

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

THAINÁ RODRIGUES SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES
MULTIPARTICULADAS CONTENDO MICROESCLERÓDIOS DO
FUNGO *Metarhizium anisopliae* PARA CONTROLE BIOLÓGICO**

GOIÂNIA

2016

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação


Nome completo do autor: Thainá Rodrigues Santos

Título do trabalho: Desenvolvimento de formulações multiparticuladas contendo microescleródios do fungo *Metarhizium anisopliae* para controle biológico

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do (a) autor (a)

Data: 08 / 03 / 2017

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

THAINÁ RODRIGUES SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES
MULTIPARTICULADAS CONTENDO MICROESCLERÓDIOS DO
FUNGO *Metarhizium anisopliae* PARA CONTROLE BIOLÓGICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Neves Marreto

**Co-orientador: Prof. Dr. Éverton Kort Kamp
Fernandes**

GOIÂNIA

2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Santos, Thainá Rodrigues

Desenvolvimento de formulações multiparticuladas contendo microescleródios do fungo *Metarhizium anisopliae* para controle biológico [manuscrito] / Thainá Rodrigues Santos. - 2016.
75 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Neves Marreto; co-orientador Prof. Dr. Éverton Kort Kamp Fernandes.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Goiânia, 2016.

Bibliografia.

Inclui gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. fungo entomopatogênico. 2. pellets. 3. armazenamento. 4. UV
B. I. Marreto, Ricardo Neves, orient. II. Título.

CDU 615.1



Ministério da Educação
Universidade Federal de Goiás
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



ATA DA SEÇÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aluno (a): Thainá Rodrigues Santos

Orientador (a): Prof. Dr. Ricardo Neves Marreto

Título da Dissertação: "Desenvolvimento de formulações multiparticuladas contendo microescleródios do fungo *Metarhizium anisopliae* para controle biológico".

Data: 23 de setembro de 2016

Horário: 08:30 horas

Local: sala de aula do programa/anexo II da Faculdade de Farmácia

Sugestões*:

*Obs: sugestão de alteração de título da dissertação deve ser acompanhada de justificativa.

Parecer da Banca Examinadora

Membro	Aprovado/R eprovado	Assinatura
Prof. Dr. Ricardo Neves Marreto (FF/UFG) - Presidente	Aprovado	<i>Ricardo Neves Marreto</i>
Profa. Dra. Stephânia Fleury Taveira (FF/UFG)	Aprovado	<i>Stephânia Fleury Taveira</i>
Prof. Dr. Caio Márcio de Oliveira Monteiro (IPTSP/UFG)	Aprovado	<i>Caio Márcio de Oliveira Monteiro</i>
Dr. Gabriel Moura Mascarin (EMBRAPA) - Suplente		

Parecer Final	Aprovado/Reprovado	<i>Aprovado</i>
----------------------	---------------------------	-----------------

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre iluminar meus caminhos, guiar meus passos, dar sabedoria e acalmar meu coração nos momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Ricardo Neves Marreto, por aceitar a missão de me orientar com dedicação e paciência frente ao desafio que este trabalho representou ao longo de todo o seu desenvolvimento.

Aos meus pais, Harley e Sirlene, e ao meu irmão Rafael, por serem meu exemplo e meu ponto de apoio. Obrigada por todo suporte, paciência e amor. E aos meus familiares, por vibrarem comigo a cada conquista.

Às amigas que há tanto tempo me apoiam e incentivam, Anne Caroline, Andréa, Kamilla, Laís, Lara e Laura.

Aos amigos que me acompanharam nessa jornada, e que por todo companheirismo, respeito, experiências e conhecimentos compartilhados se tornaram a Família Sólidos: Aline Carlos, André Luiz, Carolina, Ellen Cristine, Letícia, Luís Antônio e Raphael.

À toda a equipe do FarmaTec, e em especial, Emílio, Lílian, Maiulle, Marilisa, Percília e Relton, que ajudaram a tornar mais leves os dias de trabalho.

À querida Fernanda Bellato, por toda a disposição em ajudar, seja no desempenho de sua função ou através de suas palavras de conforto.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Éverton Fernandes, ao Dr. Gabriel Mascarin e ao Prof. Dr. Christian Luz, pelas valiosas contribuições durante todas as fases de desenvolvimento deste trabalho e por me concederem o privilégio de aprender tanto com vocês.

À equipe do Laboratório de Patologia de Invertebrados, por ter me acolhido, me ajudado e me ensinado tanto. Em especial, agradeço à Flávia, Alaine, Ronaldo, Elen, Marcos, Lucas e Cyntia.

À Universidade Federal de Goiás, instituição na qual estou desde a graduação e me proporcionou conhecer e adentrar o mundo da ciência. E à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

Introdução e objetivo: *Metarhizum anisopliae* é uma das espécies de fungos entomopatogênicos mais estudadas em controle biológico por estar naturalmente associada a carrapatos e por apresentar alta virulência em condições laboratoriais. *M. anisopliae* é capaz de, sob condições *in vitro*, formar uma estrutura de resistência denominada microescleródio (ME). Os microescleródios têm-se mostrado mais eficazes do que produtos à base de conídios, quando aplicados diretamente ao solo para o controle de algumas pragas. Assim, o objetivo do presente trabalho consistiu em desenvolver e caracterizar formulação inorgânica peletizada contendo microescleródios de *M. anisopliae* IP119, avaliar sua estabilidade sob armazenamento a 4°C e a 40°C, e determinar sua tolerância à radiação UV-B. **Métodos:** Foram desenvolvidas e avaliadas seis formulações de pellets compostas por terra diatomácea, vermiculita, silicato de alumínio e magnésio ou dióxido de silício coloidal, de forma isolada ou em combinação. Os pellets foram obtidos pela técnica de extrusão-esferonização e a secagem foi realizada em leito fluidizado com temperatura do ar de saída mantida a 40°C ou 50°C. Durante a secagem, em intervalos pré-determinados de tempo, amostras foram coletadas para avaliação da umidade residual, produção e viabilidade de conídios. Além disso, avaliou-se a produção e a viabilidade de conídios após armazenamento dos pellets por 7 a 21 dias. Para a avaliação da tolerância de conídios e pellets contendo ME frente a radiação UV-B, os materiais foram expostos por até 4 horas (irradiância de 541,54 mW/m²) ou 12 horas (irradiância de 1239,23 mW/m²), respectivamente. **Resultados e Discussão:** Pellets com constituintes totalmente inorgânicos foram obtidos e a formulação selecionada foi àquela composta por vermiculita, terra diatomácea e dióxido de silício coloidal (78:20:2), que apresentou características de rendimento (48%), distribuição de tamanho (431,5 a 758,5 µm), tamanho médio (584,90 µm ± 122,40) e esfericidade (0,75 ± 0,07) adequados. Houve redução considerável da umidade residual entre o tempo 0 (~29%) e 5 minutos de secagem (~6%), e a umidade residual permaneceu estável até o final da operação. Dessa forma, a secagem dos pellets pelo período de 5 minutos a 40°C ou a 50°C se mostrou satisfatória. Além disso, os pellets selecionados e secos por leito fluidizado apresentaram produção de conídios sempre superior a 1,7x10⁹ conídios/g de pellets, e a viabilidade dos mesmos foi maior do que 93%, em todos os tempos analisados e para ambas as temperaturas. Houve contaminação dos pellets sob armazenamento a 40°C após o 7º dia de ensaio, sem diferença de produção (~1,3x10⁹ conídios/g de pellets) e de viabilidade (>94%) dos conídios. Já na temperatura de 4°C, a produção e a viabilidade dos conídios permaneceram estáveis até o 21º dia de armazenamento. No ensaio de tolerância à radiação UV-B, a DL50 estimada para os conídios de *M. anisopliae* foi de 5,545 ± 0,059 (kJ/m²), ao passo que para os pellets contendo microescleródios foi observada a manutenção da germinação (>98%) e uma elevada produção de conídios (>1,6x10⁹ conídios/g de pellets). **Conclusão:** No presente trabalho, foi possível obter, pela técnica de extrusão-esferonização, pellets inorgânicos contendo material fúngico, com manutenção da viabilidade fúngica após secagem e alta tolerância à radiação UV-B, representando grande potencial para uso no controle biológico de artrópodes-praga.

Palavras-chave: fungo entomopatogênico, pellets, armazenamento, UV-B

ABSTRACT

Introduction and objective: *Metarhizium anisopliae* is one of the most studied fungi for biological control, since it is found naturally associated with ticks and has showed high virulence in laboratory conditions. *M. anisopliae* can form *in vitro* an overwintering structure called microsclerotia (MS). The microsclerotia have been shown to be more effective than products based on conidia when applied directly to the soil for control of some pests. Thus, the objective of this study was to develop and characterize inorganic pelletized formulations containing microsclerotia of *M. anisopliae* IP119, assess its stability under storage at 4°C and 40°C and determine its tolerance to UV-B radiation.

Methods: Six pellets formulations composed of diatomaceous earth, vermiculite, aluminum magnesium silicate or colloidal silicon dioxide, alone or in combination, were developed and evaluated. The pellets were obtained using the extrusion-spheronization technique and were dried in a fluid-bed dryer with an outlet air temperature kept at 40°C or 50°C. During drying, at pre-determined time intervals, samples were collected for evaluation of the residual moisture content, conidia production and viability. The pellets were also evaluated for their storage stability at 4°C and 40°C. Conidia production and viability were evaluated after storage periods of 7 to 21 days. In addition, UV-B tolerance of the conidia and pellets containing MS was evaluated by exposing them to the artificial light for 4h (irradiance of 541,54 mW/m²) and 12h (irradiance of 1239,23 mW/m²), respectively.

Results and Discussion: Inorganic pellets were obtained and the selected formulation was composed by vermiculite, diatomaceous earth and colloidal silicon dioxide (78:20:2), since it showed the best yield (48%), size distribution (from 431.5 to 758.5 µm), average size (584.90 µm ± 122.40) and sphericity (0.75 ± 0.07). There was a considerable reduction of the residual moisture between time 0 (~29%) and 5 minutes (~6%), which remained stable until the end of drying operation. Thus, pellet drying for a 5 minutes period at 40°C or 50°C resulted in a proper moisture content. Fluid-bed dried pellets presented conidia production always above 1.7x10⁹ conidia/g pellets, with viability > 93%, at all times and for both temperatures. In the pellet storage at 40°C, a contamination was observed after the 7th storage day, without differences in conidia production (~1.3x10⁹ conidia/g of pellets) and viability (> 94%). At 4°C, the conidia production and viability remained stable until the 21th storage day. Regarding the tolerance to UV-B radiation test, the calculated LD50 of *M. anisopliae* conidia was 5.545 (kJ/m²) ± 0.059. In the exposed pellets containing microsclerotia germination was >98%, and it was observed high conidia production (>1,6x10⁹ conidia/g of pellets).

Conclusion: It can be concluded that the inorganic formulation allow to obtain pellets containing fungal material by extrusion-spheronisation technique with maintenance of fungal viability after drying, resulting in a formulation with high UV-B tolerance. This solid platform has a great potential for use in pest biological control.

Keywords: entomopathogenic fungi, pellets, storage, UV-B

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Desenvolvimento de pellets contendo adjuvantes inorgânicos sem material fúngico.....	42
Tabela 2. Distribuição de tamanho, tamanho médio, esfericidade e rendimento dos pellets referentes às formulações desenvolvidas sem material fúngico.....	51
Tabela 3. Caracterização de meios de cultura líquidos (MASCARIN et al., 2014) contendo microescleródios de <i>M. anisopliae</i> IP 119.....	55
Tabela 4. Caracterização dos pellets contendo microescleródios de <i>M. anisopliae</i> IP 119.....	56
Tabela 5. Tempo de exposição, dose e germinação relativa referentes ao ensaio de tolerância de conídios de <i>M. anisopliae</i> IP119 expostos à UV-B [irradiância de 541,54 mW/m ² segundo Quaitte et al. (1992)].....	61
Tabela 6. Tempo de exposição, dose e germinação relativa de conídios referentes ao ensaio de tolerância de pellets contendo microescleródios de <i>M. anisopliae</i> IP119 expostos à UV-B [irradiância de 1239,23 mW/m ² segundo Quaitte et al. (1992)].....	63

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. *Rhipicephalus microplus*: fêmea ingurgitada (posição ventral) e macho (posição dorsal) 15
- Figura 2. Ciclo de vida do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. (1) Larva infectando o animal; (2) Fêmea iniciando o repasto sanguíneo; (3) Fêmea totalmente ingurgitada; (4) Fêmea ingurgitada no solo, após o desprendimento do animal; (5) Ovos de carrapato; (6) Larvas de carrapato prontas para infectar o hospedeiro 17
- Figura 3. Colônia de *Metarhizium anisopliae* em meio de cultura completo (MCc), após 21 dias a 28°C (A). As micrografias apresentam as estruturas do conidióforo (B) e dos conídios cilíndricos (C) 22
- Figura 4. Fases da infecção por *Metarhizium anisopliae* em carrapato: (1) Adesão do conídio a cutícula. (2) Germinação do conídio. (3) Diferenciação do tubo germinativo em apressório. (4) Penetração da cutícula. (5) Diferenciação das hifas em blastosporos. (6) Colonização. (7) Emergência das hifas para a superfície do hospedeiro. (8) Cadáver coberto por conídios e conidióforos. CO: Conídio, GT: Tubo germinativo, AP: Apressório, H: Hifa, d: dias, h: horas 23
- Figura 5. Microescleródio de *Metarhizium anisopliae* após 4 dias de crescimento em meio de cultura líquido 26
- Figura 6. Representação gráfica da formação dos pellets dentro do esferonizador durante a operação. (A) movimento em corda do produto; (B) atrito com a parede lisa 32
- Figura 7. Mecanismos de formação de pellets na etapa de esferonização. A - Mecanismo proposto por Rowe, em 1985: (I) cilindro, (II) cilindro de extremidades arredondadas, (III) haltere, (IV) elipse, (V) esfera. B - Mecanismo proposto por Baert, Remon, em 1993: (I) cilindro, (II) corda, (III) haltere com torção central, (IV) esfera com cavidade, (V) esfera..... 33
- Figura 8. Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura mostrando a estruturação da terra diatomácea. Presença de uma estrutura morfológica bem definida, com a presença de poros que proporcionam uma elevada capacidade de absorção ou filtração..... 36
- Figura 9. Estrutura cristalina da vermiculita. Formada por duas folhas tetraédricas, intercaladas por uma folha octaédrica. No espaço interlamelar encontram-se os íons trocáveis..... 37
- Figura 10. Espectro de irradiação após passagem da luz por filme de diacetato de celulose na câmara de tratamentos com UV-B. A radiação ultravioleta produzida pelas lâmpadas fluorescentes corresponde a irradiância de 541,54 mW/m² segundo espectro de ação estabelecido por Quaite et al. (1992) 47

- Figura 11. Espectro de irradiação após passagem por filme de diacetato de celulose na câmara de tratamentos com UV-B. A radiação ultravioleta produzida pelas lâmpadas fluorescentes corresponde a irradiância de 1239,23 mW/m² segundo espectro de ação estabelecido por Quaite et al. (1992) 48
- Figura 12. Esfericidade de pellets de diferentes formulações inorgânicas. Valores de esfericidade variam entre 0 e 1. Letras iguais indicam que não há diferença estatística entre as médias (Teste de Tukey (P<0,05)). Pontos referem-se às leituras da esfericidade, enquanto que as médias seguidas dos desvios-padrões estão representadas pelo ponto e segmento em vermelho, respectivamente 52
- Figura 13. Fotomicrografias dos pellets obtidos referentes às formulações desenvolvidas F3, F4, F5 e F6. Aumento de 0,63x 53
- Figura 14. Conteúdo de umidade residual de pellets F6 contendo microescleródios de *M. anisopliae* IP 119 submetidos à operação de secagem em leito fluidizado a 40°C e a 50°C. Teste de Tukey (P<0,05) 56
- Figura 15. Avaliação do processo de secagem em leito fluidizado a 40°C e a 50°C de pellets da formulação F6 contendo microescleródios – Avaliação da produção de conídios por grama de pellets 58
- Figura 16. Estabilidade de armazenamento de pellets contendo microescleródios de *M. anisopliae* IP119 armazenados a 4°C e a 40°C. (A) Produção de conídios; (B) Viabilidade de conídios. Letras iguais indicam que não há diferença estatística entre as médias. ANOVA e Teste de Tukey (P<0,05) 59
- Figura 17. Curva de tolerância à radiação UV-B de conídios de *M. anisopliae* IP119 expostos a doses crescentes de radiação UV-B em condições laboratoriais. A curva foi ajustada pelo modelo de Weibull com três parâmetros, o qual pode ser descrito como: $y = 97,92 * \exp(-\exp(5,72(\log(x) - \log(5,91))))$ 62
- Figura 18. Produção de conídios a partir de pellets contendo microescleródios de *M. anisopliae* expostos à radiação UV-B [1239,23 mW/m² segundo Quaite et al. (1992)] 64

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1.	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	15
2.1.1.	<i>O CARRAPATO E SUA IMPORTÂNCIA ECONÔMICA</i>	15
2.1.2.	<i>CICLO BIOLÓGICO DE Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	16
2.1.3.	<i>FORMAS DE CONTROLE</i>	18
2.2.	O fungo entomopatogênico <i>Metarhizium anisopliae</i>	21
2.2.1.	<i>ASPECTOS GERAIS</i>	21
2.2.2.	<i>MECANISMO DE INFECÇÃO</i>	22
2.3.	Microescleródio	25
2.4.	Formulações	27
2.5.	Pellets e sua obtenção pela técnica de extrusão-esferonização	30
2.5.1.	<i>PELLETS: CARACTERÍSTICAS GERAIS</i>	30
2.5.2.	<i>OBTENÇÃO DE PELLETS PELA TÉCNICA DE EXTRUSÃO-ESFERONIZAÇÃO</i>	31
2.5.3.	<i>ADJUVANTES UTILIZADOS NA OBTENÇÃO DE PELLETS</i>	33
2.5.4.	<i>ADJUVANTES INORGÂNICOS NO DESENVOLVIMENTO DE PELLETS POR EXTRUSÃO-ESFERONIZAÇÃO</i>	35
3	OBJETIVOS	39
3.1.	Objetivo geral	39
3.2.	Objetivos específicos	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1.	Materiais	40
4.1.1.	<i>SUBSTÂNCIAS E MATÉRIAS-PRIMAS</i>	40
4.1.2.	<i>EQUIPAMENTOS</i>	40
4.2.	Métodos	41
4.2.1.	<i>ISOLADO FÚNGICO, CULTIVO DE CONÍDIOS E PREPARO DO INÓCULO</i>	41
4.2.2.	<i>PRODUÇÃO DE MICROESCLERÓDIOS</i>	41
4.2.3.	<i>DESENVOLVIMENTO DOS PELLETS SEM MICROESCLERÓDIOS</i>	42
4.2.4.	<i>DESENVOLVIMENTO DE PELLETS CONTENDO MICROESCLERÓDIOS</i>	43
4.2.5.	<i>SECAGEM DOS PELLETS CONTENDO MICROESCLERÓDIOS</i>	44

4.2.6.	<i>DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE UMIDADE RESIDUAL NOS PELLETS</i>	44
4.2.7.	<i>MORFOLOGIA E ESFERICIDADE DOS PELLETS</i>	44
4.2.8.	<i>DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DOS PELLETS</i>	45
4.2.9.	<i>AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO E VIABILIDADE DE CONÍDIOS PRODUZIDOS A PARTIR DE PELLETS CONTENDO MICROESCLERÓDIOS.</i>	45
4.2.10.	<i>ESTABILIDADE DE ARMAZENAMENTO</i>	46
4.2.11.	<i>TOLERÂNCIA DE CONÍDIOS DE <i>M. anisopliae</i> À RADIAÇÃO UV-B.</i>	46
4.2.12.	<i>TOLERÂNCIA DE PELLETS CONTENDO MICROESCLERÓDIOS DE <i>M. anisopliae</i> À RADIAÇÃO UV-B</i>	48
4.2.13.	<i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i>	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1.	Desenvolvimento dos pellets sem microescleródios	51
5.2.	Desenvolvimento de pellets contendo microescleródios	54
5.3.	Avaliação do processo de secagem em leito fluidizado a 40°C e 50°C	56
5.4.	Estabilidade de armazenamento.....	58
5.5.	Tolerância de conídios de <i>M. anisopliae</i> à radiação UV-B	60
5.6.	Tolerância de pellets contendo ME de <i>M. anisopliae</i> à radiação UV-B.....	63
6	CONCLUSÕES	65
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

1 INTRODUÇÃO

Pesticidas químicos têm sido utilizados há mais de 60 anos como a principal ferramenta para o controle de insetos e pragas (JACKSON, JARONSKI, 2009). Embora a utilização desses produtos contribua significativamente no controle de pragas, fatores como o alto custo, aumento na poluição ambiental, seleção de indivíduos resistentes (RIBEIRO et al., 2010) e a permanência de resíduos desses produtos em alimentos têm despertado a atenção para o desenvolvimento e aprimoramento de *métodos* alternativos de controle, incluindo o controle biológico (CHANDLER et al., 2000; FERNANDES, BITTENCOURT, ROBERTS, 2012; CAMARGO et al., 2014)

O controle biológico consiste na redução de uma população de artrópodes-praga pela utilização de predadores, parasitas ou patógenos de ocorrência natural (DALZOTO, UHRY, 2009). Dentre os artrópodes-praga, por exemplo, encontram-se: pulgão lanígero *Eriosoma lanigerum* (Hemiptera, Aphididae), broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Coleoptera, Scolytidae), mosca-do-mediterrâneo *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae), mariposa oriental *Grapholita molesta* (Lepidoptera, Tortricidae), cochonilha-dos-pastos *Antonina graminis* (Hemiptera, Pseudococcidae), broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Crambidae), moscas-das-frutas (Diptera, Tephritidae), traça-do tomate – *Tuta absoluta* (Lepidoptera, Gelechiidae) (PARRA et al., 2002; SILVA, BRITO; 2015), cigarrinhas da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (DALZOTO, UHRY, 2009) e os carrapatos *Dermacentor nitens*, *Amblyomma variegatum*, *Rhipicephalus sanguineus* e *Rhipicephalus microplus* (FERNANDES, BITTENCOURT, ROBERTS 2012).

A infestação do rebanho bovino pelo carrapato do boi, *R. microplus*, tem causado enormes prejuízos à agropecuária brasileira, resultando em perdas de cerca de 3 bilhões de dólares anuais relacionadas à redução da produção de carne, leite e couro, e à transmissão de agentes patogênicos aos animais parasitados, além dos custos com o tratamento dos animais (GRISI et al., 2014; KASSAB et al., 2011). O *R. microplus* possui ciclo de vida monóxeno, que pode ser dividido em duas fases: fase não parasitária e fase parasitária (ANGELO, BITTENCOURT, 2013). A fase não parasitária ocorre no solo e tem início quando a fêmea ingurgitada se desprende do hospedeiro para o período de postura dos ovos. A fase de vida parasitária inicia-se com a fixação da larva infectante no

hospedeiro, seguida por sua alimentação, troca de cutícula, fase de ninfa, ingurgitamento, muda, fase adulta, acasalamento, ingurgitamento e queda das fêmeas (FURLONG, 2005).

O controle biológico desse artrópode usando espécies de fungos entomopatogênicos tem se mostrado promissor (ATHAYDE, FERREIRA, LIMA, 2001; JACKSON, JARONSKI, 2009; FERNANDES, BITTENCOURT, ROBERTS, 2012; CAMARGO et al., 2014). Muitos fungos entomopatogênicos estão naturalmente associados a carrapatos e alguns deles têm demonstrado alta virulência em condições laboratoriais, sendo *Metarhizium anisopliae* uma das espécies mais investigadas (ANGELO, BITTENCOURT, 2013). As espécies do gênero *Metarhizium* são cosmopolitas, podendo ser encontradas no solo, em cadáveres de insetos e na rizosfera de plantas (MEYLING, EILENBERG, 2007). Tais fungos geralmente infectam seus hospedeiros através de conídios que se fixam para germinar e penetrar a cutícula, depois se multiplicam na hemocele do hospedeiro causando a morte deste (FERNANDES, BITTENCOURT, 2008). Sob condições favoráveis, o fungo esporula extensivamente sobre o cadáver do artrópode para facilitar novas infecções na população de hospedeiros e assim continuar seu ciclo (CHANDLER et al., 2000).

O conídio é a forma infectiva mais utilizada e investigada na produção de micopesticidas (FARIA, WRAIGHT, 2007). No entanto, outros propágulos fúngicos têm sido investigados recentemente para produção de biopesticidas, como, por exemplo, os microescleródios (ME), que são aglomerados quitinizados de hifas formando uma estrutura de resistência do micro-organismo (JACKSON, JARONSKI, 2009). Para o controle de determinados artrópodes, os microescleródios têm-se mostrado mais eficazes do que produtos à base de conídios, quando aplicados diretamente ao solo (JARONSKI, JACKSON, 2008; JACKSON, JARONSKI, 2009).

Suspensões oleosas e/ou aquosas contendo propágulos fúngicos são as formulações mais utilizadas para o controle biológico de pragas (ANGELO et al., 2010; ÁNGEL-SAHAGÚN et al., 2010), contudo, tais formulações líquidas dificilmente são distribuídas homoganeamente na matriz do solo. Uma vez que as fêmeas ingurgitadas do carrapato-do-boi procuram ambientes com microclima úmido no solo para realizar a postura dos ovos, o desenvolvimento de formulações granulares (multiparticuladas) com base em microescleródios pode ser vantajosa, pois esse material pode ser distribuído de forma uniforme e, uma vez no solo, pode atuar como um foco de produção constante de conídios infectantes, garantindo que os artrópodes que passem por aquele local se contaminem com conídios (JACKSON, JARONSKI, 2009).

Dentre os sistemas multiparticulados encontram-se os pellets, que consistem em pequenas unidades esféricas formadas a partir da aglomeração de pós finos, sendo produzidos, principalmente, pelo método de extrusão-esferonização. Os pellets têm despertado crescente interesse em diversos segmentos industriais devido às suas diversas vantagens tecnológicas, tais como seu escoamento uniforme e elevado, estreita distribuição de tamanho de partículas e incorporação de grande quantidade de ativo (SANTOS et al., 2006).

Dentre os adjuvantes que podem ser empregados na obtenção de pellets por extrusão-esferonização, a celulose microcristalina é considerada como sendo padrão-ouro por conferir propriedades reológicas adequadas à massa úmida, resultando em unidades com boa esfericidade, friabilidade reduzida e alta densidade (DUKIĆ-OTT et al., 2007; DUKIĆ-OTT et al., 2009; CHAMSAI, SRIAMORNSAK, 2013). Contudo, a baixa taxa de desintegração da celulose microcristalina pode limitar seu uso, implicando na escolha de outros adjuvantes, tais como outros biopolímeros, polímeros sintéticos e lipídios (DUKIĆ-OTT et al., 2009).

Relatos sobre o preparo de pellets com o uso exclusivo de adjuvantes inorgânicos não estão disponíveis na literatura, no entanto, alguns materiais inorgânicos de baixo custo de aquisição são promissores para este fim. É o caso da terra diatomácea, da vermiculita, do silicato de alumínio e magnésio e do dióxido de silício coloidal. A terra diatomácea se apresenta como material pulveréneo proveniente de fósseis de algas unicelulares, que apresenta conhecida atividade inseticida (KURÓNIC, 2013). A vermiculita, por sua vez, é um argilomineral pertencente à família das micas, que possui propriedades de plasticidade e adsorção (CURBELO, 2002). O silicato de alumínio e magnésio é composto por uma mistura de saponitas e montmorilonitas e pode ser utilizado como agente aglutinante (ROWE, SHESKEY, QUINN, 2009). Já o dióxido de silício coloidal é amplamente utilizado como agente deslizante e absorvente (ARAÚJO JÚNIOR, 2011).

É importante ressaltar que, conforme apresentado acima, a ausência de estudos na literatura sobre o desenvolvimento de formulações peletizadas totalmente inorgânicas para controle biológico, além do fato de que o uso de microescleródios para tal finalidade tem sido pouco investigado, justificam o desenvolvimento de pellets inorgânicos contendo microescleródios de *M. anisopliae*, como uma abordagem de caráter original e com potencial para o controle biológico de artrópodes-praga que possuam em seu ciclo biológico uma fase de vida não parasitária. Mais especificamente, é importante

desenvolver pellets capazes de proteger as estruturas fúngicas da ação deletéria da radiação solar após a aplicação e que, adicionalmente, garantam a estabilidade dos fungos durante o armazenamento. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver, caracterizar e avaliar pellets inorgânicos contendo microescleródios de *M. anisopliae*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

2.1.1. O CARRAPATO E SUA IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Figura 1), foi inicialmente descrito por Canestrini em 1888, sendo popularmente conhecido como carrapato-do-boi ou carrapato dos bovinos. É um ectoparasita hematófago pertencente ao filo Arthropoda, classe Arachnida, ordem Ixodida, subordem Metastigmata e a família Ixodidae (ANGELO, BITTENCOURT, 2013; VERÍSSIMO, 2013). Em 2003, após estudos filogenéticos, o gênero *Boophilus* (Curtice, 1891) foi reclassificado como um subgênero do gênero *Rhipicephalus* (Koch, 1844) e a espécie conhecida por *Boophilus microplus* passou a ser denominada *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (MURREL, BARKER, 2003).

Figura 1. *Rhipicephalus microplus*: fêmea ingurgitada (posição ventral) e macho (posição dorsal)



Fonte: MUNIZ, 2015

Acredita-se que *R. microplus* seja originário do continente asiático, mais precisamente da Índia e Ilha de Java, tendo surgido no período terciário, através da evolução de parasitos primitivos de répteis do período paleolítico (HOOGSTRAAL, WASSEF, 1985; FRANQUE, 2007). Sua introdução nos demais países, com destaque para àqueles tropicais, onde as condições ideais de temperatura e umidade garantem a manutenção e sobrevivência da espécie (GARCIA, 2009), se deve à importação do gado asiático. Essa espécie encontra-se distribuída entre os paralelos 32° N e 32° S, e afeta os rebanhos bovinos das Américas Central e do Sul, África e Ásia (ESTRADA-PENÑA et al., 2006), sendo responsável por grandes perdas econômicas na pecuária brasileira.

No Brasil, a agropecuária é um segmento de elevada importância econômica, contando com mais de 210 milhões de cabeças de gado (BRASIL, 2012) e representando, em 2013, 7% do PIB (Produto Interno Bruto) (BRASIL, 2014). No entanto, a produtividade e rentabilidade desse ramo são altamente influenciados pelos efeitos deletérios decorrentes do parasitismo do rebanho bovino por *R. microplus*. Estima-se que os prejuízos ocasionados por esse parasita podem resultar em perdas anuais de até 3,23 bilhões de dólares à economia brasileira (GRISI et al., 2014).

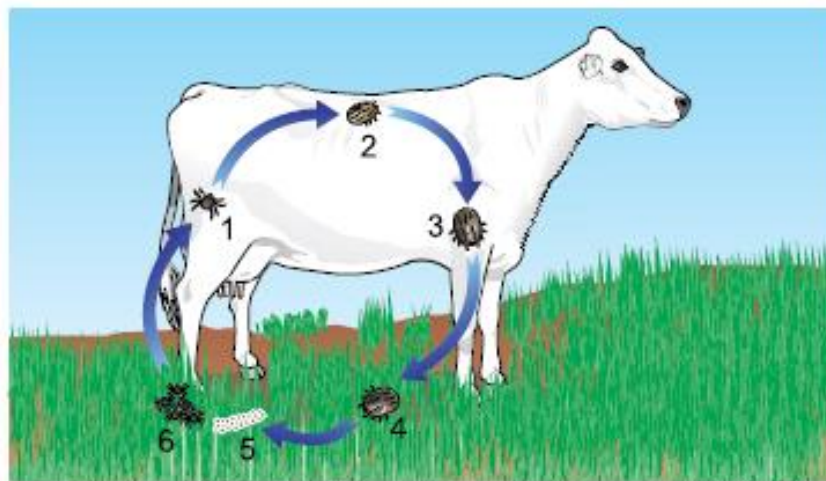
Os prejuízos estão relacionados aos efeitos diretos e indiretos provenientes do parasitismo. Os danos decorrentes da ação direta caracterizam-se pela espoliação sanguínea e suas consequências, tais como anemia, supressão do apetite e diminuição da resposta imune, que resultam em redução da produção de leite e carne. Além de danos ao couro que geram desvalorização desse produto e podem propiciar a fácil deposição de larvas causadoras de miíases (FURLONG, 2005; SANTOS, 2013; RECK et al., 2014).

Os danos indiretos envolvem a transmissão de agentes patogênicos, como os protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* e a bactéria *Anaplasma marginale*, responsáveis pelo quadro clínico conhecido por Tristeza Bovina Parasitária (TPB). Também envolvem os prejuízos resultantes da mão-de-obra necessária para o seu controle, assim como as demais despesas com medicamentos, compra de aspersores e aquisição de carrapaticidas (FRANQUE, 2007; FERRETO, 2013; RECK et al., 2014).

2.1.2. CICLO BIOLÓGICO DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

R. microplus apresenta um ciclo de vida monoxeno, o que significa que esse ectoparasita depende de apenas um único hospedeiro para seu desenvolvimento, sendo preferencialmente bovinos, podendo também infectar equídeos, caprinos, ovinos, bubalinos e cervídeos (FERRETO, 2013). O ciclo biológico desse carrapato, representado na Figura 2, se divide em uma fase parasitária, que ocorre sobre o hospedeiro; e uma fase não parasitária, que acontece no solo (GARCIA, 2009; FERRETO, 2013).

Figura 2. Ciclo de vida do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. (1) Larva infectando o animal; (2) Fêmea iniciando o repasto sanguíneo; (3) Fêmea totalmente ingurgitada; (4) Fêmea ingurgitada no solo, após desprendimento do animal; (5) Ovos de carrapato; (6) Larvas de carrapato prontas para infectar o hospedeiro



Fonte: PEREIRA, SOUZA, BAFFI, 2010

A fase não parasitária tem início quando a teleógina, ou seja, a fêmea adulta repleta de sangue se desprende do hospedeiro, geralmente no período da manhã, e cai ao solo em busca de um local sombreado e úmido para realizar a postura dos ovos. Tal período, denominado período de pré-postura tem duração média de 2 a 3 dias (FURLONG, 2005; SANTOS, 2013). Posteriormente, tem-se o período de ovipostura com duração média de 17 dias, no qual cada fêmea pode colocar de 2 a 3 mil ovos. As larvas levam cerca de 2 a 3 semanas para eclodirem. Após encerrar a postura a fêmea morre (FURLONG, 2005; GARCIA, 2009; FERRETO, 2013).

As larvas recém-eclodidas não são infectantes, necessitam de um período de cerca de 7 dias para que haja o enrijecimento da cutícula, tornando-se, então, larvas infectantes (GARCIA, 2009; FERRETO, 2013). Após esse período, as larvas infectantes migram, por geotropismo negativo e fototropismo positivo, e se aglomeram na extremidade superior da vegetação à espera do hospedeiro, ocorrendo maior migração durante a primeira metade da manhã. Ao atingirem o hospedeiro adequado, as larvas movimentam-se por cerca de 1 hora até se fixarem em locais como região perineal, perianal, úbere, tábua do pescoço e face interna de coxas, iniciando a fase parasitária (FRANQUE, 2007; SANTOS, 2013).

A fase não parasitária é influenciada por condições ambientais que interferem na duração de cada período de desenvolvimento, principalmente temperatura e umidade. Assim, no inverno e no verão, a temperatura é inversamente proporcional ao período de

pré-postura. Adicionalmente, temperaturas acima de 30°C e menores que 15°C elevam a mortalidade de fêmeas, ovos e larvas no ambiente. Em relação à umidade do ambiente, quando a umidade relativa for menor que 80% pode-se observar morte das fêmeas e inviabilidade dos ovos (SANTOS, 2013).

Na fase parasitária, a larva após se instalar no hospedeiro, passa por mudas, resultando na formação de ninfas, que posteriormente originam adultos machos ou fêmeas (SANTOS, 2013). Após o 17º dia da infestação ocorre o acasalamento (FERRETO, 2013), e após um período de três dias, as fêmeas passam a partenógena (parcialmente ingurgitada) e em mais dois dias, a teleógina (ingurgitamento máximo) (JESUS, 2010). O macho pode copular com mais de uma fêmea, pois permanece no hospedeiro por mais tempo, até 43 dias pós-infestação. A fase de vida parasitária não sofre grandes alterações com a variação de região, sendo sua duração de aproximadamente 21 dias (SANTOS, 2013).

2.1.3. FORMAS DE CONTROLE

O controle de carrapatos se baseia, principalmente, no uso de produtos químicos acaricidas (LONC et al., 2014). O primeiro composto a ser utilizado para tal finalidade foi o arsênico, no final do século XIX, e seu uso se estendeu por aproximadamente 40 anos, quando em 1948 apareceram os primeiros relatos de resistência aos compostos arsenicais no Brasil (SANTOS, 2013; RECK et al., 2014). Em 1946, teve início a ampla utilização dos compostos organoclorados que, pouco tempo depois, em 1955, já apresentavam relatos de resistência (SANTOS, 2013).

Seguiu-se o uso de organofosforados, formamidinas (amitraz), piretroides sintéticos, lactonas macrocíclicas (ivermectina), fenilpirazóis (fipronila) e benzoilfeniluréias (fluazurona). Todos apresentaram relatos de resistência, sendo que o fipronil, cuja comercialização iniciou-se em 1996, só apresentou caso de resistência confirmada em 2007. A fluazurona, por sua vez, que começou a ser comercializada em 1994 teve seu primeiro registro de resistência em 2014 (RECK et al., 2014).

Com isso, fatores como a seleção de indivíduos resistentes, decorrentes do uso incorreto e indiscriminado de tais produtos; o alto custo e a permanência de resíduos desses produtos em alimentos e no meio ambiente (ANGELO et al., 2010; FERNANDES, BITTENCOURT, ROBERTS, 2012) têm despertado a atenção para o desenvolvimento e

aprimoramento de métodos alternativos de controle de artrópodes pragas e vetores, incluindo o controle biológico (ANGELO et al. 2010).

O controle biológico consiste na redução de uma população de artrópodes-pragas pela utilização de predadores, parasitas ou patógenos de ocorrência natural (DALZOTO, UHRY, 2009). Dentre as vantagens desse tipo de controle, contendo entomopatógenos, encontram-se o menor risco à saúde humana e ambiental, menor frequência de resistência nos artrópodes-praga e a possibilidade dos entomopatógenos se multiplicarem, aumentando sua permanência no ambiente. O controle biológico apresenta como suas principais limitações a ocorrência mais lenta dos resultados esperados, quando comparado aos pesticidas químicos, e a maior susceptibilidade dos entomopatógenos às condições ambientais (DALZOTO, UHRY, 2009; ANGELO, VILAS-BÔAS, CASTRO-GÓMEZ, 2010).

As pesquisas conduzidas em busca de novas estratégias de controle de artrópodes se concentram em agentes biológicos, tais como fungos, já conhecidos por seu potencial no controle de mosquitos. Bactérias cristalíferas também têm sido investigadas (LONC et al., 2014). O uso de nematoides entomopatogênicos também tem sido considerado para o controle de parasitas de importância médica e veterinária (MONTEIRO et al., 2014).

As preparações inseticidas contendo bactérias são mundialmente populares, com destaque para o *Bacillus thuringiensis*. Trata-se de um bastonete gram-positivo, ubíquo e formador de esporos. A produção de cristais proteicos durante a esporulação, que apresentam atividade entomopatogênica, representa uma característica típica de *B. thuringiensis*. (SCHNEPF et al., 1998; ANGELO, VILAS-BÔAS, CASTRO-GÓMEZ, 2010).

Os produtos à base dessa bactéria correspondem a cerca de 90% dos bioinseticidas disponíveis no mercado mundial (ANGELO, VILAS-BÔAS, CASTRO-GÓMEZ, 2010). Por muitas décadas, *B. thuringiensis* tem sido utilizado para o controle de mosquitos e simúlideos e pode, ainda, ser tóxico ou patogênico para larvas de insetos das ordens Lepidoptera, Diptera e Coleoptera. Algumas cepas são agentes bacterianos promissores contra alguns protozoários e insetos de outras ordens (LONC et al., 2014).

Formulações contendo esporos e proteínas cristalinas tóxicas de *B. thuringiensis* precisam ser ingeridas pelos artrópodes-pragas para levá-los à morte. Em contraste com as larvas de mosquito, que consomem os esporos bacterianos e cristais com a água, a ingestão de *B. thuringiensis* pelos carrapatos é problemática, uma vez que eles são parasitas hematófagos (LONC et al., 2014).

Outra alternativa que tem sido relatada para o controle de artrópodes, incluindo de *R. microplus*, é o uso de nematoides entomopatogênicos com destaque para os pertencentes às famílias *Steinernematidae* e *Heterorhabditidae* (POLAR et al., 2005b). O ciclo de vida desses nematoides inclui uma fase de vida livre no solo, no qual as larvas invasivas buscam ativamente um hospedeiro, artrópodes-pragas ou vetores. Os juvenis infectantes penetram no hospedeiro através de orifícios naturais no tegumento e liberam as bactérias simbióticas, *Xenorhabdus* spp. e *Photorhabdus* spp. que se multiplicam rapidamente, suprimindo o sistema imune do hospedeiro e produzindo diversas substâncias, incluindo cristais de proteínas intracelulares e antibióticos, que resultam na morte de hospedeiros suscetíveis após 24 a 72 horas (MONTEIRO et al., 2010; LONC et al., 2014).

No entanto, o uso dos nematoides pode ser limitado, uma vez que a sua patogenicidade é reduzida pela baixa umidade ou temperatura, exposição à radiação ultravioleta (UV), concentrações elevadas de esterco ou lodo no ambiente, e pelas diferenças na sensibilidade entre as várias fases e espécies de carrapatos (SAMISH; GINSBERG ; GLAZER, 2004; LONC et al., 2014).

Os fungos são os agentes mais eficazes em controle biológico de artrópodes, uma vez que não necessitam serem ingeridos, pois apresentam capacidade de penetrar a cutícula, sendo em geral capazes de matá-los em seus diferentes estágios e podendo apresentar algum tipo de especificidade por um grupo de pragas (SAMISH; GINSBERG; GLAZER, 2004). Adicionalmente, os fungos entomopatogênicos são produzidos em massa por técnicas simples e apresentam menor propensão de ocorrência de resistência por parte dos invertebrados (POLAR et al., 2005b).

Foi constatada ação entomopatogênica sobre artrópodes vetores e pragas nas seguintes espécies: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, *Isaria fumosorosea*, *I. farinosa*, *Lecanicillium* sp., *Simplicillium lamellicola*, *Verticillium* sp., *Aspergillus parasiticus* e *A. flavus*. Para o controle de carrapatos e, em especial de *R. microplus*, destacam-se *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* (LONC et al., 2014). Em condições naturais, os esporos entram em contato com a cutícula do carrapato, germinam e inserem suas estruturas invasivas no corpo do hospedeiro. As hifas, em seguida, começam a se multiplicar, resultando na morte do hospedeiro. A morte geralmente ocorre após o esgotamento das reservas de nutrientes, mas alguns fungos são capazes de produzir metabólitos tóxicos que aceleram esse processo (LONC et al., 2014).

Dentre as limitações do uso de micopesticidas pode-se citar: lento mecanismo de morte do hospedeiro, necessidade de alta umidade para germinar e esporular, suscetibilidade à radiação ultravioleta (UV), custo de produção em massa e curta meia-vida de armazenamento. No entanto, muitas dessas limitações podem ser corrigidas com formulações adequadas (SAMISH; GINSBERG; GLAZER, 2004).

2.2. O fungo entomopatogênico Metarhizium anisopliae

2.2.1. ASPECTOS GERAIS

Os fungos do gênero *Metarhizium* pertencem a classe Sordariomycetes e a ordem Hypocreales (ZHANG et al., 2006). A primeira espécie descrita foi isolada na Ucrânia em 1879, por Ilga Metschnikoff, a partir de larvas infectadas de besouro *Anisoplia austriaca*. Recebeu inicialmente a denominação de *Entomophthora anisopliae*, e em 1883, foi classificado por Sorokin como *Metarhizium anisopliae* (SOUZA, 2007; VEGA et al., 2009).

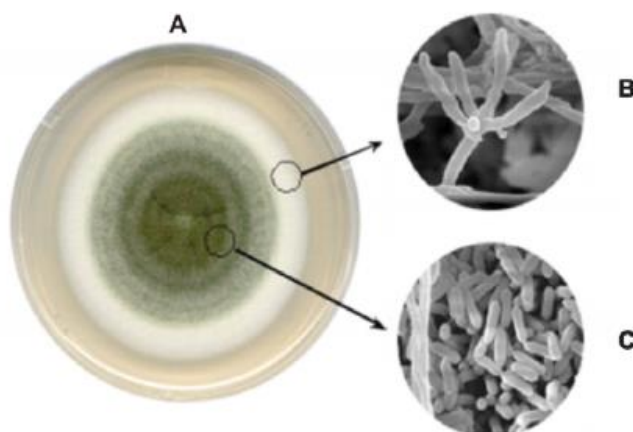
A última atualização taxonômica aconteceu em 2009, quando um estudo de sequenciamento genético definiu *Metarhizium anisopliae* como um complexo, incluindo as espécies *M. anisopliae*, *M. guizhouense*, *M. pingshaense*, *M. acridum* e *M. lepidiotae*. O mesmo estudo ainda classificou *M. taii* como sinônimo de *M. guizhouense*, retornou como denominação de espécie *M. brunneum* e, adicionalmente, identificou como novas espécies *M. globosum* e *M. robertsii* (BISCHOFF, REHNER, HUMBER, 2009).

Metarhizium anisopliae se encontra entre os fungos mais estudados e bem descritos a nível de controle biológico e características moleculares e bioquímicas (FARIA, WRAIGHT, 2007; LEGER, WANG, FANG, 2011; SCHRANK, VAINSTEIN, 2010). Apresenta ampla distribuição, sendo observado desde regiões tropicais a temperadas, podendo ser isolado no solo, na rizosfera de plantas, como saprófitas em cadáveres de artrópodes ou parasitando insetos e carrapatos (BISCHOFF, REHNER, HUMBER, 2009).

Caracteriza-se por apresentar micélio hialino e septado, e conidióforos característicos dos quais surgem os conídios uninucleados e cilíndricos, cuja distribuição de tamanho se encontra entre 3 e 18 µm de comprimento, como pode ser observado na Figura 3 (SOUZA, 2007; SCHAMNE, 2010; MUNIZ, 2015). Naturalmente, os conídios são o propágulo responsável pela infecção dos artrópodes-pragas (SCHRANK,

VAINSTEIN, 2010). O micélio que recobre o cadáver dos artrópodes infectados apresenta coloração que varia de verde claro a escuro, acinzentados ou ainda esbranquiçados com pontos verdes. Conseqüentemente, a doença ocasionada por *M. anisopliae* ao hospedeiro é conhecida como muscardine verde (ROBERTS, ST. LEGER, 2004; SCHAMNE, 2010).

Figura 3. Colônia de *Metarhizium anisopliae* em meio de cultura completo (MCC), após 21 dias a 28°C (A). As micrografias apresentam as estruturas do conidióforo (B) e dos conídios cilíndricos (C)



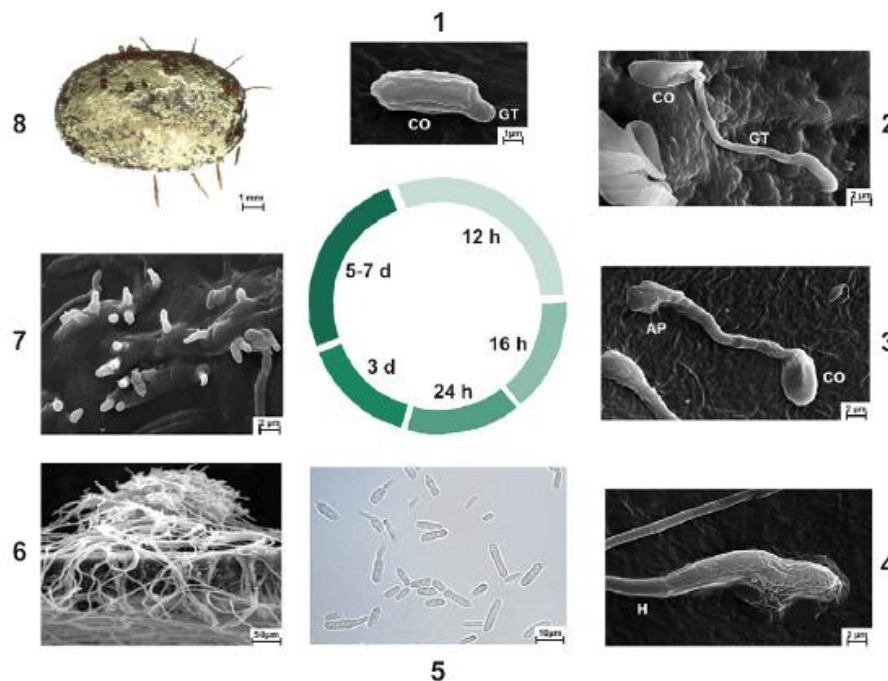
Fonte: STAATS, 2007

Acredita-se que *M. anisopliae* possa infectar mais de 300 espécies de insetos, como gafanhotos (*Locusta migratoria*, *Chortoicetes terminifera*), mosquitos (*Aedes aegypti*, *Anopheles* sp.) e cigarrinhas da cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata*, *Mahanarva fimbriolata*) (SCHOLTE et al., 2004; SOUZA, 2007; RAMANUJAM et al., 2014), além de carrapatos como *R. microplus*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma variegatum* e *Dermacentor nitens* (ARRUDA et al., 2005; FERNANDES, BITTENCOURT, ROBERTS, 2012).

2.2.2. MECANISMO DE INFECCÃO

A infecção por *M. anisopliae*, cujo mecanismo está representado na Figura 4, ocorre por penetração direta do fungo através da cutícula dos artrópodes e o processo envolve as etapas de adesão, germinação, formação do apressório, penetração, colonização, reprodução e disseminação do fungo (SOUZA, 2007; SCHRANK, VAINSTEIN, 2010; MUNIZ, 2015).

Figura 4. Fases da infecção por *Metarhizium anisopliae* em carrapato: (1) Adesão do conídio a cutícula. (2) Germinação do conídio. (3) Diferenciação do tubo germinativo em apressório. (4) Penetração da cutícula. (5) Diferenciação das hifas em blastosporos. (6) Colonização. (7) Emergência das hifas para a superfície do hospedeiro. (8) Cadáver coberto por conídios e conidióforos. CO: Conídio, GT: Tubo germinativo, AP: Apressório, H: Hifa, d: dias, h: horas.



Fonte: SCHRANK, VAINSTEIN, 2010

A infecção tem início com a deposição e adesão do conídio à cutícula do hospedeiro. Esse processo envolve interações hidrofóbicas entre proteínas na superfície do conídio, como as hidrofobinas, e a camada lipídica que recobre a epicutícula, porção superficial da cutícula dos artrópodes (SCHRANK, VAINSTEIN, 2010). Acredita-se ainda que, a atividade de lipases, que também podem estar presentes na superfície de conídios de *M. anisopliae*, aumenta as interações hidrofóbicas liberando ácidos graxos que favorecem a adesão (SILVA et al., 2010).

A etapa seguinte caracteriza-se pela germinação do conídio, processo que requer condições favoráveis de temperatura, umidade e luz (SCHRANK, VAINSTEIN, 2010). O fungo germina sobre o hospedeiro formando o tubo germinativo no qual, posteriormente, observa-se a dilatação das hifas da extremidade distal, caracterizando a estrutura conhecida como apressório, especializada em penetração. A partir do apressório desenvolve-se a estrutura denominada grampo de penetração, dando início a etapa de penetração à cutícula do artrópode. A etapa de penetração envolve mecanismos físicos e químicos (SOUZA, 2007).

A transposição da epicutícula decorre, principalmente, do mecanismo químico, enquanto a transposição da procutícula, camada mais profunda da cutícula, envolve ambos os mecanismos (ARRUDA et al., 2005). O mecanismo físico é referente a pressão mecânica exercida pelo apressório e grampo de penetração sobre a cutícula (SOUZA, 2007), enquanto o mecanismo químico envolve a secreção de enzimas hidrolíticas, isto é, proteases, quitinases e lipases, responsáveis pela degradação dos principais constituintes da cutícula (ARRUDA et al., 2005; SOUZA, 2007; SCHRANK, VAINSTEIN, 2010).

Segundo estudos conduzidos por Arruda et al. (2005), o conídio de *M. anisopliae* pode se fixar e penetrar qualquer região da epicutícula de *R. microplus*, no entanto, observa-se que o ataque ocorre preferencialmente nas pernas do carrapato. Após o rompimento da cutícula, que representa a primeira barreira de defesa, para que a infecção se instale, o fungo deve superar a resposta celular e humoral do sistema imune inato do hospedeiro. Os fungos apresentam duas estratégias principais de defesa: a diferenciação em células que não são reconhecidas pelo sistema imune e a produção de substâncias imunomoduladoras que suprimem o sistema de defesa do hospedeiro (SCHRANK, VAINSTEIN, 2010).

Quando o fungo consegue atingir a hemolinfa, tem início a etapa de colonização. As hifas penetrantes podem se diferenciar em blastosporos, que são estruturas unicelulares e redondas que têm a função de propagação do fungo pelo hospedeiro. Nesse processo de colonização, a liberação de toxinas e a depleção dos nutrientes utilizadas como fonte de alimento para o fungo, resultam na morte do hospedeiro (SOUZA et al., 2007; SCHRANK, VAINSTEIN, 2010).

Os fungos do gênero *Metarhizium* podem secretar a enzima trealose ácida, responsável pela hidrólise da trealose, o principal açúcar presente na hemolinfa. Tal fato permite que esses fungos possam utilizar a trealose como nutriente, reduzindo, conseqüentemente, a disponibilidade desse açúcar para o hospedeiro. Adicionalmente, os fungos entomopatogênicos são reconhecidos por produzirem as toxinas denominadas destruxinas, com destaque para as destruxinas A, B e E. Tais toxinas desempenham importante papel contra o sistema de defesa do hospedeiro, além de ocasionarem danos ao sistema muscular e aos túbulos de Malpighi, afetando os processos de excreção, alimentação e mobilidade (SCHRANK, VAINSTEIN, 2010).

Após a morte do hospedeiro, os nutrientes se tornam escassos e as hifas começam a emergir para a superfície do hospedeiro. Cerca de 72 a 96 horas após a infecção, o artrópode encontra-se totalmente colonizado e sobre o cadáver pode ser

observado a presença de micélio, conidióforos e conídios (ARRUDA et al., 2005; SOUZA et al., 2007; SCHRANK, VAINSTEIN, 2010). Com a presença de conídios na superfície do cadáver inicia-se a etapa de disseminação dessa estrutura pelo ambiente, para que outros artrópodes possam ser infectados (SOUZA et al., 2007).

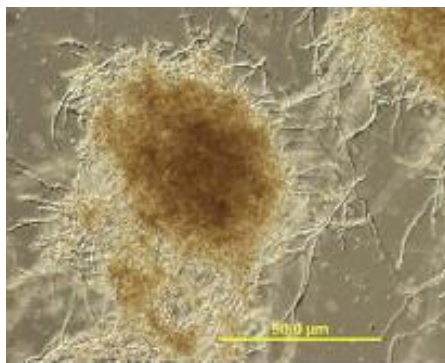
Se tratando de controle biológico, os principais propágulos fúngicos, que podem ser utilizados para a infecção de artrópodes, relatados na literatura são: conídios, que possuem função de reprodução e disseminação no ambiente; blastosporos, estruturas de disseminação na hemolinfa; micélio, com a função de migração para a superfície do hospedeiro e conidiogênese; e esporos de resistência, como microescleródios, que permitem a sobrevivência do fungo no solo (SCHAMNE, 2010).

2.3. Microescleródio

Escleródios são estruturas de resistência fúngica compostos por agregados de hifas, frequentemente melanizados, e resistentes à dessecação (JACKSON, JARONSKI, 2009; MASCARIN et al., 2014; KOBORI et al., 2015). São produzidos no solo ou em plantas infectadas, que se encontram em processo de decomposição, por fungos fitopatogênicos ou por um limitado número de fungos entomopatogênicos (JACKSON, JARONSKI, 2009).

Espécies de fungos fitopatogênicos, como *Colletotrichum truncatum* e *Mycoleptodiscus terrestris* e algumas espécies de fungos entomopatogênicos, como *M. anisopliae*, *M. brunneum* (JACKSON, JARONSKI, 2009), *M. robertsii* e *M. acridum* (MASCARIN et al., 2014) se mostraram capazes de produzir em meio de cultura líquido pobre em nutrientes, escleródios com tamanho variando entre 50 e 600 µm, denominados microescleródios (ME), cuja fotomicrografia está apresentada na Figura 5 (JACKSON, JARONSKI, 2009).

Figura 5. Microescleródio de *Metarhizium anisopliae* após 4 dias de crescimento em meio de cultura líquido



Fonte: JACKSON, JARONSKI, 2009

Os ME são os propágulos fúngicos mais indicados para formulações que visam à aplicação em solo, isso porque ao contrário de outros propágulos como conídios e micélio, permanecem viáveis por longos períodos nesse ambiente (SONG et al., 2014; KOBORI et al, 2015), se mostrando mais resistentes a fatores bióticos e abióticos, o que sugere a necessidade de aplicação de doses menores por hectare (MASCARIN et al., 2014). Acredita-se, ainda, que essas vantagens estejam, em parte, relacionadas à melanina presente nos agregados de hifas, uma vez que tal substância tem demonstrado atividade antimicrobiana e resistência a fungicidas, além de aumentar a rigidez celular, o que resulta na tolerância à dessecação (JACKSON, DUNLAP, JARONSKI, 2010).

A formação, melanização e quantidade produzida de ME, dentre outros fatores, são influenciados pela linhagem e concentração do fungo, e pela composição, aeração, temperatura e atividade de água do meio de cultura líquido (MASCARIN et al., 2014). Os meios de cultura líquidos mais utilizados para a obtenção de ME são compostos por sais basais, suplementados com traços de metais e vitaminas, além de fontes de carbono e nitrogênio (SHEARER, JACKSON, 2006; JACKSON, JARONSKI, 2009; BEHLE, JACKSON, 2014; MASCARIN et al., 2014).

A glicose consiste na principal fonte de carbono utilizada e estudada, enquanto as principais fontes de nitrogênio são: farinha de semente de algodão, milhocina em pó, farinha de soja, extrato de levedura, glutamato ou caseína ácida hidrolisada (SHEARER, JACKSON, 2006; JACKSON, JARONSKI, 2009; BEHLE, JACKSON, 2014; MASCARIN et al., 2014). De acordo com os resultados obtidos por Jackson e Schisler (1995) e Mascarin et al. (2014), acredita-se que a depleção de nitrogênio do meio esteja relacionada à formação de ME, enquanto a depleção de glicose promove sua melanização.

Tais meios de cultura líquidos têm se mostrado como método com melhor custo-benefício para a obtenção de propágulos fúngicos (MASCARIN et al., 2014), uma vez que permitem a produção de tais estruturas em larga escala e com custo razoável (JACKSON, JARONSKI, 2012; BEHLE, JACKSON, 2014). Os ME obtidos podem, então, ser desidratados e inseridos em formulações granulares. Quando reidratados, germinam produzindo conídios infectivos para pragas que apresentem alguma fase do ciclo biológico no solo (BEHLE, JACKSON, 2014; MASCARIN et al., 2014).

2.4. Formulações

O desenvolvimento de formulações contendo micopesticidas teve início em 1888, na Rússia, quando *M. anisopliae* foi produzido em massa e pulverizado em campo para controle do besouro da beterraba, *Cleonus punctiventris*. A partir de então, teve-se início a pesquisa e desenvolvimento de formulações contendo fungos entomopatogênicos. Em 1965, na ex-União Soviética, foi desenvolvido o Boverin, um micoinseticida contendo *Beauveria bassiana* para o controle do besouro da batata do Colorado e da lagarta *Cydia pomonella*. Em 1981, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, concedeu o registro completo ao micoacaricida Mycar, contendo *Hirsutella thompsonii* para o controle do ácaro da ferrugem, *Phyllocoptruta oleivora* (FARIA, WRAIGHT, 2007). No entanto, apenas cerca de 1 a 2% dos pesticidas vendidos mundialmente são produtos contendo micro-organismos (LACEY et al., 2015).

Em 2007, Faria e Wraight publicaram uma lista dos micopesticidas, constando um total de 171 produtos e a América do Sul se mostrou como o maior produtor, sendo responsável por 42,7% dos produtos. Dos 171 micopesticidas, ao menos 160 (93,6%) apresentavam atividade inseticida, enquanto apenas 28 (16,4%) apresentavam atividade acaricida. Apenas 3 destes produtos acaricidas, todos contendo conídios aéreos de *M. anisopliae*, são comercialmente disponíveis com indicação para controlar carrapatos: Tick-EX EC (Novozymes Biologicals Inc., EUA), Metazam (Escuela Agrícola Panamericana, Honduras) e Metarril® [Koppert Biological Systems (antiga Itaforte Bioprodutos), Piracicaba, São Paulo, Brazil] (FARIA, WRIGHT, 2007; FERNANDES, BITTENCOURT, ROBERTS, 2012). No Brasil, *M. anisopliae* é utilizado para o controle das cigarrinhas das pastagens e da cana-de-açúcar, sendo aplicado anualmente em mais de 60 mil hectares, podendo ser encontrado em quatro formas: em arroz inteiro, arroz

triturado, em conídios puros e em formulação oleosa (FARIA, WRAIGHT, 2007; OTTATI-DE-LIMA, 2007).

Além disso, um total de 58 produtos (33,9%) continham *B. bassiana* como ingrediente ativo e o mesmo número de produtos foi encontrado contendo *M. anisopliae*. Os conídios foram os propágulos fúngicos mais utilizados, estando presentes em 41,2% dos produtos (FARIA, WRAIGHT, 2007). Contudo, apesar de serem os mais estudados e utilizados por serem naturalmente infectivos, nem sempre os conídios são os mais desejáveis para aplicação. Blastosporos, por exemplo, podem apresentar germinação mais rápida (6 horas após a reidratação), quando comparados aos conídios (24 horas após a reidratação) (JACKSON, DUNLAP, JARONSKI, 2010), enquanto microescleródios podem ser mais eficazes que os conídios para aplicação em solo (JARONSKI, JACKSON, 2008; JACKSON, JARONSKI, 2009).

No entanto, o sucesso das formulações não depende apenas da linhagem, espécie e propágulo fúngico selecionado, mas também das condições limitantes as quais os fungos podem ser expostos, tais como radiação solar, temperatura e umidade (BEHLE, JACKSON, FLOR-WEILER, 2013). Temperaturas ótimas, entre 25 e 30°C, são necessárias para que ocorra o crescimento do fungo e, conseqüentemente, um controle de pragas bem sucedido. Umidade relativa do ar superior a 90% é requerida para que ocorra a germinação e esporulação sobre o hospedeiro (RAMANUJAM et al., 2014).

Já em relação à radiação ultravioleta, sua porção UV-B (280-320 nm) é diretamente absorvida pelo DNA e por proteínas, resultando em danos e mutagênese do DNA e desnaturação das proteínas. Isso porque a radiação UV-B induz a formação de dímeros de pirimidina no DNA, sendo tais dímeros responsáveis por promoverem distorção da hélice e provocarem mutação ou falhas na transcrição. Por outro lado, a radiação UV-A (320 a 400 nm) produz espécies de oxigênio reativo, as quais são potentes oxidantes celulares que danificam proteínas, membrana celular e DNA (RANGEL, ROGERS, 2007). Esses fatores que podem afetar a velocidade de germinação, virulência e sobrevivência do fungo, e as condições de armazenamento podem levar a redução de sua viabilidade, dessa forma, as formulações tem se tornado a chave para resolução destes problemas, além de potencializarem o desempenho dos pesticidas biológicos (ALVES, 1998; MUNIZ, 2015).

Suspensões aquosas de conídios, contendo apenas pequenas concentrações de tensoativos, como o polissorbato 80 (Tween 80[®]), para facilitar a dispersão dos conídios hidrofóbicos, foram as primeiras formulações a despertar o interesse de pesquisadores.

Isso se deve ao fato da água ser um veículo atóxico e de fácil aplicação (POLAR et al., 2005a). Bittencourt et al. (2003) observaram uma redução de 53,78% nas larvas de *R. microplus* no pasto, após aplicação de suspensão aquosa de conídios de *M. anisopliae*. Basso et al. (2005), por sua vez, observaram redução que variou de 88 a 94,08%.

Entretanto, o uso de óleos nas formulações, sejam de origem mineral ou vegetal, vem apresentando melhores resultados de infectividade do propágulo quando comparado às formulações aquosas (ALVES et al., 2002). Tais óleos quando adicionados em meios aquosos formam emulsões que permitem sua fácil aplicação utilizando equipamentos usualmente empregados pelo produtor (ALVES et al., 2000). Camargo et al. (2012) compararam a eficiência de suspensões aquosas contendo conídios de *M. anisopliae* com a eficiência das emulsões do mesmo fungo contendo 10, 15 ou 20% de óleo mineral estéril em fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Os autores observaram uma porcentagem de controle de 58,1, 93,7 e 87,5%, respectivamente, para as emulsões, e apenas 18,7% para a suspensão aquosa. Acredita-se que tal fato se deve a maior adesão do conídio à superfície do artrópode, uma vez que o óleo tem características quitinofílicas, aumentando a infectividade do fungo, além de diminuir a evaporação da formulação e de conferir maior termotolerância e proteção contra radiação ultravioleta (ALVES, BATEMAN, 2000; CAMARGO et al., 2012).

Outra formulação estudada utiliza gel polimerizado de celulose como veículo, no qual se pode incorporar a suspensão aquosa do propágulo fúngico (REIS et al., 2008; SOUZA et al., 2009). Souza et al. (2009) ao tratarem *in vitro* fêmeas de carrapato *Dermacentor nitens* com conídios de *B. bassiana* incorporados em gel polimerizado de celulose, observaram percentual de controle de até 80%, enquanto os grupos tratados apenas com suspensão aquosa de conídios ou com o gel puro apresentaram percentual de controle inferior a 10%.

Recentemente, a atenção dos pesquisadores tem se voltado para o desenvolvimento de formulações granulares contendo ME de fungos entomopatogênicos, visando o controle de pragas que possuam alguma fase do ciclo biológico no solo, como o carrapato *R. microplus* (JARONSKI, JACKSON, 2008; JACKSON, JARONSKI, 2009; MASCARIN et al., 2014). O solo é um ambiente favorável para a sobrevivência de tais entomopatógenos, uma vez que proporciona condições amenas de temperatura e umidade para a sua sobrevivência e persistência, além de proporcionar proteção contra radiação UV, devido ao fato de se encontrar recoberto por vegetação (MASCARIN et al., 2014).

As formulações granulares apresentam vantagens quando comparadas às formulações aquosas, visto que garantem maior homogeneidade na aplicação. Além disso, o modo e os equipamentos de aplicação são os mesmos usados para a aplicação de alguns pesticidas químicos ou fertilizantes. Vale ainda ressaltar que as formas sólidas promovem a criação de numerosos focos repletos de conídios infectivos, garantindo que os artrópodes-pragas que entrem em contato com um ou poucos grânulos, se contaminem com uma dose letal de conídios (JARONSKI, JACKSON, 2008; JACKSON, JARONSKI, 2009). Grânulos compostos por terra diatomácea contendo ME de *M. anisopliae* foram obtidos por Jackson e Jaronski (2009) e tiveram sua eficácia testada em larvas de *Tetanops myopaeformis*, resultando em percentual de controle variando entre 90 e 100 %, após 14 dias de exposição.

2.5. Pellets e sua obtenção pela técnica de extrusão-esferonização

2.5.1. PELLETS: CARACTERÍSTICAS GERAIS

Pellets podem ser definidos como pequenas unidades esféricas, com tamanho médio na faixa entre 500 e 2000 μm , formadas a partir da aglomeração de pós finos em equipamentos adequados (SANTOS et al., 2004; DUKIĆ-OTT et al., 2009; RATUL, BAQUEE, 2013; SUSHMA, BATTU, RAO, 2014). O diâmetro dos pellets varia de acordo com a aplicação a que se destinam, sendo produzidos por indústrias alimentícias, para obtenção de cereais, massas e de rações animais; por indústrias agrícolas, na produção de fertilizantes; na produção de polímeros; e pela indústria farmacêutica, na produção de sistemas multiparticulados para administração oral de fármacos (VERVAET, BAERT, REMON, 1995; TRIVEDI et al., 2007; RATUL, BAQUEE, 2013).

Na indústria farmacêutica, tais unidades despertam bastante interesse por apresentarem vantagens tecnológicas, em relação a outros sistemas sólidos, tais como boas propriedades de fluxo, estreita distribuição de tamanho, forma esférica, superfície lisa e capacidade de incorporação de grande quantidade de ativo (SANTOS et al., 2004; DUKIĆ-OTT et al., 2007; TRIVEDI et al., 2007). Os pellets podem ser obtidos por diversas técnicas, por exemplo, revestimento de substratos com líquidos ou pós, aglomeração em granuladores de alto cisalhamento ou por granuladores do tipo leito

fluidizado, e pela técnica mais conhecida e utilizada, a extrusão-esferonização (VERVAET, BAERT, REMON, 1995; DUKIĆ-OTT et al., 2009).

2.5.2. OBTENÇÃO DE PELLETS PELA TÉCNICA DE EXTRUSÃO-ESFERONIZAÇÃO

A produção de pellets utilizando a técnica de extrusão-esferonização, visando à aplicação farmacêutica teve início no Japão em meados da década de 1960, com a criação do esferonizador, sendo Nakahara o responsável pelo desenvolvimento da técnica de esferonização (TRIVEDI et al., 2007). No entanto, a descrição da técnica só ocorreu em 1970, nas publicações de Reynolds e de Conine e Hadley (SANTOS et al., 2004). A extrusão-esferonização caracteriza-se por ser um processo multiestágio (DUKIĆ-OTT et al., 2009; ZHANG et al., 2016), abrangendo basicamente 4 etapas: (1) malaxagem, (2) extrusão, (3) esferonização e (4) secagem (SANTOS et al., 2004; TRIVEDI et al., 2007).

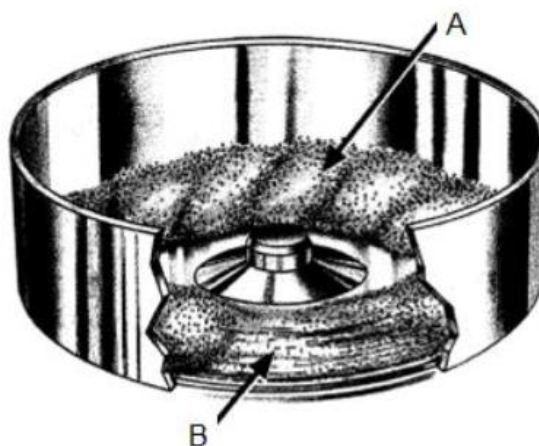
A malaxagem consiste no preparo da massa úmida que será submetida ao processo de extrusão. Inicialmente, é realizada a mistura dos pós secos (substâncias ativas e adjuvantes) e, em seguida, adiciona-se um líquido de aglomeração (geralmente água) em quantidade apropriada para a obtenção da massa úmida (SANTOS et al., 2004; TRIVEDI et al., 2007). A massa deve apresentar propriedades adequadas de lubrificação e plasticidade, garantindo que os produtos resultantes da extrusão não se aglomerem e que sua forma seja mantida no final do processo (DUKIĆ-OTT et al., 2009). É importante ressaltar que quando a umidade da massa se encontra abaixo de um limite mínimo haverá a formação de grande quantidade de pós, além da esferonização incompleta dos extrusados, em decorrência da plasticidade insuficiente dos mesmos. Por outro lado, quando a massa se apresenta excessivamente úmida, ocorrerá a migração excessiva do líquido para a superfície da partícula, resultando na aglomeração dos pellets uns aos outros e na parede do equipamento (SANTOS et al., 2004).

A segunda etapa da peletização tem início quando a massa úmida é inserida na câmara de alimentação do extrusor. A extrusão se dá quando pressão é exercida sobre a massa úmida, forçando-a a passar por uma malha com abertura de tamanho definido, sendo então moldada na forma de cilindros de diâmetro uniforme, conhecidos por extrusados (SANTOS et al., 2004; TRIVEDI et al., 2007; RATUL, BAQUEE, 2013).

Os extrusados são moldados em formas esféricas, na terceira etapa do processo de peletização, conhecida como esferonização (Figura 6) (RATUL, BAQUEE, 2013). Tal

processo ocorre no equipamento denominado esferonizador, que consiste em um cilindro no interior do qual há uma placa de fricção giratória, contendo ranhuras radiais ou perpendiculares (SANTOS et al., 2004; TRIVEDI et al., 2007).

Figura 6. Representação gráfica da formação dos pellets dentro do esferonizador durante a operação. (A) movimento em corda do produto; (B) atrito com a parede lisa

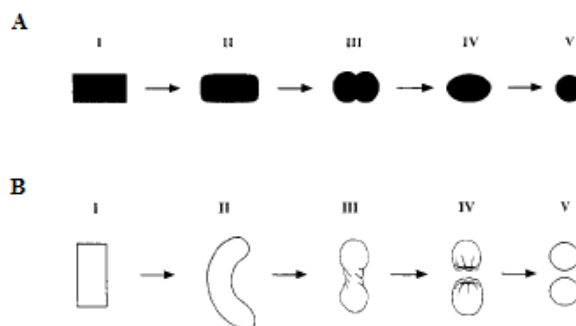


Fonte: ARAÚJO JÚNIOR, 2011

Existem dois possíveis mecanismos descritos na literatura, representados na Figura 7, que podem explicar a formação das unidades esféricas a partir dos extrusados cilíndricos (VERVAET, BAERT, REMON, 1995). O primeiro mecanismo foi proposto por Rowe, em 1985, e descreve a forma esférica dos pellets em decorrência da deformação plástica ocasionada pela força de atrito, resultante da colisão entre partículas e da abrasão com o equipamento (VERVAET, BAERT, REMON, 1995; TRIVEDI et al., 2007; KOESTER, THOMES, 2010; SANTOS et al., 2004). Dessa forma, inicialmente o extrusado é fragmentado em produtos menores que apresentam comprimento e diâmetro de mesma dimensão e, suas extremidades são, então, arredondadas. Posteriormente, há a formação de uma estrutura em forma de haltere, que em seguida adquire forma elíptica e, por fim, é moldada em forma esférica (VERVAET, BAERT, REMON, 1995; SANTOS et al., 2004).

No segundo modelo, proposto por Baert e Remon, em 1993, o cilindro de extremidades arredondadas sofre torção central, sendo posteriormente rompido em duas semi-esferas com cavidades, que também por deformação plástica proveniente da força de atrito, são moldadas em unidades esféricas (VERVAET, BAERT, REMON, 1995; SANTOS et al., 2004; KOESTER, THOMES, 2010).

Figura 7. Mecanismos de formação de pellets na etapa de esferonização. **A** - Mecanismo proposto por Rowe, em 1985: (I) cilindro, (II) cilindro de extremidades arredondadas, (III) haltere, (IV) elipse, (V) esfera. **B** - Mecanismo proposto por Baert, Remon, em 1993: (I) cilindro, (II) corda, (III) haltere com torção central, (IV) esfera com cavidade, (V) esfera



Fonte: VERVAET, BAERT, REMON, 1995

As unidades esféricas obtidas são submetidas a última etapa do processo de peletização, a secagem, a qual pode ser realizada sob condições de temperatura ambiente ou sob temperaturas mais elevadas. A secagem utilizando temperaturas mais altas pode ser realizada em leitos estáticos, como estufas com circulação forçada de ar ou em leitos dinâmicos (fluidizados) (VERVAET, BAERT, REMON, 1995; SANTOS et al., 2004). A secagem realizada em estufa proporciona uma migração mais lenta da água para a superfície do pellet, ao passo que quando se utiliza o leito fluidizado a introdução de ar seco e aquecido dentro da câmara de secagem, proporciona a secagem e o movimento constante dos pellets (SANTOS et al., 2004), garantindo uma secagem mais rápida e uniforme.

2.5.3. ADJUVANTES UTILIZADOS NA OBTENÇÃO DE PELLETS

Adjuvantes são substâncias adicionadas a uma formulação com a finalidade de facilitar a produção ou de conferir determinadas propriedades a uma forma farmacêutica (SANTOS et al., 2004). Para a obtenção de pellets via extrusão-esferonização, a celulose microcristalina (CMC) é conhecida como excipiente padrão-ouro, sendo o mais utilizado devido às propriedades reológicas que confere à massa úmida, o que resulta em pellets com boa esfericidade, friabilidade reduzida e alta densidade (DUKIC-OTT et al., 2007; DUKIC-OTT et al., 2009; CHAMSAI, SRIAMORNSAK, 2013).

Tais propriedades se devem à estrutura da CMC, que se caracteriza por ser um material filamentosos, com elevada área superficial, alta porosidade interna e propriedade de retenção de umidade. Acredita-se que, segundo modelo proposto por Fielden et al., em 1988, as partículas de CMC atuam como uma esponja no processo de extrusão-esferonização. Assim, durante o preparo da massa úmida ocorre a retenção de água em sua estrutura interna porém, durante a extrusão, com a compressão da massa úmida, a água retida é forçada a sair e atua como lubrificante (TRIVEDI et al., 2007; DUKIĆ-OTT et al., 2009).

Após a extrusão, a “esponja” tem seu volume expandido, o que deixa os extrusados quebradiços e com aparência seca, característica favorável para a primeira fase da esferonização, em que ocorre a fragmentação dos mesmos. Durante a esferonização as partículas de CMC têm sua estrutura densificada em consequência da colisão entre partículas e entre partículas e equipamento, e adicionalmente, a água liberada facilita a esferonização dos pellets (DUKIĆ-OTT et al., 2009). A CMC é usualmente utilizada nas formulações de pellets nas concentrações de 40 a 60% da massa total dos pós secos (SANTOS et al., 2004).

Entretanto, embora a CMC apresente diversas vantagens na obtenção de pellets algumas limitações podem ser observadas, exigindo a escolha de outros adjuvantes. A sua principal desvantagem está relacionada a falta de desintegração da forma farmacêutica final (DUKIĆ-OTT et al., 2007; DUKIĆ-OTT et al., 2009; CHAMSAI, SRIAMORNSAK, 2013). Uma das formas de solucionar esse problema é a substituição da CMC por outros adjuvantes, tais como biopolímeros (celulose pulverizada, amido e seus derivados, quitosana, k-carragenana, dentre outros), polímeros semissintéticos (hidroxipropilmetilcelulose, hidroxietilcelulose, e crospovidona), e lipídeos (monoestearato de glicerila). Porém, em nenhum dos casos revisados por DUKIĆ-OTT et al., (2009) pôde-se observar a mesma processabilidade da formulação como aquela oferecida pela presença da celulose microcristalina. Dessa forma, destaca-se a relevância de pesquisas que busquem a obtenção de pellets contendo materiais de diferentes composições que possam substituir, total ou parcialmente, o uso da celulose microcristalina.

2.5.4. ADJUVANTES INORGÂNICOS NO DESENVOLVIMENTO DE PELLETS POR EXTRUSÃO-ESFERONIZAÇÃO

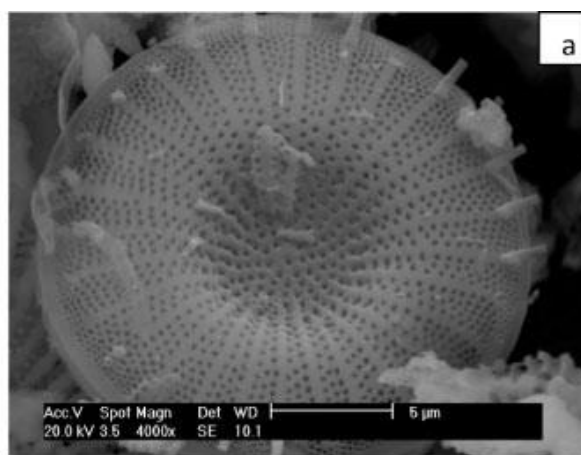
A comunidade científica, de modo geral, destaca o uso da CMC como adjuvante de escolha para o desenvolvimento de formulações peletizadas (SANTOS et al., 2004; LIEW et al., 2005; TRIVEDI et al., 2007; DUKIĆ et al., 2007; DUKIĆ-OTT et al., 2009). No entanto, o uso da CMC como adjuvante para a obtenção de pellets contendo material fúngico pode apresentar certas desvantagens. A primeira está relacionada ao fato de que a CMC apresenta difícil desintegração (DUKIĆ et al., 2007; DUKIĆ-OTT et al., 2009), o que limitaria ou até mesmo impediria a esporulação a partir dos ME presentes nas regiões mais internas dos pellets. A segunda desvantagem está na possibilidade da celulose ser utilizada como fonte de carbono para outros micro-organismos, os quais podem limitar o crescimento do fungo entomopatogênico. De fato, ensaios conduzidos no Laboratório de Patologia de Invertebrados do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás mostraram que pellets de celulose microcristalina e terra diatomácea (60:40) contendo ME de *M. anisopliae* IP119, quando aplicados em solo não-estéril, não foram capazes de esporular, ou esporularam minimamente (dados não publicados). Segundo apresentado na revisão de Lacey et al. (2015), a presença destes competidores no solo resulta em produção de metabólitos que podem afetar adversamente a germinação e o crescimento fúngico, ou podem ser diretamente tóxicos, o que resultaria na redução da multiplicação, sobrevivência e infectividade de *M. anisopliae*.

No presente trabalho, como alternativa ao uso da CMC, alguns compostos inorgânicos, nunca antes utilizados para obtenção de pellets, foram selecionados para serem testados isoladamente ou em combinação. Relatos de uso de materiais inorgânicos para a obtenção de pellets via extrusão-esferonização não estão disponíveis na literatura, por isso os critérios de seleção utilizados foram o baixo de custo de aquisição e as propriedades já conhecidas dos compostos.

A terra diatomácea (TD), originária de fósseis de algas diatomáceas unicelulares, é um pó inerte de coloração variando do branco ao cinza escuro, insolúvel em água, composta majoritariamente (60 a 93%) por dióxido de silício amorfo, em menores quantidades por cálcio, sódio, ferro, alumínio, magnésio, dentre outros (SOUZA et al., 2003; KURÓNIC, 2013). Esse material é de baixo custo de aquisição. Dentre suas aplicações, destaca-se como auxiliar de filtração, isolante térmico e acústico, material

absorvente, dentre outros (SOUZA et al., 2003). Adicionalmente, a TD apresenta uma propriedade bastante interessante que pode justificar sua utilização em pellets contendo propágulos fúngicos: sua atividade inseticida. As partículas desse material apresentam pequenos poros internos (Figura 8), que têm capacidade de absorver lipídios presentes na epicutícula de artrópodes, desestruturando-a. Além disso, a TD pode causar abrasão no local de adesão à cutícula, o que resulta em perda de água e consequente morte do artrópode (OLIVEIRA, ALVES, 2010; KURÓNIC, 2013).

Figura 8. Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura mostrando a estruturação da terra diatomácea. Presença de uma estrutura morfológica bem definida, com a presença de poros que proporcionam uma elevada capacidade de absorção ou filtração



Fonte: Goulart et al., 2011

Outro fator de importante relevância para a seleção da TD foi a obtenção por Jackson e Jaronski (2009) de grânulos compostos por esse material, contendo ME de *M. anisopliae*, que se mostraram efetivos como veículos do propágulo fúngico, contra larvas de *Tetanops myopaeformis*, e provavelmente, contra outras pragas que apresentem alguma fase do ciclo biológico no solo, como o carrapato bovino *R. microplus*.

Outro composto selecionado foi a vermiculita, um argilomineral originário de rochas ígneas, como o granito e sienito, de estrutura cristalina laminar (Figura 9) (CURBELO, 2002). O termo argilomineral designa especificamente uma classe de compostos minerais, os filossilicatos, que são hidrofílicos e responsáveis pela propriedade de plasticidade característica das argilas (TEIXERA-NETO, TEIXERA-NETO, 2009).

montmorilonitas e saponitas. Apresenta coloração que varia de branco pálido a creme, e é insolúvel, porém dispersível em água (ROWE, SHESKEY, QUINN, 2009). Possui superfície carregada negativamente, o que resulta em boa propriedade de adsorção com substâncias carregadas positivamente (RHONGTHONG et al., 2015). Sua principal aplicação é como adjuvante farmacêutico, podendo desempenhar funções de agente suspensor, estabilizante e espessante, desintegrante, aglutinante e adsorvente (ROWE, SHESKEY, QUINN, 2009). A seleção do Veegum para a composição dos pellets se deu devido à sua ação como agente aglutinante.

O último excipiente selecionado nesse trabalho, o dióxido de silício coloidal (Aerosil®), caracteriza-se por ser um pó amorfo e branco, insolúvel em água, álcool e outros solventes orgânicos. O pequeno tamanho de partícula e ampla superfície de contato tornam o dióxido de silício coloidal bastante empregado no ramo farmacêutico no preparo de formas farmacêuticas sólidas, uma vez que melhora o fluxo de pós, resultando em seu uso como agente deslizante (ROWE, SHESKEY, QUINN, 2009; ARAÚJO JÚNIOR, 2011). Uma aplicação adicional do dióxido de silício é seu uso como agente absorvente, estabilizando substâncias higroscópicas, uma vez que é capaz de absorver água sem se liquefazer (ARAÚJO JÚNIOR, 2011).

3 OBJETIVOS

3.1. *Objetivo geral*

O presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento e a caracterização de pellets contendo material inorgânico e microescleródios do fungo *M. anisopliae*.

3.2. *Objetivos específicos*

- Desenvolver e caracterizar pellets sem biomassa fúngica, contendo diferentes proporções de vermiculita, terra diatomácea, silicato de alumínio e magnésio e dióxido de silício coloidal;
- Desenvolver e caracterizar pellets contendo microescleródios de *M. anisopliae*, a partir de formulação pré-selecionada;
- Avaliar diferentes condições de secagem dos pellets contendo *M. anisopliae* em leite fluidizado (40°C e 50°C), caracterizando-os quanto ao seu conteúdo de umidade residual e quanto a viabilidade fúngica;
- Avaliar a estabilidade dos pellets contendo microescleródios de *M. anisopliae*, armazenados por períodos de 0, 7, 14 e 21 dias, nas temperaturas de 4°C (em refrigerador), e 40°C e 75% de umidade relativa (UR) (câmara climática);
- Caracterizar a tolerância de conídios e da formulação de pellets contendo microescleródios de *M. anisopliae* expostos à radiação UV-B.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. *Materials*

4.1.1. *SUBSTÂNCIAS E MATÉRIAS-PRIMAS*

- Ágar-ágar Tipo I (HiMedia Laboratories, Mumbai, Índia)
- Benomyl (Hi-Yield Chemical Company, Bonham, EUA)
- CaCl_2 - Cloreto de cálcio (VETEC, Missouri, EUA)
- SiO_2 - Dióxido de silício coloidal (Evonik Degussa GmbH, Hanau, Alemanha)
- Extrato de levedura (Difco Laboratories, Le Point de Claix, França)
- KH_2PO_4 - Fosfato de potássio monobásico anidro (Qhemis, São Paulo, Brasil)
- $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ – D-glicose anidra (Synth, São Paulo, Brasil)
- Meio batata dextrose ágar (Difco Laboratories, Le Point de Claix, França)
- FeSO_4 - Sulfato de ferro (VETEC, Missouri, EUA)
- MgSO_4 - Sulfato de magnésio (VETEC, St. Louis, Missouri, EUA)
- MnSO_4 - Sulfato de manganês (VETEC, Missouri, EUA)
- ZnSO_4 - Sulfato de zinco (VETEC, Missouri, EUA)
- Terra diatomácea (Keepdry®, São Paulo, Brasil)
- Tween 80 (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA)
- Vermiculita (AgroFloc - Brasil Minérios, Goiás, Brasil)
- Silicato de alumínio e magnésio (Veegum)

4.1.2. *EQUIPAMENTOS*

- Agitador orbital (TE-422, Tecnal, Brasil)
- Analisador de partículas por difração à laser (LS 13320 Beckman Coulter, EUA)
- Analisador de umidade por infravermelho (Gehaka IV2000, São Paulo, Brasil)
- Esferonizador (Caleva Multi Bowl Spheronizer 120, Dorset, Inglaterra)
- Extrusor (Caleva Extruder 20, Dorset, Inglaterra)
- Leito fluidizado (Mycrolab Hüttlin, Steinen, Alemanha)

4.2. Métodos

4.2.1. ISOLADO FÚNGICO, CULTIVO DE CONÍDIOS E PREPARO DO INÓCULO

O isolado fúngico estudado foi o *M. anisopliae* s.s. IP 119, depositado na Coleção de Culturas do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IP) da Universidade Federal de Goiás, proveniente do solo da região norte do estado de Goiás (ROCHA et al., 2011). O cultivo para obtenção de conídios do isolado foi realizado em meio de cultura batata, dextrose e ágar, suplementado com extrato de levedura (1g/L) (BDAL) em placas de Petri (100 × 15 mm) por 15 dias a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, em ausência de luz.

Os conídios produzidos foram coletados da superfície do meio de cultura, com auxílio de espátula, e suspensos em 10 mL de solução aquosa de Tween 80 a 0,05% (v/v). A suspensão foi agitada em vórtex por cerca de 1 minuto e a concentração de conídios foi determinada com auxílio de câmara de Neubauer. A suspensão teve sua concentração final ajustada para 5×10^7 conídios/mL, para posterior inoculação em meio de cultura líquido para obtenção de microescleródios.

4.2.2. PRODUÇÃO DE MICROESCLERÓDIOS

Para a produção de microescleródios, utilizou-se o meio de cultura líquido descrito por Jackson e Jaronski (2009), que apresenta relação carbono/nitrogênio de 30:1 e é composto por (1L): glicose 73,0 g; extrato de levedura 15,0 g; KH_2PO_4 4,0 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,8 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,6 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,016 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,014 g. Em frascos erlenmeyers de 250 mL foram adicionados 1,5g de extrato de levedura e 53,5 mL da solução dos sais citados, que posteriormente foram submetidos ao processo de autoclavagem. Solução estéril de glicose a 20% (p/v), na quantidade de 36,5 mL foi adicionada, imediatamente antes da adição do inóculo (10 mL da suspensão fúngica contendo 5×10^7 conídios/mL). Os erlenmeyers foram inseridos em agitador orbital e mantidos sob agitação a 220 rpm por 4 dias, sendo submetidos a agitação manual diariamente para evitar a formação de micélio na parede do frasco.

A biomassa fúngica foi determinada adicionando-se 1,5 mL do meio líquido em analisador de umidade por infravermelho, programado para determinar o conteúdo de sólidos totais (%) por gravimetria, aquecendo a amostra a 105°C até a obtenção de peso constante. A concentração de ME foi determinada através da coleta de 1 mL da cultura

líquida total e sua diluição em 9 mL de solução de Tween 80 (0,05%, v/v). Em seguida, uma alíquota de 100 µL desta suspensão de ME foi adicionada sobre lâmina para microscopia e coberta com lamínula de vidro. Os agregados de hifas maiores que 50 µm de diâmetro, compactos e com coloração escura foram contabilizados com auxílio de microscópio de contraste de fase (DM2500, Leica Microsystems LTD, Suíça) em aumento de 400×.

4.2.3. DESENVOLVIMENTO DOS PELLETS SEM MICROESCLERÓDIOS

Os pellets foram preparados pela técnica de extrusão-esferonização. Para tanto, utilizou-se extrusor de rolos Caleva equipado com malha de 0,5 mm e velocidade de rotação dos rolos de 30 rpm. O esferonizador utilizado foi do tipo radial com disco de 85 mm de diâmetro e ranhuras de 3 mm, com velocidade de rotação do disco de 1500 rpm durante 3 minutos.

Os componentes da formulação vermiculita, previamente triturada em liquidificador, terra diatomácea, e Veegum, na presença ou não de dióxido de silício coloidal (Tabela 1) foram misturados manualmente em recipiente de aço inox, sendo posteriormente submetidos à técnica de tamboramento manual, com auxílio de saco de polietileno, por 3 minutos. Posteriormente, água purificada ou solução de Veegum 5% (p/v) foi adicionada à mistura de pós, como líquido de aglomeração, em quantidade suficiente para se obter uma massa com características adequadas de plasticidade e lubrificação.

Tabela 1. Desenvolvimento de pellets contendo adjuvantes inorgânicos sem material fúngico

Formulação	Componentes	Composição (%)	Líquido aglomerante	Relação líquido: sólido
F1	V	100	Água	1:3,85
F2	TD	100	Água	1:1,67
F3	TD, VE*	80:20	Água	1:2,27
F4	V, TD*	80:20	Água	1:2,08
F5	V, TD*	80:20	Sol. VE 5% (p/v)	1:1,11
F6	V, TD, SiO ₂ *	78:20:2	Água	1:1,02

V: vermiculita; VE: silicato de alumínio e magnésio (Veegum); TD: terra diatomácea, SiO₂: dióxido de silício coloidal; *: adição de 5% SiO₂ (p/p) durante a esferonização. Fonte: Próprio autor

A massa úmida foi submetida a etapa de extrusão e os extrusados resultantes passaram pelo processo de esferonização. Durante a esferonização, 5% (p/p) de dióxido de silício coloidal foi adicionado gradativamente na formulação (ver formulações F3 a

F6, Tabela 1). Os pellets úmidos foram secos por 24 horas sob temperatura ambiente. O rendimento das formulações foi obtido através da equação 1, com os dados de um único ensaio.

$$\text{Rendimento} = \frac{m_f}{m_i} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Em que:

m_f = massa (g) dos pellets após operação de secagem

m_i = massa (g) de adjuvantes incorporados na formulação

A formulação que apresentou melhores características morfológicas (distribuição de tamanho, tamanho médio e esfericidade) e de rendimento foi escolhida como base para a obtenção dos pellets contendo ME.

4.2.4. DESENVOLVIMENTO DE PELLETS CONTENDO MICROESCLERÓDIOS

Os pellets foram preparados utilizando-se a técnica de extrusão-esferonização. As condições operacionais utilizadas foram idênticas àquelas descritas na seção 4.2.3.

Para a obtenção de 100g de pellets: **(1)** pesou-se vermiculita previamente triturada, terra diatomácea e dióxido de silício coloidal (78:20:2, formulação F6, Tabela 1); **(2)** Os componentes foram misturados manualmente e posteriormente submetidos ao tamboramento em saco de polietileno; **(3)** À 300 ml do meio de cultura líquido contendo ME adicionou-se 15g da mistura dos adjuvantes (5g para cada 100 mL do meio líquido), e a homogeneização foi realizada com auxílio de bastão de vidro; **(4)** A dispersão resultante foi então submetida à filtração sob vácuo, com auxílio de Kitassato, funil de Buchner e papel filtro qualitativo (Unifil, 12,5 cm, 80g/m²). O líquido filtrado foi descartado; **(5)** A massa úmida retida no papel filtro foi adicionada gradativamente ao restante da mistura das matérias-primas (85g), com auxílio de gral e pistilo; **(6)** À massa úmida obtida, quando necessário, adicionou-se água purificada até a obtenção de material com plasticidade e lubrificação adequadas; **(7)** Posteriormente, a massa foi extrusada, e os extrusados submetidos à esferonização.

Os pellets obtidos foram secos em leito fluidizado conforme descrito na seção 4.2.5.

4.2.5. SECAGEM DOS PELLETS CONTENDO MICROESCLERÓDIOS

Cerca de 40g de pellets úmidos foram secos em leito fluidizado com temperatura do ar de saída de 40°C ou 50°C e vazão do ar de 8 m³/h. Amostras foram recolhidas nos tempos 0, 5, 10 e 20 minutos para avaliação do conteúdo de umidade residual, da produção de conídios e de sua viabilidade. Os ensaios para avaliação do conteúdo de água (ver seção 4.2.6) foram realizados em triplicata em dias diferentes, e os ensaios de avaliação da produção e viabilidade dos conídios (ver 4.2.9) foram realizados em duplicata, com repetições realizadas em dias diferentes. Para os lotes de pellets destinados ao ensaio de estabilidade de armazenamento, a secagem foi realizada a 50°C por 20 minutos.

4.2.6. DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE UMIDADE RESIDUAL NOS PELLETS

Com auxílio de gral e pistilo, 1,5g de pellets foram triturados até a obtenção de pó homogêneo, que foi então adicionado ao analisador de umidade por infravermelho. A determinação da umidade residual foi realizada por gravimetria, aquecendo o material a 105 °C até a obtenção de peso constante.

4.2.7. MORFOLOGIA E ESFERICIDADE DOS PELLETS

O aspecto visual dos pellets obtidos foi analisado utilizando-se estereomicroscópio acoplado a câmera fotográfica, e as imagens foram registradas e armazenadas utilizando-se o software Leica MZ. As imagens obtidas foram tratadas e a esfericidade de cerca de 300 pellets calculada com auxílio do software Image J (NIH, EUA), utilizando fórmula de projeção da esfericidade (PS), conforme demonstrado na equação 2:

$$PS = \frac{4A}{\pi D_L^2} \quad (\text{Equação 2})$$

Sendo:

A: área projetada do perfil bidimensional da partícula

D_L: maior distância observada na análise da partícula (maior diâmetro de Feret)

4.2.8. *DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DOS PELLETS*

A distribuição de tamanho dos pellets foi determinada em analisador de partículas por difração a laser. Amostras de 10g dos pellets foram analisadas utilizando-se o módulo para amostras sólidas do equipamento. Para tanto, utilizou-se nível de obscurecimento de 5% e modelo de Fraunhofer para amostras opacas e maiores.

4.2.9. *AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO E VIABILIDADE DE CONÍDIOS PRODUZIDOS A PARTIR DE PELLETS CONTENDO MICROESCLERÓDIOS*

Após processo de secagem, armazenamento ou exposição à radiação UV-B, 0,03g de pellets foram adicionados em placas de Petri (100 x 15 mm) contendo meio ágar-água 2% (p/v) e incubados em estufa para crescimento microbiológico a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ por 10 dias. Após esse período, os pellets e conídios foram raspados, com auxílio de espátula, e transferidos para 5 mL de solução Tween 80 a 0,05% (v/v). A concentração de conídios na suspensão foi determinada com auxílio de câmara de Neubauer. A produção de conídios por grama de pellets (PC) foi calculada pelo uso da equação 3:

$$PC = \frac{nC}{m} \quad (\text{Equação 3})$$

Sendo:

nC: número de conídios na placa

m: massa de pellets

A viabilidade dos conídios foi determinada de acordo com o método descrito por Braga et al. (2001). Para tanto, em cada repetição, uma placa de Petri (60 x 15 mm) contendo meio BDAL, acrescido de 0,002% (p/v) de Benomyl e 0,05% (p/v) de cloranfenicol, recebeu 20 μL de suspensão contendo 10^6 conídios/mL. As placas foram incubadas por 48 horas a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR > 98%, em ausência de luz. Posteriormente, duas gotas de lactofenol de Amann acrescido de azul de algodão foram adicionados, com auxílio de pipeta de Pauster sobre a zona de crescimento fúngico, para avaliação da germinação. Um total de 300 conídios foram avaliados.

4.2.10. ESTABILIDADE DE ARMAZENAMENTO

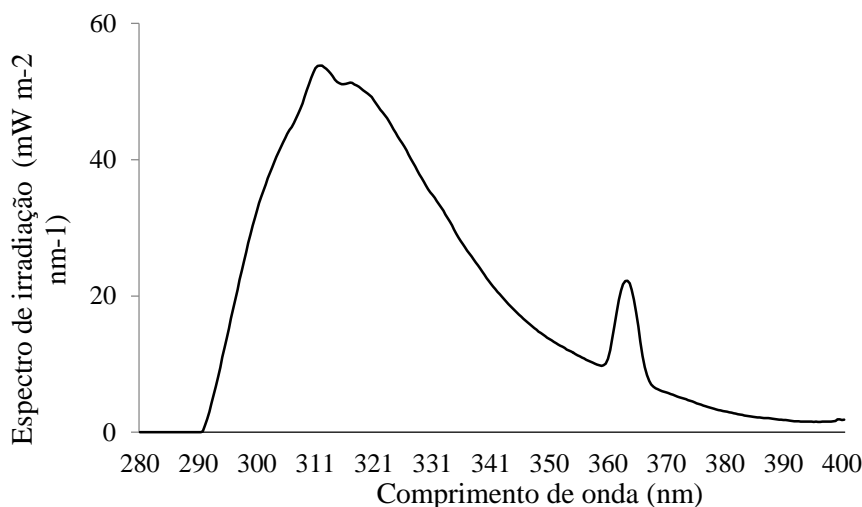
Cerca de 10g de pellets contendo ME foram armazenados em tubos Falcon de 50 mL fechados e mantidos sobre duas condições: (1) câmara climática a $40 \pm 1^\circ\text{C}$ e 75% UR, e (2) refrigerador a 4°C . Em intervalos de tempo pré-determinados, alíquotas de 100 mg foram coletadas e submetidas ao ensaio de viabilidade, conforme já descrito. Os intervalos de coleta estabelecidos foram: 0, 7, 14 e 21 dias. O ensaio foi conduzido em triplicata, com lotes de pellets produzidos em dias diferentes e submetidos ao armazenamento imediatamente após o preparo.

4.2.11. TOLERÂNCIA DE CONÍDIOS DE *M. anisopliae* À RADIAÇÃO UV-B

Os conídios cultivados conforme descrito no item 4.2.1, foram suspensos em 5 mL de solução aquosa de Tween 80 a 0,05% (p/v) e a suspensão teve sua concentração ajustada para 10^6 conídios/mL. Ao centro de placas de Petri (60 x 15 mm) contendo meio BDAL acrescido de Benomyl e cloranfenicol, adicionou-se 20 μL da suspensão padronizada e esperou-se cerca de 30 minutos até que a gota secasse.

As placas foram expostas a $541,54 \text{ mW/m}^2$ de radiação ultravioleta segundo o espectro de ação calculado por Quate et al. (1992), a uma distância de 48 cm da fonte de energia, em câmara contendo 4 lâmpadas ultravioletas (UVB-313 EL, Q-Lab Corporation, Cleveland, EUA), com produção majoritária de radiação UV-B, comprimento de onda máximo em 311 nm e produção mínima de radiação UV-A. As placas apresentavam-se cobertas com filme de diacetato de celulose com espessura de 0,13 mm, o qual bloqueia a passagem de comprimentos de onda menores que 290 nm. O espectro de irradiação está representado na Figura 10 e foi medido com auxílio de espectroradiômetro (Ocean Optics, USB2000+RAD, Dunedin, EUA).

Figura 10. Espectro de irradiação após passagem da luz por filme de diacetato de celulose na câmara de tratamentos com UV-B. A radiação ultravioleta produzida pelas lâmpadas fluorescentes corresponde a irradiância de 541,54 mW/m² segundo espectro de ação estabelecido por Quaitte et al. (1992)



Fonte: Próprio autor

No ensaio, placas foram coletadas nos intervalos de 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240 min, representando doses totais, respectivamente, de 0,65; 1,30; 1,95; 2,60; 3,25; 3,90; 4,55; 5,20; 5,85; 6,50; 7,15; e 7,80 kJ/m². As placas do grupo controle não foram expostas à radiação.

Ao fim do período de exposição, as placas foram incubadas por 48 horas, a 27 ± 1°C em ausência total de luz. Avaliou-se então a viabilidade dos conídios nas placas expostas e no grupo controle, conforme método já descrito, e a porcentagem de germinação relativa (GR) dos conídios foi calculada pela equação 4:

$$GR(\%) = \frac{n_{CP}}{n_{CC}} \times 100 \quad \text{Equação (4)}$$

Sendo:

nCP: média do número de conídios germinados na placa exposta por um determinado período de tempo

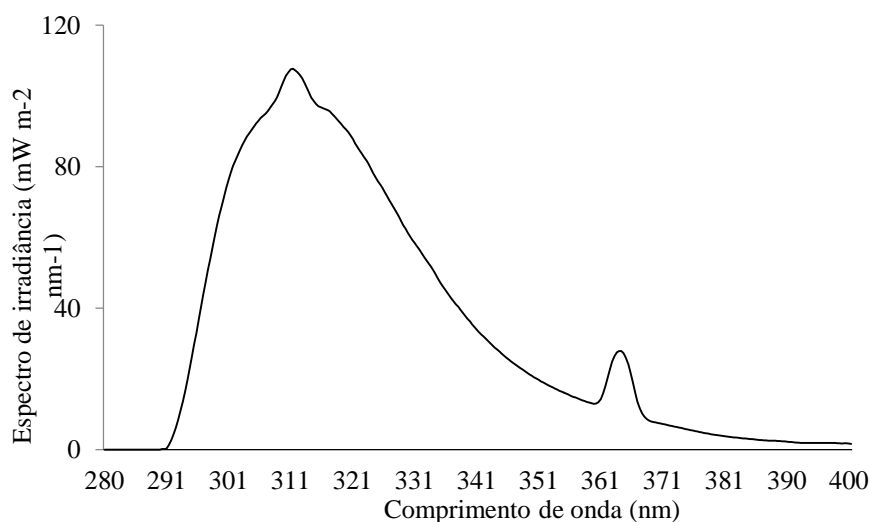
nCC: média do número de conídios germinados do grupo controle

O ensaio foi realizado em três repetições, sendo tais repetições conduzidas em dias diferentes e com conídios produzidos para cada experimento.

4.2.12. TOLERÂNCIA DE PELLETS CONTENDO MICROESCLERÓDIOS DE *M. anisopliae* À RADIAÇÃO UV-B

À placas de Petri (100x15 mm) contendo meio ágar-agua 2% (p/v) foram adicionados 0,03 g de pellets contendo ME de *M. anisopliae*. Após a adição, as placas foram expostas a 1239,23 mW/m² de radiação ultravioleta segundo o espectro de ação calculado por Quate et al. (1992), utilizando-se a mesma câmara, disposição das placas e fonte de energia descritos na seção 4.2.11. As placas apresentavam-se cobertas com filme de diacetato de celulose com espessura de 0,13 mm. O espectro de irradiação está representado na Figura 11 e foi medido com auxílio de espectroradiômetro (Ocean Optics, USB2000+RAD, Dunedin, EUA).

Figura 11. Espectro de irradiação após passagem por filme de diacetato de celulose na câmara de tratamentos com UV-B. A radiação ultravioleta produzida pelas lâmpadas fluorescentes corresponde a irradiância de 1239,23 mW/m² segundo espectro de ação estabelecido por Quate et al. (1992)



Fonte: Próprio autor

Os intervalos de coleta determinados foram de 120, 240, 360, 480, 600 e 720 min, representando doses totais, respectivamente, de 8,92, 17,84, 35,69, 44,61, 53,53 kJ/m². As placas do grupo controle não foram expostas à radiação.

Ao fim da exposição as placas foram incubadas em estufa para crescimento microbiológico a 27 ± 1°C por 10 dias e a produção e viabilidade dos conídios foram determinadas, conforme descrito no item 4.2.9. Foram realizadas duas repetições em dias diferentes.

4.2.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados referentes à esfericidade das formulações desenvolvidas sem biomassa fúngica foram comparados utilizando-se o teste de Tukey com 5% de significância. Para a avaliação dos dados de umidade residual dos pellets, os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância com dois fatores fixos, sendo estes representados por temperatura e tempo de secagem em leito fluidizado. A interação de temperatura com tempo de secagem também foi avaliada no modelo. Quando a interação foi significativa, fez-se o desdobramento dos níveis de fatores e as respectivas comparações de médias pelo método de contraste de Tukey ($P < 0,05$) entre níveis de um fator dentro do outro fator. Quando a interação não foi significativa, as médias de tratamentos dentro de cada fator foram comparadas entre si de forma independente.

Em relação aos dados de estabilidade de armazenamento dos pellets submetidos a duas condições diferentes de temperatura, a produção de conídios por grama de pellets e a germinação relativa (%) dos conídios produzidos por estes pellets foram comparados, primeiramente, entre as temperaturas de armazenamento de 4 e 40°C pelo teste de *t* Student a 5% de significância, apenas para o 7º dia de armazenamento.

Em outra análise, os dados de produção de conídios por grama de pellets e da germinação relativa foram submetidos à análise de variância após ajustados a um modelo linear simples, em que o efeito fixo foi somente o tempo de armazenamento. Desta forma, quis-se determinar o efeito do tempo de armazenamento somente a 4 °C. Antes de submeter os dados às análises, estes foram verificados quanto à normalidade e homogeneidade de resíduos dos erros pelos testes de Bartlett e Shapiro-Wilk, e não houve necessidade de transformação para atender aos pressupostos da normalidade dos modelos lineares com distribuição gaussiana.

Os resultados obtidos a partir do ensaio de fotoestabilidade de conídios expostos à radiação UV-B referentes a resposta “germinação relativa (%)” foram ajustados a uma regressão de Weibull com três parâmetros, usando o pacote “drc” (RITZ, STREIBIG, 2015), obtendo-se uma equação da curva (Equação 5) a partir da qual foi possível estimar a dose letal mediana (DL50) de radiação UV-B sobre os conídios.

$$y = d * \exp(- \exp(b(\log(x) - \log(e)))) \quad (\text{Equação 5})$$

onde:

b = coeficiente angular da curva (*slope*)

d = limite superior da curva (intercepto)

e = ponto de inflexão da curva

A análise dos dados de produção de conídios a partir de pellets contendo ME expostos à radiação UV-B, inicialmente foi realizada através de análise de variância dos dados transformados por $\log_{10}(x)$ para normalização dos resíduos. Seguindo-se por comparação entre as doses de exposição, utilizando-se o teste de Tukey ($P < 0,05$).

Todas as análises estatísticas foram realizadas no software R (R CORE TEAM, 2015).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Desenvolvimento dos pellets sem microescleródios

No presente trabalho foram desenvolvidas e avaliadas um total de 6 formulações inorgânicas de pellets preparados sem a incorporação do material fúngico, a fim de definir a composição que resultaria em pellets com melhor rendimento, distribuição de tamanho e maior esfericidade. Os pellets foram obtidos através da técnica de extrusão-esferonização e os resultados de sua caracterização estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Distribuição de tamanho, tamanho médio, esfericidade e rendimento dos pellets referentes às formulações desenvolvidas sem material fúngico

Formulação	Esfericidade ± D.P	Tamanho médio (μm) ± D.P	D90 (μm)	D50 (μm)	D10 (μm)	Rendimento (%)
F1	-	-	-	-	-	7,16
F2	-	-	-	-	-	-
F3	0,60 ± 0,30	639,60 ± 160,60	858,80	607,80	465,70	31,40
F4	0,68 ± 0,18	591,50 ± 131,10	780,40	569,50	455,00	29,70
F5	0,70 ± 0,19	638,50 ± 136,80	844,30	613,70	484,00	36,00
F6	0,75 ± 0,07	584,90 ± 122,40	758,50	574,10	431,50	48,00

Fonte: Próprio autor

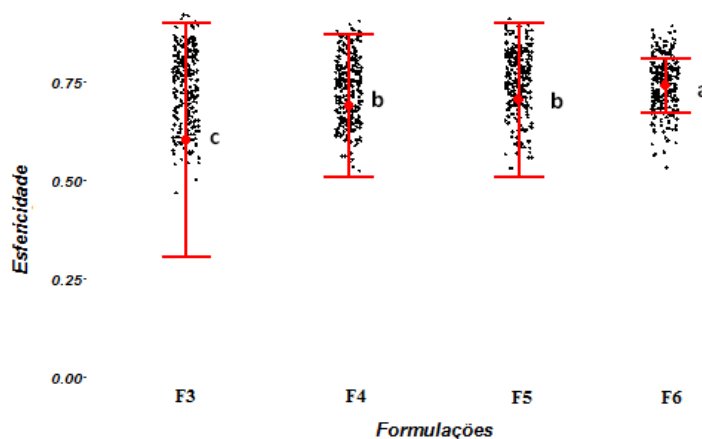
As primeiras formulações testadas foram compostas de um único adjuvante, a formulação F1 contendo apenas vermiculita e a formulação F2 contendo apenas terra diatomácea. A F1 apresentou comportamento indesejável, pois apesar da massa úmida ter sido capaz de formar extrusados, houve grande formação de pós durante a operação de esferonização e, conseqüentemente, observou-se baixo rendimento (apenas 7,16%). A elevada fragilidade da estrutura sugere que a vermiculita por si só não apresenta propriedade de coesividade adequada para a obtenção de pellets, quando os pós são aglomerados com água. É importante ressaltar que utilizou-se elevada quantidade de água durante a formação da massa úmida (Tabela 1). A F2 também não foi satisfatória, uma vez que a massa úmida não se apresentou extrusável, impedindo a obtenção de pellets, o que sugere que a TD também não apresenta propriedades de plasticidade, lubrificação e coesividade adequadas para o processo de extrusão-esferonização.

Como tentativa de se aperfeiçoar a formulação, adicionou-se 20% de Veegum à massa úmida contendo terra diatomácea, devido à sua ação aglutinante, constituindo a formulação F3. Essa formulação se mostrou capaz de formar pellets, no entanto, os

produtos obtidos se apresentaram em forma de bastão, resultando em reduzida esfericidade (0,60, Tabela 2). Isso sugere que a massa resultante da mistura de terra diatomácea e Veegum, apesar de extrusável, não apresentou plasticidade suficiente para sofrer esferonização satisfatória. Alternativamente, preparou-se uma mistura entre vermiculita e terra diatomácea (80:20), sem adição de Veegum (F4). Essa composição se mostrou extrusável (devido à elevada quantidade de vermiculita) e se observou ganho na esfericidade em relação à F3. No entanto, o rendimento, apesar de superior ao calculado para os pellets F1, ainda se mostrou baixo (29,7%). Para tentar aumentar o rendimento adicionou-se solução de Veegum a 5% (p/v), ao invés de água, sobre a mistura de vermiculita/terra diatomácea (F5). A formulação F5 apresentou leve aumento no rendimento (36%).

Em seguida, optou-se por adicionar 2% de dióxido de silício coloidal à formulação F5, resultando na formulação F6 (Tabela 1) (V/TD/SiO₂, 78/20/2). Houve nova melhora no rendimento (48%) acompanhada de um aumento significativo na esfericidade (Tabela 2 e Figura 12). Apesar do melhor rendimento obtido na F6, quando comparada às demais formulações desenvolvidas, quantidade superior a 50% da formulação ainda é perdida no processo de preparo dos pellets. Com isso, novos estudos deverão ser conduzidos a fim de se otimizar o rendimento da formulação e, conseqüentemente, proporcionar maior chance de sucesso em um futuro escalonamento da formulação para produção industrial.

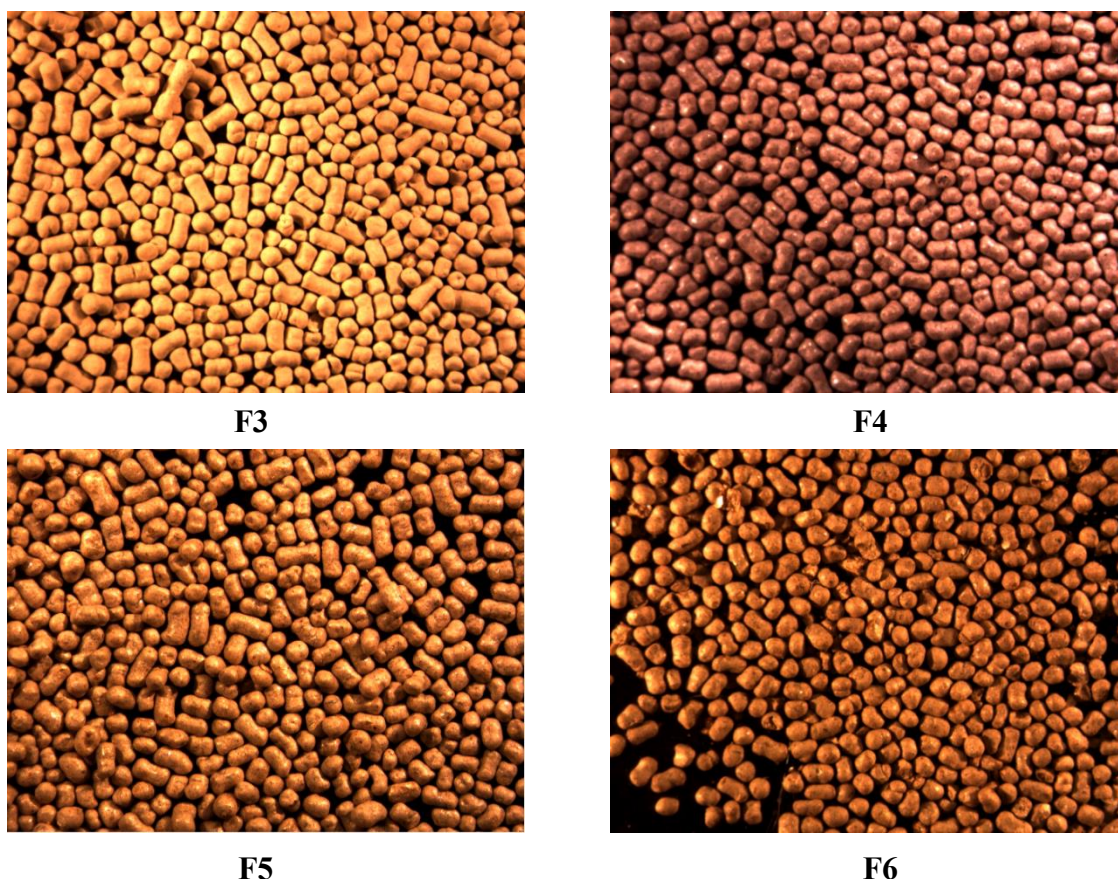
Figura 12. Esfericidade de pellets de diferentes formulações inorgânicas. Valores de esfericidade variam entre 0 e 1. Letras iguais indicam que não há diferença estatística entre as médias (Teste de Tukey (P<0,05)). Pontos referem-se às leituras da esfericidade, enquanto que as médias seguidas dos desvios-padrões estão representadas pelo ponto e segmento em vermelho, respectivamente.



Fonte: Próprio autor

A esfericidade projetada pode variar de 0 a 1, sendo que, quanto mais próximo de 1 for o valor encontrado, mais esférica é a formulação. Pode-se observar na Figura 12 que houve influência significativa da formulação sobre a esfericidade dos pellets ($F=27,19$, $gl = 3,1164$, $P<0,0001$). Mais especificamente, os pellets F3 (TD+VE) foram significativamente menos esféricos que os demais, enquanto diferença significativa não foi observada entre as formulações F4 (V+TD) e F5 (V+TD+sol.VE). Por outro lado, a F6 (V+TD+SiO₂) se apresentou como a formulação com melhor esfericidade média (0,75). A melhora na esfericidade também pode ser observada pela análise das fotomicrografias na Figura 13.

Figura 13. Fotomicrografias dos pellets obtidos referentes às formulações desenvolvidas F3, F4, F5 e F6. Aumento de 0,63x



Fonte: Próprio autor

A esfericidade dos pellets desempenha papel fundamental na propriedade de escoamento do produto (SANTOS et al., 2006), representando um importante parâmetro a ser considerado no desenvolvimento de uma formulação peletizada. No trabalho

conduzido por SERPA (2015), formulações de pellets compostas por celulose microcristalina e diferentes extratos concentrados de Ecobidens®, na presença ou ausência de revestimento polimérico, apresentaram valores de esfericidade entre 0,70 e 0,79, valores próximos ao que foi obtido na formulação F6 deste trabalho.

Comparando-se as 4 formulações apresentadas na Figura 13, pode-se notar que todas apresentaram estreita distribuição de tamanho e tamanho médio próximos ao pretendido (500 µm) (Tabela 2). Tais resultados encontram-se de acordo com a literatura, como pode ser observado, por exemplo, no trabalho de Nasser (2014), em que a formulação peletizada (composta por celulose microcristalina, pectina e etilcelulose) que apresentou distribuição de tamanho estreita ($d_{10} = 268,4$ µm, $d_{50} = 545,4$ µm, $d_{90} = 785,0$ µm) e tamanho médio de 537,2 µm. Uma distribuição de tamanho uniforme é de extrema importância a fim de se prevenir a ocorrência de segregação dos pellets, e conseqüentemente uma variação da dose do ingrediente ativo aplicado (SANTOS et al., 2004).

É importante ressaltar que durante a obtenção das formulações F3, F4, F5 e F6 adicionou-se 5% (p/p) de dióxido de silício durante o processo de esferonização. O dióxido de silício coloidal foi adicionado visando impedir a formação de grandes aglomerados como produto final, fato observado na ausência da adição do mesmo. Uma provável explicação para tal fato está na ação absorvente do dióxido de silício, capaz de controlar a quantidade de líquido na superfície dos extrusados durante a esferonização.

Em consequência de sua maior esfericidade e rendimento, a formulação 6 (V+TD+SiO₂ (78:20:2)) foi selecionada para incorporação do fungo e realização dos demais ensaios.

5.2. *Desenvolvimento de pellets contendo microescleródios*

Para a produção dos 3 lotes de pellets contendo material fúngico foram utilizados meios de cultura líquido produzidos especificamente para cada lote. Os meios de cultura líquidos contendo ME foram caracterizados e os resultados encontram-se expressos na Tabela 3.

Tabela 3. Caracterização de meios de cultura líquidos (MASCARIN et al., 2014) contendo microescleródios de *M. anisopliae* IP 119

Características	Lote 01	Lote 02	Lote 03	Média ± DP
Biomassa do meio líquido (mg/mL)	61,00	63,00	70,60	64,9 ± 5,10
pH do meio líquido	5,02	4,53	4,42	4,66 ± 0,32
Concentração de ME (n° ME/mL)	12600	10200	12800	11866,67 ± 1446,84

Fonte: Próprio autor

Analisando-se o pH do meio de cultura contendo ME, pode-se observar que o mesmo se manteve baixo em todos os lotes produzidos. Tal fato sugere que a produção de ME em condições laboratoriais ocorre em pH ácido.

Já a biomassa presente no meio de cultura líquido (contendo concentração de carbono de 16 g/L e relação C:N de 30:1), variou de 61,0 a 70,6 mg/mL. O acúmulo de biomassa encontrado se apresentou maior do que os valores (9,0-14,0 mg/mL) obtidos por Mascarin et al. (2014). Isso porque, além da análise de cepas diferentes de *M. anisopliae* (CG47, CG168, CG1127), os autores utilizaram meio de cultura líquido contendo relação C:N de 50:1. Enquanto no trabalho conduzido por Paixão (2016), a produção de biomassa de *M. anisopliae* IP119 obtida, utilizando-se meio de cultura líquido de composição idêntica a deste trabalho, se manteve em torno de 45,0 a 65,0 mg/mL, corroborando com os dados apresentados.

A concentração de ME no meio de cultura se apresentou alta, variando de 10.200 a 12.800 ME/mL. Jackson e Jaronski (2009) e Jackson e Jaronski (2012), mostraram que meios de cultura líquidos com maiores concentrações de carbono e baixa ou intermediária concentração de nitrogênio (relação C:N de 30:1 ou 50:1) são capazes de produzir altas concentrações de ME melanizados em menor intervalo de tempo. Segundo estudo de Jackson e Schisler (1995), no qual analisou-se a produção de ME de *Colletotrichum truncatum*, a formação e a melanização de ME estão relacionadas com a depleção de nitrogênio e carbono, respectivamente.

Os lotes dos pellets contendo ME foram caracterizados quanto ao tamanho médio, esfericidade, umidade residual e rendimento, e os resultados podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4. Caracterização dos pellets contendo microescleródios de *M. anisopliae* IP 119

Características	Lote 01	Lote 02	Lote 03	Média ± DP
Tamanho médio (µm)	517,2	532,5	526,9	525,53 ± 7,74
Esfericidade	0,72	0,72	0,71	0,72 ± 0,01
Umidade residual (%)	6,50	6,80	4,10	5,80 ± 1,48
Rendimento (%)	36,00	42,30	45,33	41,21 ± 4,76

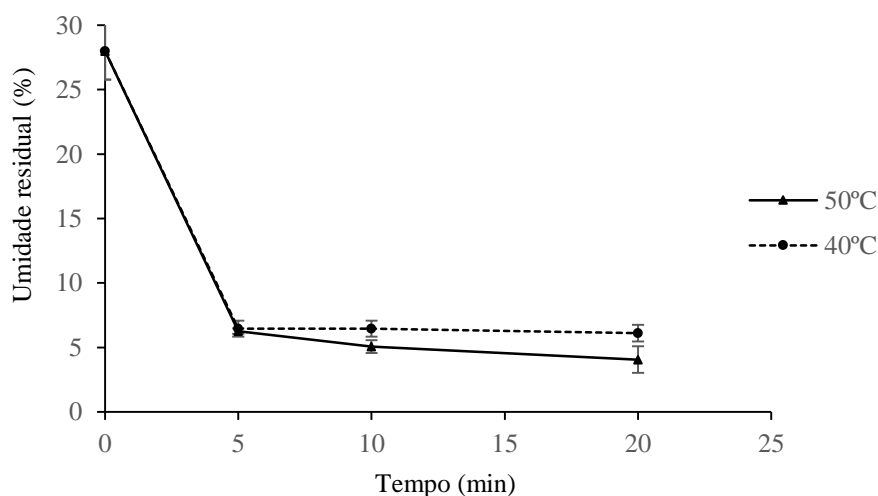
Fonte: Próprio autor

Pode-se notar que, os resultados referentes ao tamanho médio, esfericidade e rendimento dos três lotes produzidos, se mantiveram semelhantes aos valores encontrados na formulação F6 (ver Tabela 2). Tal fato confirma as boas condições dos pellets contendo ME. A umidade residual dos pellets será analisada e discutida na seção 5.3 deste trabalho.

5.3. Avaliação do processo de secagem em leito fluidizado a 40°C e 50°C

Os pellets recém-preparados contendo material fúngico foram imediatamente submetidos ao processo de secagem em leito fluidizado. A influência de duas temperaturas de secagem, 40°C e 50°C, sobre os pellets foi analisada de acordo com 3 parâmetros: umidade residual, produção de conídios e sua viabilidade. O primeiro parâmetro analisado foi a umidade residual média dos pellets, cujos resultados se encontram apresentados na Figura 14.

Figura 14. Conteúdo de umidade residual de pellets F6 contendo microescleródios de *M. anisopliae* IP 119 submetidos à operação de secagem em leito fluidizado a 40°C e a 50°C. Teste de Tukey ($P < 0,05$)



Fonte: Próprio autor

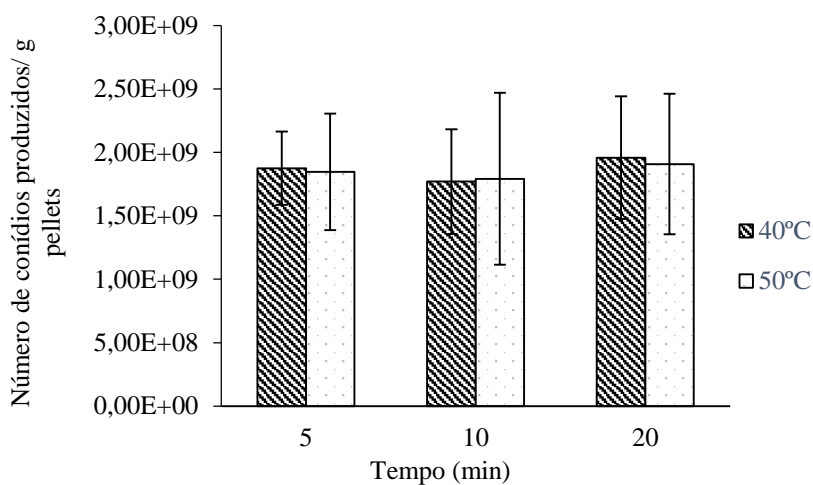
A interação entre tempo e temperatura de secagem ($F= 0,94$, $gl= 3,16$, $P= 0,44$), e a temperatura de secagem isoladamente ($F= 3,21$, $gl= 1,16$, $P= 0,09$), não se mostraram significativas, e a umidade residual dos pellets foi influenciada somente pelo tempo de secagem ($F= 488,7$, $gl= 3,16$, $P<0,0001$). Tal fato pode ser notado na ocorrência de um decréscimo acentuado e significativo da umidade residual média dos pellets nos primeiros 5 minutos do processo de secagem para ambas as temperaturas, passando de uma umidade residual média de 27,98% para 6,27% e 6,45%, nas temperaturas de 50° e 40°C, respectivamente. Já para os tempos maiores de análise não houve alteração significativa da umidade residual dos pellets, em ambas as temperaturas.

Assim, a secagem dos pellets em leito fluidizado por 5 minutos a 40°C ou a 50°C é suficiente para a obtenção de uma umidade residual final adequada. Segundo Mascarin e Quintela (2013), o conteúdo de umidade residual ideal deve permanecer próximo ou inferior a 5%. No Brasil, um país tropical, os produtos podem ser expostos a condições extremas durante armazenamento e transporte e, dessa forma, a umidade residual de uma formulação contendo material biológico é um parâmetro crítico para sua qualidade. De forma geral, um alto conteúdo de umidade do produto final resulta numa baixa estabilidade de armazenamento do mesmo a temperatura ambiente (MASCARIN et al., 2014).

A secagem em leito fluidizado ainda proporciona vantagens, quando comparada à secagem por leito estático e por liofilização, que estão relacionadas à alta transferência de calor e massa, e a redução uniforme da umidade residual do material (SIVAKUMAR et al., 2016). Em suma, esse tipo de operação resulta em uma secagem mais uniforme em um menor período.

A produção de conídios a partir dos pellets secos (Figura 15) foi similar para ambas as temperaturas analisadas, permanecendo na faixa de $1,85$ a $1,97 \times 10^9$ conídios/grama de pellets. Adicionalmente, dentro da mesma temperatura, os valores de produção de conídios foram semelhantes em todo o ensaio. Não houve perda considerável de viabilidade dos conídios, a qual permaneceu superior a 93% em todos os tempos e para ambas as temperaturas estudadas.

Figura 15. Avaliação do processo de secagem em leito fluidizado a 40°C e a 50°C de pellets da formulação F6 contendo microescleródios – Avaliação da produção de conídios por grama de pellets.



Fonte: Próprio autor

Os dados obtidos na avaliação da operação de secagem indicaram que o processo de secagem em leito fluidizado não afetou a viabilidade dos microescleródios em função da elevada produção e viabilidade dos conídios de *M. anisopliae* IP119, observadas nas diferentes temperaturas e tempos de processamento dos pellets. Tal fato corrobora com os resultados publicados por Jackson e Jaronski (2009), em que grânulos compostos por TD contendo ME de diferentes isolados de *M. anisopliae* foram capazes de produzir cerca de 0,9 a 1,4 x10⁹ conídios/grama de formulação após secagem à temperatura ambiente.

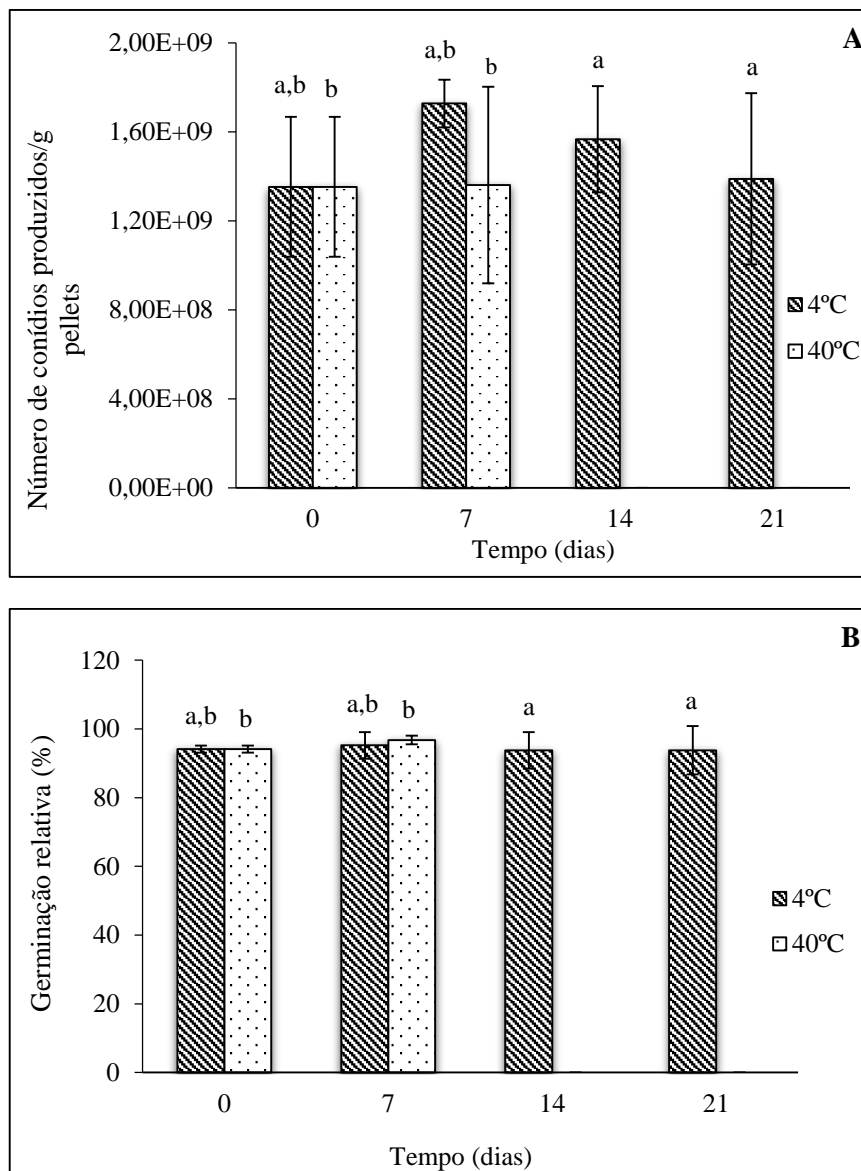
Por outro lado, Horaczek e Viernstein (2004) analisaram a influência da secagem em leito fluidizado de suspensões de conídios de *M. anisopliae* e relataram que após cerca de 6 minutos de secagem, com temperatura do ar de saída próxima a 42°C, observou-se uma queda acentuada da viabilidade conidial, com taxa de germinação de 4,8%. Vale ressaltar que as diferenças observadas entre o trabalho de Horaczek e Viernstein (2004) e o presente trabalho podem ser explicadas pela natureza distinta do propágulo (microesclerórios x conídios) e do material a ser seco (sólido x suspensão).

5.4. Estabilidade de armazenamento

Os pellets contendo ME, acondicionados em tubos Falcon fechados, foram armazenados em câmara climática a 40°C e 75% UR, e em 4°C em refrigerador. A

influência da condição de armazenamento sobre a produção e viabilidade dos conídios está apresentada na Figura 16.

Figura 16. Estabilidade de armazenamento de pellets contendo microescleródios de *M. anisopliae* IP119 armazenados a 4°C e a 40°C. (A) Produção de conídios; (B) Viabilidade de conídios. Letras iguais indicam que não há diferença estatística entre as médias. ANOVA e Teste de Tukey ($P < 0,05$)



Fonte: Próprio autor

Quando os pellets foram submetidos a condições extremas de temperatura e umidade (40°C, 75% UR), só foi possível obter resultados até o 7º dia de armazenamento, devido à ocorrência de contaminação da formulação nos intervalos de tempo superiores. Nesse período de 7 dias, a produção e a viabilidade de conídios (cerca de $1,36 \times 10^9$ conídios por grama de pellets e 96,8%, respectivamente) não apresentaram diferenças significativas em relação aos pellets recém-preparados ($1,35 \times 10^9$ conídios/g de pellets e

94,1% de germinação). Comparando-se a produção ($t = 1,399$, $gl = 4$, $P = 0,235$) e a viabilidade ($t = 0,66$, $gl = 4$, $P = 0,546$) de conídios nos pellets recém-preparados e após 7 dias de armazenamento, entre as temperaturas de 4°C e 40°C, os resultados obtidos também se apresentaram similares.

A contaminação ocorre, provavelmente, devido ao processo de obtenção e armazenamento dos pellets não ser um processo estéril. Acredita-se que o fungo contaminante seja mais adaptado às condições do armazenamento (temperatura e umidade elevadas), conseqüentemente se proliferando em maior quantidade e mais rápido, resultando na inibição do crescimento de *M. anisopliae*. Um meio de se evitar tal situação é o armazenamento das formulações em embalagens à vácuo.

No armazenamento à temperatura de 4°C foi possível obter dados relativos a todos os intervalos de tempo analisados, indicando que nessa temperatura não há contaminação por outros fungos. Durante os 21 dias analisados não houve diferença significativa entre os resultados obtidos para a produção de conídios ($F = 1,14$, $gl = 3,8$, $P = 0,389$) que variou de 1,35 a $1,73 \times 10^9$ conídios produzidos/grama de pellets, e a viabilidade de conídios, que permaneceu na faixa de 93 a 95%, mostrando que, quando armazenada sob tais condições de tempo e temperatura, a formulação se mantém estável.

Em um trabalho conduzido por Mascarin et al. (2014), a estabilidade de armazenamento a 26°C e -20°C de grânulos compostos por TD contendo ME de *Metarhizium* spp. revelou que a formulação se manteve estável, em relação à produção e à viabilidade de conídios, em ambas as temperaturas por um período de 3,5 meses.

5.5. Tolerância de conídios de *M. anisopliae* à radiação UV-B

Os conídios de *M. anisopliae* foram expostos à radiação UV-B, sendo posteriormente avaliados quanto a porcentagem de germinação relativa (viabilidade). Os dados obtidos estão expressos na Tabela 5.

Tabela 5. Tempo de exposição, dose e germinação relativa referentes ao ensaio de tolerância de conídios de *M. anisopliae* IP119 expostos à UV-B [irradiância de 541,54 mW/m² segundo Quate et al. (1992)]

Tempo de exposição (minutos)	Dose (kJ/m²)	Germinação Relativa (%) ± DP
20	0,65	99,78 ± 1,36
40	1,30	98,32 ± 1,74
60	1,95	97,53 ± 3,57
80	2,60	96,52 ± 3,16
100	3,25	94,70 ± 1,33
120	3,90	90,41 ± 1,84
140	4,55	73,11 ± 8,72
160	5,20	67,44 ± 7,83
180	5,85	37,78 ± 7,72
200	6,50	16,85 ± 9,67
220	7,15	4,74 ± 2,56
240	7,80	0

Fonte: Próprio autor

É possível observar que o aumento no tempo e, conseqüentemente, da dose aplicada resultou na redução da viabilidade dos conídios, até que ao fim de 240 min de exposição não foi mais possível observar germinação conidial. Braga et al. (2001), analisaram o efeito da radiação UV-B (1200 mW/m²) sobre diferentes isolados de *Metarhizium*, dentre eles ARSEF 324 (*M. acridum*), ARSEF 2575 e ARSEF 23 (ambos *M. robertsii*) e observaram redução da viabilidade dos conídios, conforme a dose foi aumentada. Esses autores relataram ainda que isso ocorreu independentemente do nível de tolerância de cada isolado.

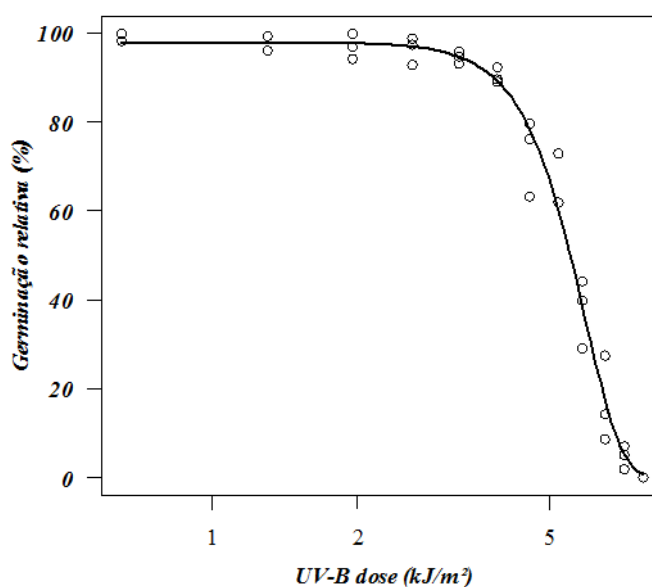
Com exceção do ARSEF 324 que, após 6 horas de exposição, ainda apresentava 55% de germinação relativa (após 48 horas de incubação), os demais isolados já apresentavam ausência completa de germinação nesse período. Isso mostra, que os isolados ARSEF 2575 e ARSEF 23, assim como o isolado IP 119 utilizado neste trabalho, apresentam-se sensíveis à radiação UV-B, com decréscimo importante na germinação, mesmo após poucas horas de exposição, indicando uma provável redução da eficácia de tais propágulos após aplicação.

Outro fato observado por Braga et al. (2001), foi o atraso de germinação provocado pela exposição à radiação. O ARSEF 324 apresentou, após 1 hora de irradiação, germinação relativa de 4, 97 e 100% após 12, 24 e 48 horas de incubação, respectivamente. Os autores acreditam que tal atraso se deve aos danos ocasionados pela

radiação UV-B ao material genético do fungo, que resultam em interrupção do ciclo celular, cujo processo de reparo só tem início com a etapa de germinação. No presente trabalho, o tempo de incubação após a exposição (48 horas) foi prolongado e possivelmente deve ter influência mínima sobre os efeitos observados.

A dose letal mediana (DL50), ou seja, a dose de radiação necessária para inviabilizar 50% dos conídios submetidos ao ensaio, foi calculada a partir da construção da curva de Dose (kJ/m^2) x Germinação Relativa (%), ajustada pelo modelo de Weibull com três parâmetros (Figura 17).

Figura 17. Curva de tolerância à radiação UV-B de conídios de *M. anisopliae* IP119 expostos a doses crescentes de radiação UV-B em condições laboratoriais. A curva foi ajustada pelo modelo de Weibull com três parâmetros, o qual pode ser descrito como: $y = 97,92 * \exp(-\exp(5,72(\log(x) - \log(5,91))))$



Fonte: Próprio autor

A DL50 estimada de UV-B para conídios de *M. anisopliae* IP 119 foi de $5,545 \pm 0,059 \text{ kJ/m}^2$ (intervalo de confiança 95%: 5,42 – 5,67). Estudo conduzido por Galvão e Bettioli (2014), analisando a sensibilidade de isolados de *Lecanicillium* spp. expostos à radiação UV-B, com valor de radiação próximo ao utilizado neste trabalho (542 mW/m^2), mostrou que a cepa mais resistente, a CCMA- 1143, apresentou DL50 estimada em $1,63 \text{ kJ/m}^2$, mostrando maior sensibilidade à radiação UV-B quando comparada ao *M. anisopliae* IP 119.

5.6. Tolerância de pellets contendo ME de *M. anisopliae* à radiação UV-B

Os pellets contendo ME de *M. anisopliae* IP 119 foram expostos a doses crescentes de radiação UV-B e os resultados referentes à produção e germinação relativa de conídios obtidos a partir dos pellets estão expressos na Figura 18 e Tabela 6, respectivamente.

Tabela 6. Tempo de exposição, dose e germinação relativa de conídios referentes ao ensaio de tolerância de pellets contendo microescleródios de *M. anisopliae* IP119 expostos à UV-B [irradiância de 1239,23 mW/m² segundo Quaitte et al. (1992)]

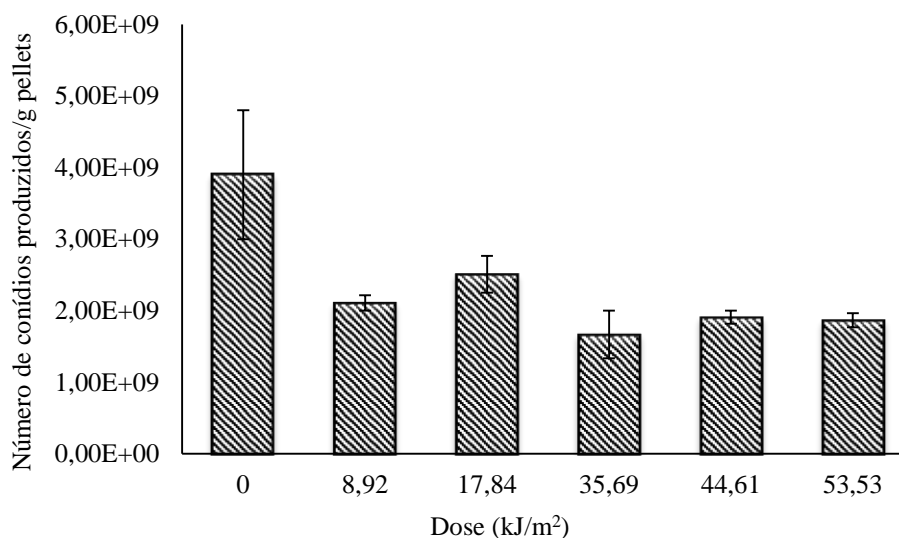
Tempo de exposição (minutos)	Dose (kJ/m ²)	Germinação Relativa (%) ± DP
120	8,92	100 ± 0,24
240	17,84	100 ± 0,24
480	35,69	99,50 ± 0,24
600	44,61	98,82 ± 0,24
720	53,53	98,15 ± 0,23

Fonte: Próprio autor

De acordo com a Tabela 6, pode-se notar que mesmo após 12 horas de exposição à radiação UV-B, equivalente a uma dose de 53,53 kJ/m², a germinação de conídios obtidos a partir de pellets contendo ME de *M. anisopliae* permaneceu alta (~98%). Fato contrário ao que se observa quando apenas conídios do mesmo fungo (ver seção 4.4) são expostos a uma dose bastante inferior (7,8 kJ/m²). Estudo publicado por Song et al. (2016), comparou a tolerância de conídios e microescleródios de *Purpureocillium lilacinum* à radiação UV-B (doses variando de 0-19,44 kJ/m²) e mostrou que os conídios apresentam maior sensibilidade à radiação do que os ME, uma vez que apresentaram menor porcentagem de germinação para todas as doses analisadas. Dessa forma, sugere-se que a maior tolerância dos conídios obtidos a partir dos pellets pode estar relacionada a presença dos ME e a sua inserção na estrutura granular.

Por outro lado, foi possível observar uma redução significativa na produção de conídios obtidos a partir dos pellets contendo ME (Figura 18) expostos à radiação UV-B por período igual ou superior a 8 horas, equivalente às doses de 35,69, 44,61 e 53,53 kJ/m² ($P = 0,0157, 0,0362, 0,0320$, respectivamente), quando comparado ao controle não-irradiado ($3,9 \times 10^9$ conídios produzidos/g pellets). No entanto, mesmo com a redução observada, a produção de conídios a partir dos pellets ainda pode ser considerada alta ($1,67- 2,5 \times 10^9$ conídios produzidos/g pellets).

Figura 18. Produção de conídios a partir de pellets contendo microescleródios de *M. anisopliae* expostos à radiação UV-B [1239,23 mW/m² segundo Quaité et al. (1992)]



Fonte: Próprio autor

Os resultados obtidos indicam que a radiação UV-B afeta principalmente aqueles ME presentes na superfície dos pellets, sugerindo a necessidade de extenso período de exposição para que ocorra a penetração da radiação na estrutura dos pellets. Com isso, os pellets podem se apresentar como forma adicional de proteção aos propágulos fúngicos, podendo ser considerados veículos eficazes para fungos entomopatogênicos usados no controle biológico de pragas no solo, como o *R. microplus*.

Por fim, vale ressaltar que no presente trabalho não foi realizado ensaio para avaliar a eficácia da formulação de pellets contendo ME sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, pois tal ensaio foi conduzido por Paixão (2016), e mostrou que, em solo estéril, a formulação foi capaz de reduzir a eclosão de larvas em cerca de 80%, quando comparada ao controle, e causou 100% de mortalidade das fêmeas ingurgitadas, comprovada pelo início da conidiogênese sobre as mesmas.

6 CONCLUSÕES

- 1) A mistura de vermiculita, terra diatomácea e dióxido de silício coloidal (78:20:2) resultou em pellets com tamanho médio, distribuição de tamanho e esfericidade adequados.
- 2) O fungo *M. anisopliae* IP119 permaneceu viável após a operação de secagem dos pellets contendo ME em leito fluidizado.
- 3) A produção e viabilidade de conídios se manteve por 21 dias, quando os pellets foram armazenados a 4°C.
- 4) Pellets contendo ME de *M. anisopliae* IP119 foram capazes de manter alta produção e viabilidade de conídios mesmo após a 12 horas de radiação UV-B.
- 5) Os conídios de *M. anisopliae* IP119 se mostraram mais sensíveis à radiação UV-B, com ausência de germinação após 4 horas de exposição.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: Alves, S. B. (Ed.), **Controle microbiano de insetos**. FEALQ: Piracicaba, p.289–382, 1998.

ALVES, R. T.; BATEMAN, R. P. Development of mycopesticides formulations and application techniques. In International Congress of Entomology, 21; Brazilian Congress Entomology, 18., 2000, Foz de Iguassu. Abstracts. Londrina: **Embrapa Soja**, 2000.

ALVES, R. T.; BATEMAN, R. P.; GUNN, J.; PRIOR, C.; LEATHER, S. R. Effects of different formulations on viability and medium-term storage of *Metarhizium anisopliae* conidia. **Neotropical Entomology**, v. 31, n. 1, p. 91-99, 2002.

ÁNGEL-SAHAGÚN, C. A.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, MOLINA-OCHOA, R.; PESCADOR-RUBIO, J. A.; SKODA, S. R.; CRUZ-VÁZQUEZ, C.; LORENZONI, A.G.; GALINDO-VELASCO, E.; FRAGOSO-SÁNCHEZ, H.; FOSTER, J. E. Virulence of Mexican isolates of entomopathogenic fungi (Hypocreales: Clavicipitaceae) upon *Rhipicephalus = Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) larvae and the efficacy of conidia formulations to reduce larval tick density under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v.170, p. 278–286, 2010.

ANGELO, E. A.; VILAS-BÔAS, G. T.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 4, p. 945-958, 2010.

ANGELO, I. C.; BITTENCOURT, V. R. E. C. Utilização de fungos entomopatogênicos para o controle de carrapatos. In: Controle de carrapatos nas pastagens, Nova Odessa, 2013.

ANGELO, I. C.; FERNANDES, É. K. K.; BAHIENSE, T. C.; PERINOTTO, W. M. S.; MORAES, A. P. R.; TERRA, A. L. M.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Efficiency of *Lecanicillium lecanii* to control the tick *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 172, n. 3–4, p. 317-322, 2010.

ARAÚJO JÚNIOR, C. A. Desenvolvimento e avaliação de pellets contendo extrato de *Pothomorphe umbellata* (pariparoba) via extrusão esferonização. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 107 p., 2011.

ARRUDA, W.; BECK, I. L.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. **Experimental and Applied Acarology**, v. 37, p. 231–244, 2005.

ATHAYDE, A.C.R; FERREIRA, U.L; LIMA, E.A.L.A. Fungos entomopatogênicos: Uma alternativa para o controle do carrapato bovino - *Boophilus microplus*. **Biociência**, n. 21, p.12-15, 2001

BASIT, A. W.; NEWTON, J. M.; LACEY, L. F. Formulation of ranitidine pellets by extrusion-spheronization with little or no microcrystalline cellulose. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 4, n. 4, p. 499 - 505, 1999.

- BASSO, L. M. S., MONTEIRO, A. C., BELO, M. A. A., SOARES, V. E., GARCIA, M. V., MOCHI, D. A. Controle de larvas de *Boophilus microplus* por *Metarhizium anisopliae* em pastagens infestadas artificialmente. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 595–600, 2005.
- BEHLE, R. W.; JACKSON, M. A. Effect of fermentation media on the production, efficacy, and storage stability of *Metarhizium brunneum* microsclerotia formulated as a prototype granule. **Biological and Microbial Control**, v. 107, n. 2, p. 582-590, 2014.
- BISCHOFF, J. F.; REHNER, S. A.; HUMBER, R. A. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia**, v. 101, n. 4, p. 512–530, 2009.
- BITTENCOURT, V. R. E. P., BAHIENSE, T. C., FERNANDES, E. K. K., SOUZA, E. J. Avaliação da ação in vivo de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1979) Sorokin, 1983 aplicado sobre *Brachiaria decumbens* infestada com larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 12, p. 38–42, 2003;
- BOFF, C. Monitoramento de fungos no ar de unidades de terapia intensiva. Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Ciência Pneumológicas. Porto Alegre, 71p., 2011.
- BRAGA, G. U. L.; FLINT, S. D.; MILLER, C. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Variability in Response to UV-B among Species and Strains of *Metarhizium* Isolated from Sites at Latitudes from 61°N to 54°S. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 78, p. 98–108, 2001.
- BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. CENSO 2010. Disponível em: <http://censo2010.ibge.gov.br/noticiascenso?view=noticia&id=1&idnoticia=2591&busca=1&t=2013-pib-cresce-2-3-totaliza-r-4-84-trilhoes>, acesso em 30/11/2014 às 21:13h.
- BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Economia. Produção da Pecuária Municipal – 2012. *Prod. Pec. munic.*, Rio de Janeiro, v. 40, p.1-71, 2012. Disponível em: ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2012/ppm2012.pdf, acesso em 30/11/2014 às 21:34h.
- CAMARGO, M. G.; GOLO, P. S.; ANGELO, I. C.; PERINOTTO, W. M. S.; SÁ, F. A.; QUINELATO, S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Effect of oil-based formulations of acaripathogenic fungi to control *Rhipicephalus microplus* ticks under laboratory conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 188, p. 140– 147, 2012.
- CAMARGO, M. G.; MARCIANO, A. F.; SÁ, F. A.; PERINOTTO, W. M. S.; QUINELATO, S.; GÔLO, P. S.; ANGELO, I. C.; PRATA, M. C. A.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Commercial formulation of *Metarhizium anisopliae* for the control of *Rhipicephalus microplus* in a pen study. **Veterinary Parasitology**, v. 205, n. 1–2, p. 271-276, 2014.
- CHAMSAI, B.; SRIAMORNSAK, P. Novel disintegrating microcrystalline cellulose pellets with improved drug dissolution performance. **Powder Technology**, v. 233, p. 278–285, 2013.

CHANDLER, D.; DAVIDSON, G.; PELL, J. K.; BALL, B. V.; SHAW, K.; SUNDERLAND, K. D. Fungal Biocontrol of Acari. **Biocontrol Science and Technology**, v. 10, p. 357-384, 2000.

CURBELO, F. D. S. Estudo da remoção de óleo em águas produzidas na indústria de petróleo, por adsorção em coluna utilizando a vermiculita expandida e hidrofobizada. Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química. Natal, 102 p., 2002.

DALZOTO, P.R.; UHRY, K.F. Controle biológico de pragas no Brasil por meio de *Beauveria bassiana* (bals.) Vuill. **Biológico**, v.71, n.1, p.37-41, 2009;

DUKIC´, A.; MENS, R.; ADRIAENSENS, P.; FOREMAN, P.; GELAN, J.; REMON, J. P.; VERVAET, C. Development of starch-based pellets via extrusion/spheronisation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 63, p. 83-94, 2007.

DUKIC´-OTT, A.; REMON, J. P.; FOREMAN, P.; VERVAET, C. Immediate release of poorly soluble drugs from starch-based pellets prepared via extrusion/spheronisation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, p. 715–724, 2007.

DUKIC´-OTT, A.; THOMMES, M.; REMON, J. P., KLEINEBUDDE, P.; VERVAET, C. Production of pellets via extrusion–spheronisation without the incorporation of microcrystalline cellulose: A critical review. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, p. 38–46, 2009.

ESTRADA-PEÑA, A.; BOUATTOR, A.; CAMICAS, J. L.; GUGLIELMONE, A.; HORAK, I.; JONGEJAN, F.; LATIF, A.; PEGRAM, R.; WALKER, A. R. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. **Experimental & Applied Acarology**, v. 38, n. 2-3, p. 219-235, 2006.

FARIA, M. R. de; WRAIGHT, S. P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, v.43, n.3, p.237-256, 2007.

FERNANDES, É. K. K.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Entomopathogenic fungi against South American tick species. **Experimental & Applied Acarology**, v. 46, p. 71-93, 2008.

FERNANDES, É. K. K.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; ROBERTS, D. W. Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. **Experimental Parasitology**, v. 130, n. 3, p. 300-305, 2012.

FERRETO, R. Revisão de literatura sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Monografia. Faculdade de Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 46p., 2013

FRANQUE, M. P. Aspectos biológicos da fase parasitária e não parasitária de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari :Ixodae) mediante infestações experimentais em equinos. Dissertação. Instituto de Veterinária. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 58p., 2007;

FURLONG, J. Carrapatos: problemas e soluções. **Embrapa Gado de Leite**, 65 p., 2005.

- GALVÃO, J. A. H.; BETTIOL, W. Effects of UV-B radiation on *Lecanicillium* spp., biological control agents of the coffee leaf rust pathogen. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, n. 5, p. 392-400, 2014.
- GARCIA, G. R. Identificação de antígenos do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* por soros de bovinos geneticamente resistentes e suscetíveis ao parasita. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada. Faculdade de Medicina. Ribeirão Preto. São Paulo, 105 p., 2009.
- GOULART, M. R.; SILVEIRA, C. B.; CAMPOS, M. L.; ALMEIDA, J. A.; MANFREDI-COIMBRA, S.; OLIVEIRA, A. F. Metodologias para reutilização do resíduo de terra diatomácea, proveniente da filtração e clarificação da cerveja. **Química Nova**, v. 34, n.4, p. 625-629, 2011.
- GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. D. S.; BARROS, A. T. M. D.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H. D.; LEÓN, A. A. P. D.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 150-156, 2014.
- GUPTA, V. K.; MISRA, A. K.; GAUR, R. K. Growth characteristics of *Fusarium* spp. causing wilt disease in *Psidium guajava* l. in Índia. **Journal of Plant Protection Research**, v. 50, p. 451-462, 2010.
- HOOGSTRAAL, H.; WASSEF, H. Y. *Dermacentor (Indocentor) atrosignatus* (Acari: Ixodoidea: Ixodidae): hosts and distribution in the malay peninsula, indonesia, borneo, and southern philippines. **Journal of Medical Entomology**, v. 22, n. 6, p. 644-647, 1985.
- HORACZEK, A.; VIERNSTEIN, H. Comparison of three commonly used drying technologies with respect to activity and longevity of aerial conidia of *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. **Biological Control**, v. 31, n.1, p. 65-71, 2004.
- HUSHEM, F. S.; AMIM, M. S.; EL-GAMAL, S. M. A. Chemical activation of vermiculite to produce highly efficient material for Pb²⁺ and Cd²⁺ removal. **Applied Clay Science**, v. 115, p. 189-200, 2015.
- JACKSON, M. A.; DUNLAP, C. A.; JARONSKI, S. T. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. **BioControl**, v. 55, p.129–145, 2010.
- JACKSON, M. A; JARONSKI, S. T. Development of pilot-scale fermentation and stabilisation processes for the production of microsclerotia of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* strain F52. **Biocontrol Science and Technology**, v. 22, n. 8, p. 915-930, 2012.
- JACKSON, M. A; JARONSKI, S. T. Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. **Mycological Research**, v.113, n.8, p.842–850, 2009;
- JACKSON, M. A.; SCHISLER, D. A. Liquid culture production of microsclerotia of *Colletotrichum truncatum* for use as bioherbicidal propagules. **Mycological Research**, v. 99, p. 879–884, 1995.
- JARONSKI, S. T.; JACKSON, M. A. Efficacy of *Metarhizium anisopliae* microsclerotial granules. **Biocontrol Science and Technology**, v. 18, n. 8, p. 849-863, 2008.

JESUS, A.F de. Envolvimento da *gsk3 β* no desenvolvimento embrionário do carrapato *R.(Boophilus) microplus*: Efeito do silenciamento por RNAi em fêmeas parcialmente ingurgitadas e sua regulação por cálcio nas células embrionárias BME26. Dissertação. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 66p., 2010.

KASSAB, S. O.; FONSECA, P. R. B.; ROSSONI, C.; BARBOSA, R. H.; LOUREIRO, E. S. Isolados de fungos entomopatogênicos no controle do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Verde**, v. 6, n. 3, p. 222-225, 2011.

KOBORI, N. N.; MASCARIN, G. M.; JACKSON, M. A.; SCHISLER, D. A. Liquid culture production of microsclerotia and submerged conidia by *Trichoderma harzianum* active against damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani*. **Fungal Biology**, v.119, p. 179-190, 2015.

KOESTER, M.; THOMMES, M. New Insights into the Pelletization mechanism by extrusion/spheronization. **AAPS PharmSciTech**, n. 4, v. 11, 2010.

KURÓNIC, Z. Diatomaceous Earths – Natural Insecticides. **Pesticides and Phytomedicine**, v.28, n.2, p. 77-95, 2013.

LACEY, L. A.; GRZYWACZ, D.; SHAPIRO-ILAN, D. I.; FRUTOS, R.; BROWNBRIDGE, M.; GOETTEL, M.S. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 132, p. 1–41, 2015.

LIEW, C. V.; GU, L.; SOH, J. L. P.; HENG, P. W. S. Functionality of cross-linked Polyvinylpyrrolidone as a spheronization aid: A promising alternative to microcrystalline cellulose. **Pharmaceutical Research**, v. 22, n. 8, 2005.

LONC, E.; GUZ-REGNER, K.; KIEWRA, D.; SZCZEPAŃSKA, A. Insight into tick biocontrol with special regard to fungi. **Annals Of Parasitology**, v. 60, n. 3, p. 169-177, 2014.

MAIA, T. F. *Aspergillus* da seção *Nigri* de interesse biotecnológico isolados de solo e serrapilheira. Dissertação. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada. Seropédica, 94 p., 2014.

MARTINS, M. K. Variabilidade genética de isolados de *Fusarium* spp. e estudo da interação com a planta hospedeira. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 110 p., 2005.

MASCARIN, G. M.; KOBORI, N. N.; VITAL, R. C. J.; JACKSON, M.A.; QUINTELA, E.D. Production of microsclerotia by Brazilian strains of *Metarhizium* spp. using submerged liquid culture fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.30, n.5, p.1583-1590, 2014.

MASCARIN, G. M.; QUINTELA, E. D. Técnica de Produção do Fungo Entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* para Uso em Controle Biológico. Documentos 289. Embrapa Arroz e Feijão. Santo Antônio de Goiás, 17p., 2013. Disponível em: http://www.cnpaf.embrapa.br/transferencia/informacoestecnicas/publicacoesonline/serie_documentos_289.pdf. Acesso em: 20/01/2017.

MEYLING, N.V; EILENBERG, J. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. **Biological Control**, v. 43, p.145–155, 2007.

MONTEIRO, C. M. D. O.; MATOS, R. D. S.; ARAÚJO, L. X.; CAMPOS, R.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; DOLINSKI, C.; FURLONG, J.; PRATA, M. C. D. A. Entomopathogenic nematodes in insect cadaver formulations for the control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 203, n. 3–4, p. 310-317, 2014.

MURRELL, A., BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Kock 1844 (Acari: Ixodidae). **Systematic Parasitology**, v. 56, p. 169-172, 2003.

MUNIZ, E. R. Termotolerância de *Metarhizium* spp. e efeito de sua formulação sobre a virulência para *Rhipicephalus microplus* expostos à condições estressantes de temperatura e umidade. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro. Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 75 p., 2015.

MONTEIRO, C. M. O.; PRATA, M. C. A.; FURLONG, J.; FAZA, A. P.; MENDES, A. S.; ANDALÓ, V.; MOINO-JUNIOR, A. *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditidae: Heterorhabditidae), strain RSC-5, for biological control of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 106, n. 4, p. 821-826, 2010.

NAVES, L. N. Desenvolvimento de pellets e comprimidos matriciais de etilcelulose para liberação cólon-específica de fármacos. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 83p., 2014.

OLIVEIRA, D. G. P.; ALVES, L. F. A. Interação do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. com terra diatomácea para o controle de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae), o cascudinho dos aviários. **Bioassay**, v. 2, n. 6, p. 1-7, 2007.

OTTATI-DE-LIMA, E. L. Produção de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. em diferentes substratos e efeito da radiação ultravioleta e da temperatura sobre estruturas infectivas desses entomopatógenos. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Agrônômicas. Universidade Estadual de São Paulo. Botucatu, 92p., 2007.

PAIXÃO. F. R. S. Formulação peletizada de *Metarhizium* spp.: Produção, termotolerância e potencial no controle de *Rhipicephalus microplus*. Dissertação. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Universidade Federal de Goiás, 60p., 2016.

PARRA, J.R.P; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. Controle biológico: terminologia, p. 1-16. IN: PARRA, J.R.P; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. (eds.) Controle biológico no Brasil – parasitoides e predadores. Piracicaba, Ed. Manole, 609p., 2002.

PERALTA, M. M. C. Tratamento químico de uma vermiculita visando seu uso em compósitos de polipropileno. Dissertação. Escola Politécnica de São Paulo. São Paulo, 64p., 2009.

PEREIRA, C.D.; SOUZA, G.R.L. de; BAFFI, M.A. Carrapato dos bovinos: métodos de controle e mecanismos de resistência a acaricidas. Embrapa Cerrados, 2010.

POLAR, P.; KAIRO, M.T.K.; MOORE, D.; PEGRAM, R.; JOHN, S.A. Comparison of water, oils and emulsifiable adjuvant oils as formulating agents for *Metarhizium anisopliae* for use in control of *Boophilus microplus*. **Mycopathologia**, v.160, p.151–157, 2005a.

POLAR, P.; KAIRO, M.T.K.; PETERKIN, D.; MOORE, D.; PEGRAM, R.; JOHN, SALLY-ANN. Assessment of fungal isolates for development of a myco-acaricide for cattle tick control. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.5, n.3, p.276-284, 2005b.

QUAITE, F. E.; SUTHERLAND, B. M.; SUTHERLAND, J. C. Action spectrum for DNA damage in alfafa lowers predicted impact of ozone depletion. **Nature**, v.358, p. 576–578, 1992.

R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2015. Disponível em: <http://www.R-project.org/>

RAMANUJAM, B.; RANGESHWARAN, R.; SIVAKMAR, G.; MOHAN, M.; YANDIGERI, M. S. Management of Insect Pests by Microorganisms. **Proceedings of the Indian National Science Academy**, v. 80, n. 2, p. 455-471, 2014.

RANGEL, D. E. N.; ROBERTS, D. W. Inducing UV-B tolerance of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* conidia results in a trade-off between conidial production and conidial stress tolerance. **Journal of Anhui Agricultural University**, v. 34, n.2, p.195-202.

RATUL, D.; BAQUEE, A. A. Pellets and pelletization techniques: a critical review. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 3, n. 4, 2013.

RECK, J.; KLAFKE, G. M.; WEBSTER, A.; DALL'AGNOL, B.; SCHEFFER, R.; SOUZA, U. A.; CORASSINI, V. B.; VARGAS, R.; DOS SANTOS, J. S.; DE SOUZA MARTINS, J. R. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: A field tick population resistant to six classes of acaricides. **Veterinary Parasitology**, v. 201, n. 1–2, p. 128-136, 2014.

REIS, R. C. S.; FERNANDES, E. K. K.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Effect of fungal formulations on viability of engorged females of *Rhipicephalus sanguineus*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1149, p.239-241, 2008.

RIBEIRO, V. L. S.; SANTOS, J. C.; BORDIGNON, S. A. L.; APEL, M. A.; HENRIQUES, A. T.; VON POSER, G. L. Acaricidal properties of the essential oil from *Hesperozygis ringens* (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Bioresource Technology**, v.101, p. 2506–2509, 2010.

RITZ, C.; STREIBIG, J. C. Bioassay Analysis using R. **Journal of Statistical Software**, v. 12, n. 5, p. 1–22, 2005.

ROBERTS, D. W.; ST. LEGER, R. J. *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect -pathogenic fungi: mycological aspects. **Advances In Applied Microbiology**, v. 54, 2004.

ROCHA, L. F. N.; INGLIS, P. W., HUMBER, R. A.; KIPNIS, A.; LUZ, C. Occurrence of *Metarhizium* spp. in Central Brazilian soils. **Journal of Basic Microbiology**, v.53, p. 251–259, 2013.

RONGTHONG, T.; SUNGTHONGJEEN, S.; SIEPMANN, F.; SIEPMANN, J.; PONGJANYAKUL, T. Quaternary polymethacrylate – magnesium aluminum silicate films: Water uptake kinetics and film permeability. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 490, p. 165-172, 2015.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. Handbook of pharmaceuticals excipients. **Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association**, 9 ed., 917p., 2009.

SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I. Biological control of ticks. **Parasitology**, v. 129, n. S1, p. S389-S403, 2004.

SANTOS, H. M. M.; VEIGA, F. J. B.; PINA, M. E. T.; SOUSA, J. J. M. S. Obtenção de *pellets* por extrusão e esferonização farmacêutica. Parte I. Avaliação das variáveis tecnológicas e de formulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 4, 2004.

SANTOS, H. M. M.; VEIGA, F. J. B.; PINA, M. E. T.; SOUSA, J. J. M. S. Obtenção de *pellets* por extrusão e esferonização farmacêutica. Parte II. Avaliação das características física de pellets. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 3, 2006.

SANTOS, L. B. dos. Prospecção de compostos bioativos de plantas nativas do cerrado e pantanal sul-mato-grossense com ação sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Campo Grande, 133 p., 2013.

SANTOS, T. R. B.; FARIAS, N. A. R.; CUNHA FILHO, N. A.; PAPPEN, FELIPE G.; VAZ JUNIOR, I. S. Abordagem sobre o controle do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 65-70, 2009.

SCHAMNE, P. A. Efeito de aditivos e fishfertilquitosana® em meios sólidos na produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Beauveria bassiana* (bals.) Vuillemin. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Estadual do Centro-Oeste. Guarapuava, 48p., 2010.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; RIE, J. V.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 62, n. 3, 1998.

SCHOLTE, E. J.; KNOLS, B. G. J.; SAMSON, R. A.; TAKKEN, W. Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. **Journal of Insect Science**, v.4, n.19, 2004.

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. **Toxicon**, v.56, p. 1267-1274, 2010.

SERPA, R. C. Desenvolvimento de pellets revestidos para liberação cólon-específica dos polifenóis de *Bidens pilosa* L. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 66p, 2015.

SHEARER, J.F.; JACKSON, M. A. Liquid culturing of microsclerotia of *Mycoleptodiscus terrestris*, a potential biological control agent for the management of hydrilla. **Biological Control**, v. 38, v. 3, p. 298–306, 2006.

- SILVA, A. B.; BRITO, J. M. Controle biológico de insetos-pragas e suas perspectivas para o futuro. *Revista AGROTEC*, v. 36, n. 1, p. 248-258, 2015.
- SILVA, W. O. B. de; SANTI, L.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Metarhizium anisopliae* lipolytic activity plays a pivotal role in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infection. *Fungal Biology*, v. 114, p. 10-15, 2010.
- SIVAKUMAR, R.; SARAVANAN, R.; PERUMAL, A. E.; INIYAN, S. Fluidized bed drying of some agroproducts – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 61, p.280–301, 2016.
- SONG, Z.; SHEN, L.; ZHONG, Q.; YIN, Y.; WANG, Z. Liquid culture production of microsclerotia of *Purpureocillium lilacinum* for use as bionematicide. *Nematology*, v.18, n.6, p. 719 – 726, 2016.
- SONG, Z.; YIN, Y.; JIANG, S.; LIU, J.; WANG, Z. Optimization of culture medium for microsclerotia production by *Nomuraea rileyi* and analysis of their viability for use as a mycoinsecticide. *BioControl*, v. 59, n. 5, p. 597-605, 2014.
- SOUZA, E. J.; COSTA, G. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; FAGUNDES, A. S. Ação do fungo *Beauveria bassiana* associado a gel polimerizado de celulose no controle do carrapato *Anocentor nitens* em teste de campo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 61, p. 163-169, 2009.
- SOUZA, G. P.; FILGUEIRA, M.; ROSENTHAL, R.; HOLANDA, J. N. F. Caracterização de material compósito diatomáceo natural. *Cerâmica*, v. 49, n. 309, p. 40-43, 2003.
- SOUZA, T. S. F. de. Análise funcional do gene *chit1* do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 79 p., 2007.
- STAATS, C. C. Estudo funcional de genes do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 155 p., 2007.
- SUSHMA, R.; BATTU, S.; RAO, V. U. M. A review on pellets and pelletization techniques. *PharmaBiotika*, v. 1, p. 178-187, 2014. Disponível em: <http://pharmabiotikaworld.com/wp-content/uploads/2014/12/R.SUSHMA.PharmaBitika.2014.11.178-187.pdf>. Acesso em: 11/03/2016.
- TEIXEIRA-NETO, E.; TEIXEIRA-NETO, A. A. Modificação química de argilas: desafios científicos e tecnológicos para obtenção de novos produtos com maior valor agregado. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 809-817, 2009.
- TRIVEDI, N. R.; RAJAN, M. G.; JOHNSON, J. R., SHUKLA, A. J. Pharmaceutical approaches to preparing pelletized dosage forms using the extrusion-spheronization process. *Therapeutic Drug Carrier Systems*, v. 24, n. 1, p. 1–40, 2007.
- VEGA, F. E.; GOETTEL, M. S.; BLACKWELL, M.; CHANDLER, D.; JACKSON, M. A.; KELLER, S.; KOIKE, M.; MANIANIA, N. K.; MONZÓN, A.; OWNLEY, B. H.; PELL, J. K.; RANGEL, D. E.N.; ROY, H. E. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology*, v. 2, p. 149 – 159, 2009.

VERÍSSIMO, C. J. Controle de carrapato nas pastagens. Instituto de Zootecnia. Nova Odessa, São Paulo, 99p, 2013. Disponível em: <http://www.iz.sp.gov.br/pdfs/1392745090.pdf>. Acesso em: 11/01/2016.

VERVAET, C.; BAERT, L.; REMON, J. P. Extrusion-spheronisation A literature review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 116, p. 131-146, 1995.

ZHANG, N.; CASTLEBURY L. A.; MILLER, A. N.; HUHNDORF, S. M.; SCHOCH, C. L.; SEIFERT, K. A.; ROSSMAN, A. Y.; ROGERS, J. D.; KOHLMAYER, J.; VOLKMANN-KOHLMEYER, B.; SUNG, G. An overview of the systematics of the Sordariomycetes based on a four-gene phylogeny. **Mycologia**, v. 98, n. 6, p. 1076–1087, 2006.