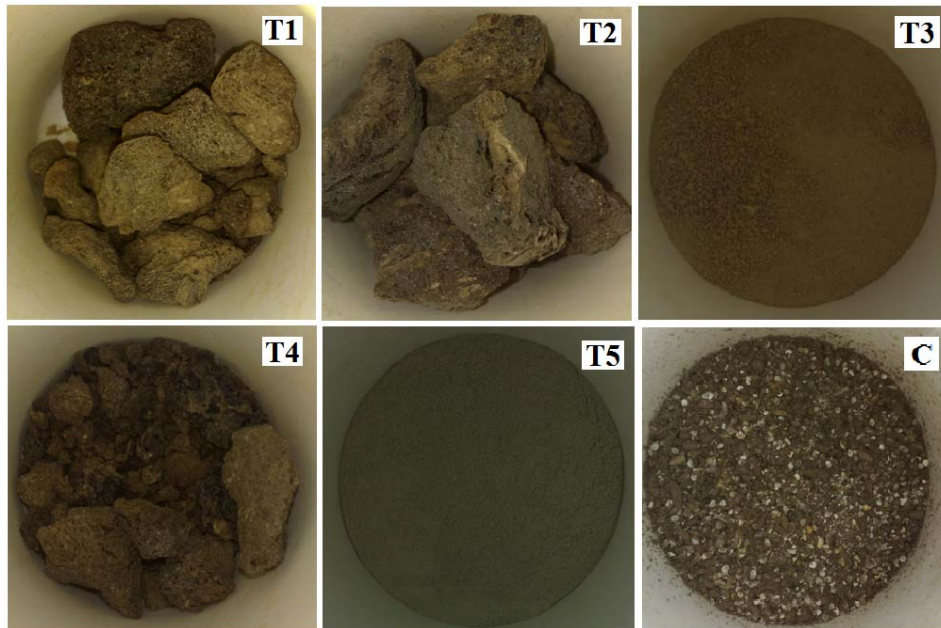


Figura 12 Aspecto das matrizes obtidas após liofilização. 1: Capsul +Vixil S + Glicerol + Esporos; 2: Amido Solúvel +Vixil S + Glicerol + Esporos; 3: Quitosa + CMC +Vixil S + Glicerol + Esporos; 4: Leite em Pós Desnatado +Vixil S + Glicerol + Esporos; 5: Solução de Esporos + Arroz (proveniente da filtragem); C: Arroz com Fungo Seco em Estufa.

Dentre as formulações apenas a 3 e a 5 foram obtidas na forma de pó molhável após liofilização sem necessidade de sofrer trituração. As demais formulações apresentaram-se na forma de grandes blocos rígidos e quebradiços, mas que podem ser facilmente triturados.

Com relação à solubilidade em água, todos os tratamentos foram solúveis e formaram soluções estáveis, apesar de haver a precipitação de resíduos de arroz triturados após algum tempo. Uma possível solução para este problema seria realizar a extração de esporos no arroz sem a presença de lâminas de trituração pela utilização de um homogeneizador de amostras do tipo “Stomacher”, o qual seria mais adequado para este caso pelo fato de não entrar

em contato com a amostra, seguida de posterior filtragem em peneira de 80 *mesh*.

De acordo com a Tabela 3, apenas a formulação 4 não sofreu perda significativa de viabilidade durante a secagem. Entretanto, todas as formulações liofilizadas apresentaram, estatisticamente, a mesma viabilidade após a secagem, o que revela que o processo de liofilização empregado não foi agressivo para estes microrganismos e garantiram a integridade celular da maioria da população. Torna-se importante ressaltar que na liofilização, mesmo havendo uma perda de viabilidade, nas formulações 1, 2, 3 4 e 5 a mesma foi relativamente baixa, o que nos permite concluir que o processo é viável para todas as formulações avaliadas.

A sobrevivência do fungo *Cladosporium cladosporioides* ao processo de liofilização concordaram com os de Carneiro et al. (1996), Nalepina et al. (1990) e Garcia (2007) que demonstraram a sobrevivência de outras espécies de fungos à liofilização.

Oliveira (2006) estudando a resistência a secagem de *Lactobacillus acidophilus* e *Bacillus lactis* na dispersão e no pó coletado do *spray drying* observou que o primeiro sofreu redução de 0,4 e o segundo de 0,6 ciclos logarítmicos, valores estes superiores aos encontrados neste trabalho (1=0,21; 2=0,23; 3=0,25; 4=0,06 e 5=0,10).

Com exceção do controle, todas as demais formulações secas em estufa a 35°C não resistiram ao processo de secagem, apresentando viabilidade zero. A combinação de alto teor de umidade do gel com a temperatura e o tempo de secagem utilizados neste trabalho mostrou-se inadequada para a secagem do fungo estudado, causando inativação de proteínas essenciais para a manutenção de seu equilíbrio celular. O Controle, por não ter sofrido reidratação apresentava menor teor de umidade (e conseqüentemente menor condutibilidade térmica), o

que favoreceu sua resistência ao processo de secagem em estufa comparado as demais formulações, apresentando redução de 0,64 ciclos logarítmicos.

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram inferir que a secagem por liofilização foi a mais adequada para secagem das matrizes contendo o fungo, uma vez que a redução na população de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries foi de no máximo 0,25 ciclos logarítmicos. As formulações 4 e 5 foram as que apresentaram os melhores resultados, com perdas inferiores a 0,10 ciclos logarítmicos.

O bom desempenho da formulação 4 pode ser explicado devido à combinação de agentes crioprotetores em sua formulação como o glicerol, o Vixil S (rico em açúcares redutores) e o leite em pó desnatado, que entre os crioprotetores que agem externamente nas células, é o mais comumente empregado (Cefar, 2006).

Buscando encontrar o tempo ideal de secagem do Controle, elaborou-se a curva de secagem do mesmo, conforme Figura 13 a seguir.

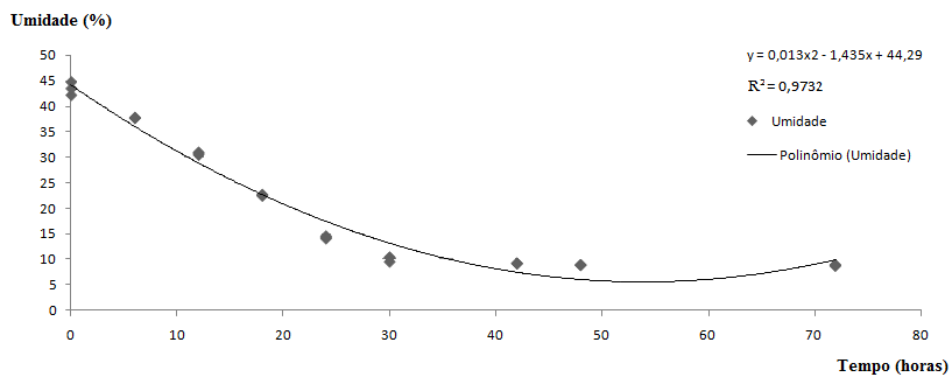


Figura 13 Equação de regressão da umidade (%) em função do tempo (horas).

De acordo com o modelo representado na Figura 9, o tempo de secagem ideal para o arroz contendo o fungo é de 55h onde ocorre o ponto de umidade

mínimo de 4,7%. Entretanto, o teor real de umidade mínimo observado foi de 8,95%, valor superior ao ideal observado na literatura para a maioria dos fungos, que está em torno de 5%. Feng et al (1994) através de vários estudos estabeleceram como um protocolo padrão para produção de *B. bassiana* na China uma secagem com teor de umidade menor que 5%.

Buscando resolver este problema de alta umidade, sugere-se que em trabalhos futuros seja feita a moagem do arroz no tempo de 55h (teor de umidade igual a 8,95%), para então continuar a secagem buscando atingir a umidade desejada (aproximadamente 5%). O objetivo da trituração neste caso é aumentar a área superficial do arroz em contato com o ar de secagem para facilitar a remoção da umidade do interior do arroz.

Vários estudos mostraram que a umidade relativa foi um fator importante em temperaturas de armazenamento moderadas de vários fungos, incluindo *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *Paecilomyces* ssp (Clerk e Mandelin, 1965; Kawakami e Mikuni, 1965; Daoust e Roberts, 1983).

Caracterização Morfológica das Matrizes por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As fotomicrografias contendo as matrizes de imobilização 1, 2, 3 e 4 com *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries, secas em liofilizador, apresentaram-se na forma de placas de elevada dimensão (Figura 14).

Observa-se que o encapsulamento produz uma matriz sólida com as hifas e esporos imobilizados no interior dos grânulos.

Já as formulações 5 (liofilizado) e Controle (seco em estufa) apresentaram partículas formadas pela coalescência das partículas individuais de grânulos de arroz e paredes contínuas e rugosas (Figura 14) impregnadas interna e externamente de propágulos do fungo, ficando clara a diferença entre as

demais formulações onde o fungo está preso dentro de uma matriz (encapsulado).

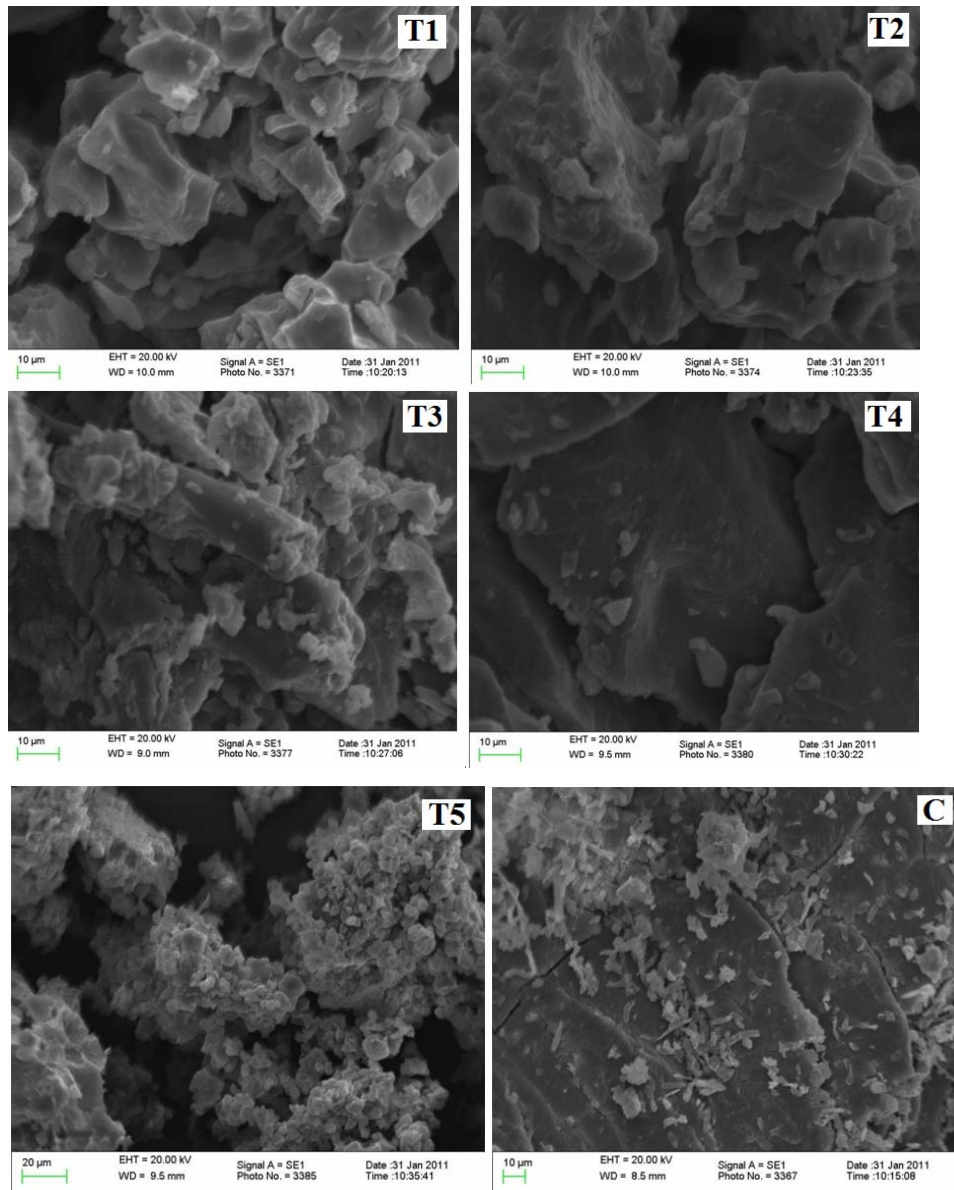


Figura 14 Fotomicrografias obtidas por MEV das matrizes de imobilização 1, 2, 3, 4 e 5 após secagem por liofilização, e em estufa a 35°C (C).

Ao contrário das demais formulações, devido à presença de hifas e esporos do fungo na superfície externa do arroz pode-se considerar estas formulações como menos seguras para transporte de microrganismos.

Solubilidade

A solubilidade das formulações é representada na Tabela 4 a seguir.

Tabela 4 Solubilidade das formulações.

Formulação	Solubilidade (%)
1	80,96B
2	84,25A
3	69,25C
4	83,87A
5	25,16D
C	17,86E
CV	1,58%

*Médias seguidas pela mesma letra maiúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-knot ao nível de 5% de probabilidade.

De acordo com a Tabela 4 as formulações de maior solubilidade foram a 2 e 4, seguido das formulações 1, 3, 5 e C. Os resíduos de arroz presentes nas formulações 1, 2, 3, e 4 provenientes da solução de esporos ficaram claramente visíveis no papel de filtro após a filtragem, o que indica que a remoção ou redução destes resíduos na solução de esporos resultaria em níveis de solubilidade próximos a 100% para as formulações 1, 2, e 4. Estes resultados eram esperados, uma vez que os componentes presentes nestas formulações são de alta solubilidade (Vixil S, Glicerol, Capsul, Amido Modificado, CMC e Leite

em Pó), com exceção da Quitosana, que apenas apresenta boa solubilidade em pH's de acidez moderada a forte (Goy et al, 2004). Esta característica da Quitosana explica a menor solubilidade da formulação 3 (Vixil S + Glicerol + Quitosana + CMC + Solução Esporos) em relação às formulações 1, 2 e 4 , uma vez que a formulação 3 apresentou alto pH (Tabela 7). A baixa solubilidade das formulações 5 e C podem ser explicadas pela presença exclusiva do arroz como material base destas formulações.

Cabe mencionar que a concentração testada (2g/50mL) foi 8 vezes superior a necessária para este produto (0,25g/50mL) e que os resíduos retidos no papel de filtro passaram, anteriormente, por uma peneira de 80 *mesh*, o que os torna compatível com a maioria dos pulverizadores agrícolas comerciais.

ENSAIO 3 ESTABILIDADE DURANTE A ESTOCAGEM (*SHELF LIFE*)

O dano celular e a inativação podem ocorrer não só durante o processamento, mas também durante a estocagem de células desidratadas, portanto, além de sobreviver ao processo de imobilização e secagem, o microrganismo deve permanecer viável no pó durante algum tempo para que possa ser aplicado (Oliveira, 2006).

No caso dos agentes biocontroladores, além de resistirem ao período de estocagem, os mesmos devem ter condições de sobreviverem e se desenvolverem quando aplicados no campo onde estarão sujeitos aos efeitos dos raios solares e a escassez de água e nutrientes. Além disso, uma formulação adequada deve permitir uma boa fixação do agente ao seu destino.

Por ter sido elaborado 90 dias após os demais tratamentos, o Controle foi avaliado somente até 60 dias de estocagem.

Estabilidade Durante a Estocagem Sem a Presença de Sais

A seguir é representado na Tabela 5 o resultado da viabilidade das diferentes formulações ao longo do tempo.

Tabela 5 Viabilidade do agente bioprotetor (10^4 x UFC/mL) em função do tempo de estocagem.

Form.	Tempo (Dias)					
	0	30	60	90	120	150
1	87 Ca	76Ca	8,3Cb	8,9Cb	6,9Ab	5,3Ab
2	81Ca	36Eb	6,3Cc	6,0Cc	5,0Ac	3,9Ac
3	78Ca	66Da	26Bb	3,3Cc	3,5Ac	1,3Ac
4	120Ba	100Ba	68Ab	46Ac	14Ad	14,4Ad
5	109Ba	93Ba	73Ab	26Bc	25Ac	9,8Ad
C	490Aa	234Ab	56Ac	NA	NA	NA
CV	17,66%					

*Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Scott-knot ao nível de 5% de probabilidade.

NA - Não Avaliado.

De acordo com a Tabela 5, observa-se que a partir dos 60 dias houve um declínio significativo na viabilidade para todas as formulações. Ao final de 150 dias, todas as formulações apresentaram, estatisticamente, a mesma viabilidade. Apesar de haver uma perda significativa de viabilidade após 150 dias, as formulações ainda apresentam uma relativa boa viabilidade. Já o Controle apresentou viabilidade até 60 dias, podendo ter continuado viável após este período.

Shi (1998) relatou que conídios em formulações com argila permaneceram armazenados com umidade < 10% a temperatura ambiente com viabilidade de 91% por 480 dias e 70% viáveis por 780 dias. Chen et al (1990)

também encontraram estabilidade similar em argila atapulgita armazenada por 12 meses a 26°C. Provavelmente, o elevado tempo de viabilidade observado por estes pesquisadores nestes trabalhos podem estar associados a atividade antiumectante das argilas utilizadas.

O teor de umidade final é um fator importante na conservação e viabilidade de microrganismos desidratados (Champagne et al., 1996). A seguir na Tabela 6 é representado o teor de umidade das matrizes de imobilização ao longo de 150 dias.

Tabela 6 Teor de umidade (%) ao longo do armazenamento.

Form.	Tempo (Dias)					
	0	30	60	90	120	150
1	3,79Bc	5,49Bb	7,83Ba	8,09Aa	8,35Aa	8,38Aa
2	3,58Bc	4,20Cc	6,47Cb	6,97Bb	7,20Ba	7,20Aa
3	3,78Bc	4,94Bb	5,16Db	6,97Ba	7,18Ba	7,68Aa
4	3,16Cc	3,99Cb	7,44Ba	7,69Aa	7,98Aa	8,00Aa
5	2,88Cf	3,61Ce	5,93Cd	6,84Bc	7,62Bb	8,37Aa
C	9,20Ac	9,83Ab	10,83Aa	NA	NA	NA
CV	6,10%					

*Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Scott-knot ao nível de 5% de probabilidade.

NA – Não Avaliado.

Observa-se pela Tabela 6 que as formulações que apresentaram o menor teor de umidade inicial foram as formulações 1, 2 e 3, seguidas das formulações 4 e 5, e do Controle com o maior teor de umidade. Ao final de 150 dias de estocagem, o teor de umidade foi estatisticamente igual para todas as formulações. Devido ao ganho expressivo de umidade ao longo do período de estocagem conclui-se que as embalagens e os métodos utilizados para evitar a transferência de umidade não foram adequados, permitindo a entrada de

umidade, o que seguramente pode ter contribuído para a perda de viabilidade ao longo do tempo, observada na Tabela 5. Do observado pode-se pressupor que uma vez estabilizada a umidade, talvez melhore a viabilidade ao longo do tempo.

Além do efeito da embalagem e do efeito da manipulação das formulações sob o ganho de umidade cabe mencionar o potencial higroscópico das formulações obtidas por liofilização com alto teor de açúcares e concentrados proteicos, o que também favorece uma maior absorção de umidade.

A seguir é representado na Tabela 7 o pH em função do tempo de estocagem. Com exceção da formulação 4 e do Controle, houve uma tendência geral de redução do pH ao longo do processo de estocagem. As formulações 2 e 3 apresentaram a maior redução no pH (0,6), seguido das formulações 1 (0,16) e 5 (0,18).

Tabela 7 pH em função do tempo de estocagem.

Form.	Tempo (Dias)					
	0	30	60	90	120	150
1	6.77Da	6.75Da	6.70Eb	6.66Db	6.67Db	6.61Dc
2	7,8 Ba	7,68Bb	7,66Bb	7,27Bc	7,23Cd	7,20Cd
3	8,24Aa	7,98Ab	7,92Ab	7,98 Ab	7,62Ac	7,64Ac
4	7,23Cb	7,08Cc	7,16Cb	7,23Cb	7,28Ba	7,29Ba
5	6,66Ea	6,46Ec	6,69Ea	6,57Eb	6,65Da	6,48Ec
C	6,45Bb	6,40Bb	6,85Aa	NA	NA	NA
CV	0,62%					

*Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Scott-knot ao nível de 5% de probabilidade.
NA – Não Avaliado.

A redução do pH observada nas formulações 1, 2, 3 e 5 podem ter ocorrido devido a fermentações de açúcares presentes nas formulações. O aumento do pH da formulação 4 pode estar relacionado ao maior teor proteico desta formulação à base de leite em pó o qual favoreceu a degradação de proteínas em relação a degradação de açúcares, acumulando amônia no meio e aumentando o pH. Observa-se que a redução do pH acompanha o aumento do teor de umidade, notadamente a partir do tempo de 60 dias, uma vez que a presença de água extra facilitaria o processo de fermentação.

De forma geral observa-se que com o passar do tempo o teor de umidade aumentou e a viabilidade diminuiu. Neste sentido, Clerk e Mandelin (1965), Kawakami e Mikuni (1965); Daoust e Roberts (1983) e Kutt et al (2001), observaram que a umidade relativa foi um fator importante em temperaturas de armazenamento moderadas de vários fungos, fato este que pode estar relacionado com a perda de viabilidade observada nesta pesquisa.

Viabilidade Durante a Estocagem Com Mistura de Sais

A seguir pode ser observada na Tabela 8 a viabilidade do agente bioprotetor da qualidade do café armazenado misturado com sais. De acordo com os resultados, observa-se que todos os tratamentos apresentaram boa viabilidade na presença de sais no tempo 0. Entretanto, nas formulações 1, 2, 3, 4 e 5 no decorrer do tempo a viabilidade declina até atingir nula viabilidade após 120 dias. Por desenvolver de forma satisfatória no tempo 0, supõe-se que boa parte da perda da viabilidade tenha ocorrido devido a fatores referentes ao ganho de umidade durante a estocagem e não devido ao efeito dos sais presentes no adubo.

Tabela 8 Viabilidade do agente bioprotetor (10^4 x UFC/mL) em função do tempo de estocagem na presença de sais.

Formulações	Tempo (Dias)				
	0	30	60	90	120
1	33Ca	27 Ca	1,4Bb	0,7Ab	0Ad
2	32 Ca	18Db	3,4Bc	0,2Ac	0Ad
3	28Ca	28Ca	11Ab	0,03Ac	0Ad
4	74Ba	39Ba	1,2Bb	1,3Ab	0Ac
5	42Ba	36Ba	6,2Bb	0,5Ab	0Ac
C	92Aa	83Ab	7,2Bc	NA	NA
CV	21,44%				

*Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Scott-knot ao nível de 5% de probabilidade.

NA - Não Avaliado.

Araújo et al. (2000) pesquisaram o efeito da temperatura e da incorporação ao sal de uma formulação de alginato de sódio contendo o fungo *Arthrobotrys robusta* e identificaram que temperaturas mais altas do que 35° C e o armazenamento em sal mineral diminuía o crescimento do fungo.

Corroborando os resultados encontrados neste trabalho, Garcia (2007), estudando o processo de liofilização como meio de preservação e a sobrevivência de uma cepa autóctone de *Arthrobotrys musiformis* após incorporação em sal e sal mineral, e observou que quando misturado ao sal comum e sal mineral, os períodos de sobrevivência do fungo também reduziram.

Na Tabela 9 estão representados os teores de umidade dos tratamentos ao longo do tempo.

Tabela 9 Teor de umidade (%) durante período de estocagem na presença de sais.

Formulações	Tempo (Dias)			
	0	30	60	90
1	4,01Bd	6,47Bc	9,34Bb	12,98Ba
2	4,24Bd	5,05Cc	8,7Bb	14,08Ba
3	3,70Bd	7,83Ac	9,57Bb	13,29Ba
4	3,97Bd	6,27Ac	10,11Bb	15,3Aa
5	3,92Bd	7,94Ac	9,78Bb	11,22Ca
C	5,54Ac	8,14Ab	10,9Aa	NA
CV	4,16%			

*Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Scott-knot ao nível de 5% de probabilidade.

Observa-se na Tabela 9 um expressivo ganho de umidade ao longo do tempo, o que indica que a embalagem utilizada não foi satisfatória, apresentando vedação contra umidade inapropriada. Frente às informações obtidas, mostraram-se necessários maiores estudos para se verificar a real contribuição do teor de umidade e da presença de sais sobre a viabilidade do agente bioprotetor.

Com relação ao pH, o tratamento 3 foi o que apresentou maior valor, sendo o pH de menor valor o 1 (Tabela 10).

Tabela 10 Médias do pH nas diferentes matrizes de imobilização armazenados na presença de sais.

Formulações	pH
1	5,21C
2	5,23C
3	6,08A
4	5,25 C
5	5,33C
C	5,33B
CV	5,99%

*Médias seguidas pela mesma letra maiúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-knot ao nível de 5% de probabilidade.

De maneira geral, observa-se a partir da Tabela 11 que o pH aumentou moderadamente a partir do tempo 30.

Tabela 11 Médias do pH ao longo do tempo armazenados na presença de sais.

Tempo	pH
0	5,18B
30	5,45A
60	5,48A
90	5,69A
CV	5,99%

*Médias seguidas pela mesma letra maiúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-knot ao nível de 5% de probabilidade.

5 CONCLUSÕES

- ✓ O método de cultivo empregado apresentou um bom rendimento de esporos por litro, entretanto o tempo de cultivo ainda é relativamente alto;
- ✓ A extração de esporos do arroz em meio líquido mostrou-se uma técnica promissora para elaboração de formulações com concentrações específicas;
- ✓ As formulações desenvolvidas nesta pesquisa apresentaram alta resistência ao processo de secagem por liofilização, com destaque para a formulação 4 a base de Vixil S, glicerol e leite em pó desnatado.
- ✓ O processo de secagem em estufa a 35°C não foi adequado para a secagem das matrizes em forma de gel, causando 100% de inativação celular;
- ✓ O presente estudo mostrou que o processo de liofilização e a incorporação de materiais encapsulantes são de grande potencial para melhoria da estabilidade de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries;
- ✓ As formulações liofilizadas, mesmo tendo aumentando os teores de umidade ao longo do tempo mostraram viabilidade satisfatória a 150 dias de armazenamento.
- ✓ A mistura das formulações com sais apresenta viabilidade até 90 dias;
- ✓ O teor de umidade dos tratamentos aumentou de forma bastante expressiva ao longo do tempo com ou sem a presença de sais, indicando que as condições de manipulação e armazenamento não foram adequadas;
- ✓ Com exceção do Controle e da Formulação 5, ambas à base de arroz, todas as demais formulações apresentaram solubilidade adequada.
- ✓ A Microscopia Eletrônica de Varredura deixou claro as diferenças entre os tratamentos com e sem a adição de componentes microencapsulantes, onde no segundo caso o fungo fica exposto e visível.

- ✓ O método utilizado na secagem das microcápsulas é tão importante quanto os materiais de imobilização para promover proteção ao agente bioprotetor da qualidade do café.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sugestões para estudos futuros:

- ✓ Avaliar o potencial de biodegradação das matrizes de imobilização utilizadas;
- ✓ Avaliar a vida de prateleira do fungo em embalagens contendo sachês de sílica gel e outros agentes anti-umectantes;
- ✓ Avaliar a relação de gases durante a estocagem;
- ✓ Avaliar o efeito da utilização de atmosfera modificada sobre o desenvolvimento do fungo;
- ✓ Determinar a relação ideal entre a concentração celular e a matriz de imobilização;
- ✓ Caracterizar a liberação e desenvolvimento do fungo em condições de campo nas diferentes matrizes;
- ✓ Avaliar a solubilidade e a viabilidade ao longo do tempo de armazenamento das formulações em diferentes pH's.

REFERÊNCIAS

ALVES, E. **Curso introdutório de microscopia eletrônica de varredura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2004. 43 p. (Texto acadêmico).

ALVES, S.B.; PEREIRA, R.M. Produção de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill em bandejas. **Ecosistema**, v.14, p.188-192, 1989.

ALVIM, I.D. **Produção e caracterização de micropartículas obtidas por spray drying e coacervação complexa e seu uso para alimentação de larvas de peixes**. Tese. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas, 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTRY. **Official métodos of analysis of the association of analitical chemistry**. 11. ed. Washington, 1990. 115 p.

BARTLETT, M.C. AND JARONSKI, S.T. (1988) **Mass production of entomogenous fungi for biological control of insects**. In: Burge, R.N. (ed.) Fungi in Biological Control Systems. Manchester University Press, New York, pp. 61–85.

BEMILLER, J.N. **Starch modification: challenges and prospects**. Starch/Stärke, v.49, n.4, p.31-127, 1997.

BRADLEY, C.A., BLACK, W.E., KEARNS, R. AND WOOD, P. **Role of production technology in mycoinsecticide development**. In: Leatham, G.F. (ed.) Frontiers in Industrial Mycology. Chapman & Hall, New York, pp. 160–173. 1992.

BURGES, H.D. **Formulation of mycoinsecticides**. In: Burges, H.D. (ed.) Formulation of Microbial Biopesticides: Beneficial Microorganisms, Nematodes and Seed Treatments. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 131–185. 1998.

BUTT, T.M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. **Fungal Biological Control Agents: Progress, Problems and Potential**. CABI Publishing, New York, USA, 2001.

CHAMPAGNE CP, MONDOU F, RAYMOND Y, ROY D. Effect of polymers and storage temperature on the stability of freeze-dried lactic acid bacteria. **Food Research International** v. 29, p. 555–562, 1996.

CARDOSO, F. S. N. **Produção de microencapsulados de amido com recobrimento em leite fluidizado**. Dissertação. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2000.

CARNEIRO, S. M. T. P. G.; SILVA, J. F. V.; CARNEIRO, R. G. Evaluation of four methods on the survival of *Paecilomyces lilacinus* and *Arthrobotrys oligospora*. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 20, n. 2, p. 63-67, 1996.

CARVALHO, S. **Pectinases produzidas por um agente biológico G088: extração e purificação**. 2007. 100 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CEFAR. Procedimentos para a conservação de microrganismos. **Informativo Cefar de Microbiologia**, Ano III - Ed. 14 - Mar/Abr/2006 – Circulação Bimestral.

CHEN, C.J., WU, J.W., LI, Z.Z., WANG, Z.X., LI, Y.W., CHANG, S.H., YIN, F.M., WANG, X.P., DAI, L.Y., TAO, L., ZHANG, Y.A., TANG, J., DING, S., DING, G.G., GAO, Z.H. AND TAN, Y.C. **Application of microbial pesticides in IPM**. In: Chen, C.J. (ed.) *Integrated Management of Pine Caterpillars in China*. China Forestry Publishing House, Beijing, pp. 214–308. 1990.

CHIBATA, I.; TOSA, T.; SATO, T. Methods of cell immobilization. In: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology* (Demain, A.L., Solomon, N.A., eds.). **American Society for Microbiology**, Washington, DC, p. 217-227, 1986.

CLERK, G.C. AND MADELIN, M.F. The longevity of conidia of three insect-parasitizing Hyphomycetes. **Transactions of the British Mycological Society** 48, 193–209. 1965.

DAOUST, R.A. AND ROBERTS, D.W. Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia: effect of temperature and relative humidity on conidial viability and virulence against mosquitoes. **Journal of Invertebrate Pathology** 41, 143–150. 1983.

DESAI, K.G.H.; PARK, H.J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, v.23, p.1361-1394, 2005.

DONBROW, M. **Microcapsules and nanoparticles in medicine and pharmacy**. Boca Raton, CRC Press, 1992, cap. 1, p. 1-13: Introduction and overview.

DORTA, B. AND ARCAS, J. Sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid-state fermentation with forced aeration. **Enzyme and Microbial Technology** 23, 501–505. 1998.

ELIZEI, V. G. **Avaliação da viabilidade de fungos encapsulados e armazenados em diferentes temperaturas**. 2009. 50p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

FARGUES, J., ROBERT, P.H. AND REISINGER, O. Formulation des productions de masse del'hyphomycète entomopathogène *Beauveria* en vue des applications phytosanitaires. **Annales de Zoologie Ecologie Animale** 11, 247–257. 1979.

FARIA, M. R.; MAGALHÃES, B. P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasi. **Biocologia Ciência & Desenvolvimento** - nº 22, setembro/outubro 2001.

FENG, M.G., POPRAWSKI, T.J. AND KHACHATOURIANS, G.G. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. **Biocontrol Science and Technology** 4, 3–34. 1994.

FITO, P. et al. Coupling of hydrodynamic mechanism and deformation relaxation phenomena during vacuum treatments en solid porous food-liquid systems. **Journal of Food Engineering**, Kidlington, v.21, p.229-249, 1996.

GARCIA, A. M. Sobrevivência e manutenção da atividade nematofágica do fungo *Arthrobotrys musiformis* submetido à liofilização. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1203-1206, jul./ago., 2007.

GOOSEN, M. E. A. **Applications of chitin and chitosan**. Technomic Publishing Company, Lancaster, 1996.

GOUIN S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science ; Technology**, v.15, p. 330-347, 2004.

HALLSWORTH, J.E. AND MAGAN, N. Manipulation of intracellular glycerol and erythritol enhances germination of conidia at low water availability. **Microbiology** 141, 1109–1115, 1995.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3. ed. São Paulo, 1985. 533 p.

JACKSON, L. S.; LEE, K. Microencapsulation and Food Industry, *Lebensmittel – Wissenschaft Technologie*, v. 24, p. 289 – 297, 1991.

JENKINS, N.E., HEVIEFO, G., LANGEWALD, J., CHERRY, A.J. AND LOMER, C.J. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol News and Information* 19, 21N-31N. 1998.

KAWAKAMI, K. AND MIKUNA, T. Effects of relative humidity and temperature on the viability of conidia of some muscardines. *Acta Sericologica* 56, 42–46, 1965.

KING, A.H. **Encapsulation of Food Ingredients:** A review of available technology, focussing on hydrocolloids, “ In: Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients, ACS Symposium Series 590, Ed. By Sara J. Risch and Gary A. Reineccius. American Chemical Society, Washington DC. Pp. 26 39. 1995.

LANE, B.S., TRINCI, A.P.J. AND GILLESPIE, A.T. Influence of cultural conditions on the virulence of conidia and blastospores of *Beauveria bassiana* to the green leafhopper, *Nephotettix virescens*. *Mycological Research* 7, 829–833, 1991.

MARCHAL, L.M.; BEEFTINK, H.H.; TRAMPER, J. Towards a rational design of commercial maltodextrins. *Trends in Food Science and Technology*, v.10, p. 345-355, 1999.

MATHEW, A. P.; OKSMAN, K.; SAIN, M. Mechanical properties of biodegradable composites from poly lactic acid (PLA) and microcrystalline cellulose (MCC). *Journal of Applied Polymer Science*, v. 97, p. 2014-2025, 2005.

MENDONÇA, A.F. **Mass production, application and formulation of *Metarhizium anisopliae* for control of sugarcane froghopper, *Mahanarva posticata*, in Brazil.** In: Lomer, C.J. and Prior, C. (eds) Biological Control of Locusts and Grasshoppers. CAB International, Wallingford, UK, pp. 239–244. 1992.

MILLER, D.W. **Commercial development of entomopathogenic fungi: formulation and delivery.** In: Hall, F.R. and Barry, J.W. (eds) Biorational Pest Control Agents: Formulation and Delivery. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 213–220. 1995.

MOFIDI, N.; AGHAL-MOGHADAM, M.; SARBOLOUKI, M. N. Mass preparation and characterization of alginate microspheres. **Process Biochem.**, v.35, p.885-888, 2000.

MOORE, D. AND HIGGINS, P.M. Viability of stored conidia of *Metarhizium flavoviride* Gams and Rozsypal, produced under differing culture regimes and stored with clays. **Biocontrol Science and Technology** 7, 335–343. 1997.

NALEPINA, L. N.; MATSKEVICH, N. V.; KOZHUKHAR, G. G.; TEPLYAKOVA, T. V. Effect of different methods on viability of nematophagous predatory fungi. **Mykologia I Fitopatologiya**, [S.l.], v. 24, n. 1, p. 312-314, 1990.

OLIVEIRA, V. M. de; SETTE, L. D.; FANTINI-GARBOGGINI, F. Preservação e prospecção de recursos microbianos. **MultiCiência**, v.7, p.1-19, 2006.

PASSOS, C.T. **Estudo da biodegradação do fenol por uma nova linhagem de *Aspergillus sp.*** 2006. 84f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande, 2006.

PEREIRA, J.K.N. **Isolamento e avaliação de diferentes concentrações de glicerol na criopreservação a -80 °c de bactérias associadas a organismos marinhos.** In: PQBA, UNICAMP, 2010.

PEREIRA, R. T. G.; PFENNING, L. H.; CASTRO, H. A. de. Caracterização e dinâmica de colonização de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) de vries em frutos do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 29, n. 6, Dec. 2005 .

PILKINGTON, P. H.; MARGARITIS, A.; MENSOUR, N. A.; RUSSEL, I. Fundamentals of immobilized yeast cells for continuous beer fermentation: A review. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 104, p. 19-31, 1998.

PLENCHETTE, C.; STRULLU, D. G. Long-term viability and infectivity of intraradical forms of *Glomus intraradices* vesicles encapsulated in alginate beads. **Mycol. Res.**,v.107, p.614-616, 2003.

RABÊLO, A. M. S. **Avaliação Da Secagem, Torrefação E Estabilidade Da Castanha De Pequi (*Caryocar brasiliense Camb.*).** 2007. Dissertação, Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO. 46p.

RÉ, M. I. Microencapsulation by Spray drying. **Drying Technology**, V. 16, n.6, p.1195 – 1236, 1998.

ROSENBERG, M.; TALMON, Y.; KOPELMAN, I. J. The microstructure of spray-dried microcapsules. **Food Microstructure**, v. 7, p. 15-23, 1988.

SAKAMOTO, M., INOUE, Y. AND AOKI, J. Effect of light on the conidiation of *Paecilomyces fumosoroseus*. **Transactions of the Mycological Society of Japan** 26, 499–509, 1985.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Q. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n.6, p. 501- 547, 1993.

SHAPIRO, M. Use of optical brighteners as radiation protectants for gypsy moth (*Lepidoptera: Lymantriidae*) nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Economic Entomology** 85, 1682–1686, 1992.

SHI, Z.M. **Technology for conidial preparation of *Beauveria bassiana***. In: Li, Y.W., Li, Z.Z., Liang, Z.Q., Wu, J.W., Wu, Z.K. and Xu, Q.F. (eds) Study and Application of Entomogenous Fungi in China, Vol. 1. Academic Periodical Press, Beijing, pp. 114–115, 1988.

SILVA, G.O.; TAKIZAWA, F.F.; PEDROSO, R.A.; FRANCO, C.M.L.; LEONEL, M.; SARMENTO, S.B.S.; DEMIATE, I.M. Características físico-químicas de amidos modificados de grau alimentício comercializados no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 188-197, 2006.

VIEIRA, B. A. H. Como Utilizar a Câmara de Neubauer. Disponível em: <http://starmedia.orbita.com/~bervieira>. Acesso em: 29 de dezembro de 2007.

WANG, Y. J. Development of new polycations for cell encapsulation with alginate. **Materials Science Engineering C**, v.13, p.59-63, 2000.

WARD, M.G. AND ROBERTS, D.W. **Viability of *Beauveria bassiana* conidia stored with formulation carriers and diluents**, In: Society for Invertebrate Pathology Program and Abstracts, Bozeman, Montana. Society for Invertebrate Pathology, Raleigh, North Carolina, pp. 30–31. 1981.

WRAIGHT, S.P. AND CARRUTHERS, R.I. **Production, delivery, and use of mycoinsecticides for control of insect pests of field crops**. In: Hall, F.R. and Menn, J.J. (eds) Methods in Biotechnology, Vol. 5: Biopesticides: Use and Delivery. Humana Press, Totowa, New Jersey, pp. 233–270. 1999.