

## FORMULAÇÕES BIOINSETICIDAS DE *BEAVERIA BASSIANA* A BASE DE NANOCOMPÓSITO POLIMÉRICO VISANDO O CONTROLE DE PRAGA DO COQUEIRO

Diogo P. C. Batista<sup>1</sup>, Rafael da S. Souza<sup>1</sup>, Nereide S. Santos-Magalhães<sup>2</sup>, José G. de Sena-Filho<sup>3</sup>, Adenir V. Teodoro<sup>3</sup>, Luciano A. M. Grillo<sup>1</sup>, Camila B. Dornelas<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Curso de Farmácia - Escola de Enfermagem e Farmácia (EENFAR) - UFAL- AL (dornelascb@yahoo.com.br)

<sup>2</sup>Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) - UFPE - PE

<sup>3</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Tabuleiros Costeiros - SE

Visando a produção de uma formulação capaz de proteger, promover liberação retardada, manter a viabilidade e a virulência de esporos do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* contra insetos-praga que atacam culturas de coqueiro, *Rhynchophorus palmarum*, foram desenvolvidas micropartículas ou *pellets* utilizando-se o nanocompósito polimérico alginato/bentonita como material de núcleo. Os *pellets* foram formados pelo gotejamento em cloreto de cálcio a partir da mistura do material de núcleo e da suspensão de conídios fúngicos em duas diferentes concentrações, séries 1 e 2. Foram avaliados: o percentual de encapsulação de conídios, o índice de intumescimento dos pellets (Ii%) e sua capacidade de liberação in vitro dos conídios da formulação. O nanocompósito mostrou ser uma potencial matriz para *B. bassiana*, no entanto, pelos resultados do presente estudo, concentrações intermediárias de suspensão fúngica devem ser avaliadas para se alcançar o equilíbrio entre a estabilidade dos *pellets* e a liberação modificada do fungo.

**Palavras-chave:** *Beauveria bassiana*. *Rhynchophorus palmarum*. Bioinseticida. Alginato de Sódio. Bentonita Sódica.

### Introdução

A importância do agronegócio do coco é notória para a economia brasileira, especialmente para o Nordeste, onde se concentra mais de 90% da produção nacional. Cultura típica de clima tropical, o cultivo do coco é encontrado em áreas desde o estado do Pará até o Espírito Santo e, em termos de importância econômico-social, assume posição importante como atividade geradora de emprego e renda. No entanto, surtos de pragas em palmeiras, como o coqueiro, comprometem essa cultura e os prejuízos causados pela broca-do-olho-do-coqueiro *Rhynchophorus palmarum* aos produtores de coco têm destaque [1,2]. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) incentiva cada vez mais o uso de inseticidas biológicos, ou bioinseticidas, no combate às pragas nas lavouras. O Agrofit, sistema eletrônico de consulta pública do Ministério da Agricultura (MA), não tem registro de nenhum bioinseticida contra *R. palmarum*. Bioinseticidas a base de fungos entomopatogênicos já são amplamente utilizados no controle microbiano, mas os conídios fúngicos são muito sensíveis a fatores externos (abióticos), como calor, radiação, umidade, variações de pH, portanto sua microencapsulação é desejável, a fim de proteger a matriz fúngica desses fatores, mantendo suas principais características [3,4]. Além disto, pode vir a garantir maior aderência do produto no inseto e/ou no coqueiro, proporcionando maior eficiência na aplicação e maior estabilidade para que possa ser armazenado por um tempo maior. Assim, o presente trabalho propõe o desenvolvimento de bioinseticida de *B. bassiana* sob a forma de *pellets* de nanocompósito polimérico de alginato e bentonita de sódio como materiais de núcleo para investigação contra *R. palmarum*.

### Parte Experimental

**Obtenção da suspensão de conídios.** Culturas do fungo foram obtidas a partir do semeio do isolado CPATC-032 (Embrapa Tabuleiros Costeiros) em placas de Petri contendo meio nutritivo BDA (Batata-Dextrose-Ágar) (Himedia, Índia). As placas foram mantidas em estufa (Solab, Brasil) a 26°C por 7-10 dias e fotoperíodo de 12 horas. As suspensões utilizadas nos experimentos foram preparadas a partir da raspagem de colônias do fungo com alça de platina com ponta em forma de "L" e inoculação em água destilada com Tween 80<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich, Alemanha) a 0,02% como espalhante adesivo. Estas suspensões foram filtradas em gaze estéril para retirada do micélio e a concentração de conídios determinada em câmara de Neubauer (hemacitômetro) (New Optik, Brasil) ao microscópio óptico (Metrimpax Hungary/PZO-Labimex, Polônia).

**Obtenção das formulações bioinseticidas.** Os *pellets* de alginato ou alginato-bentonita contendo *B. bassiana* foram produzidos pelo gotejamento em solução de cloreto de cálcio 0,25 M (Vetec, Brasil) da suspensão obtida pela mistura dos respectivos materiais após 1 hora de agitação a temperatura ambiente [3-7]. A concentração do alginato de sódio (Sigma-Aldrich, Alemanha) foi fixada em 1%. Foram avaliadas como variáveis: a concentração de bentonita sódica (Bentec Laviosa, Itália) (0; 0,5; 2%) e a concentração de conídios (série 1: 2x10<sup>7</sup> e série 2: 6x10<sup>9</sup> conídios/mL),

produzindo, respectivamente: ab0; ab0,5; ab2; AB0; AB0,5; AB2. Os *pellets* foram separados por filtração em papel filtro, lavados 3 vezes com água deionizada e secos em capela de fluxo laminar vertical (Filterflux, Brasil) [5]. Os experimentos foram realizados em triplicata.

*Estimativa do percentual de encapsulação.* Foi obtida por meio da diferença entre a quantidade de conídios inicial e a contagem de conídios no material residual, ou seja, presente no sobrenadante e água de lavagem.

*Determinação do índice de intumescimento ("swelling").* 50 unidades de *pellets* de cada formulação foram separados e pesados para obtenção do peso médio. Em seguida, esta mesma amostra foi imersa em água destilada por um período de 12 horas, seca suavemente e repesada para obtenção do índice de intumescimento (Ii%) (Eq.1), onde  $W_i$  é o peso dos *pellets* após intumescimento e  $W_s$  o peso dos *pellets* secos [6].

$$Ii\% = \frac{W_i - W_s}{W_s} \times 100$$

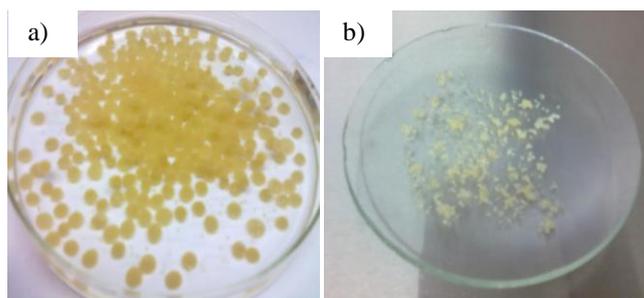
**Equação 1: Índice de intumescimento (Ii%).**

*Estudos de liberação in vitro.* 10 *pellets* foram semeados em BDA, de forma que foram dispostos aleatoriamente em toda extensão da placa. Foi acompanhado o crescimento do fungo por observação visual da germinação miceliana [7].

*Análise Estatística.* Os experimentos foram conduzidos em triplicata e os dados obtidos foram tratados através de análise de variância (Anova) pelo programa GraphPad Prism 5.00.

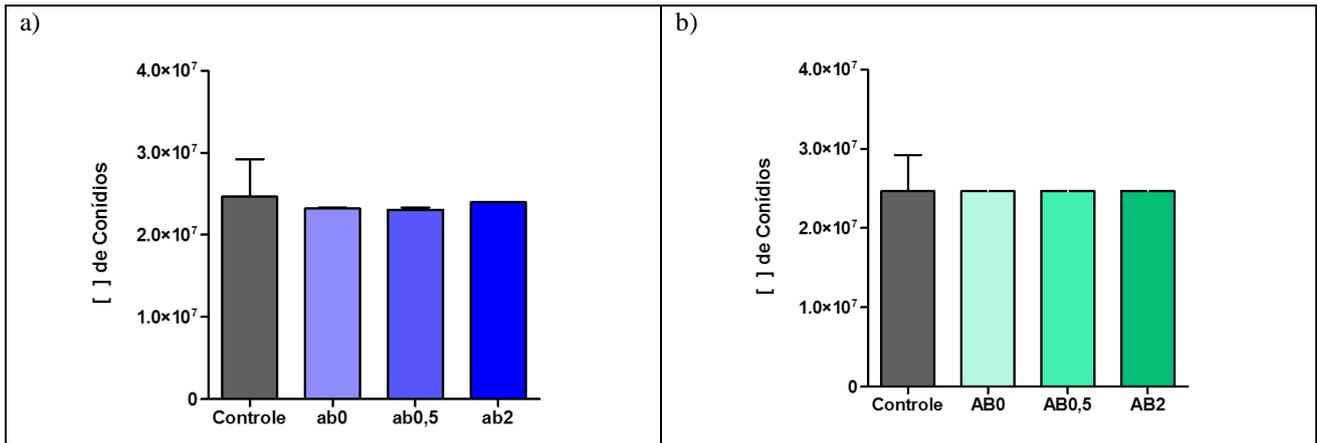
## Resultados e Discussão

A utilização de biopolímeros, com destaque para os alginatos, justifica-se por serem de fácil degradação hidrolítica e enzimática, biocompatíveis e não tóxicos. Além da capacidade de formar géis insolúveis em água através de ligações cruzadas com cátions divalentes, a exemplo o cloreto de cálcio. Contudo, estes géis apresentam uma alta porosidade, resultando em níveis elevados de difusão do princípio ativo nele contido. A associação alginato/bentonita proporciona tanto a diminuição desta porosidade quanto proteção contra quebração. Em termos gerais, a utilização de nanocompósitos polímero/argila permite um melhoramento, dentre outros fatores, das propriedades de barreira, estabilidade térmica e dimensional e de suas propriedades mecânicas [7,8]. Esta melhoria foi comprovada durante a formação dos *pellets*, que se mostraram mais firmes e bem definidos em misturas com concentração mais alta de bentonita, além de serem formados mais facilmente no momento do gotejamento. A reticulação da mistura biomassa fermentada/nanocompósitos poliméricos em cloreto de cálcio gerou *pellets* firmes, resistentes ao toque e bem definidos (Fig. 1a) na série 1, ao passo que na série 2 (Fig. 1b), onde se utilizou concentração de conídios mais elevada, eles se mostraram um pouco mais frágeis, chegando mesmo a coalescer, independente da concentração de bentonita avaliada.



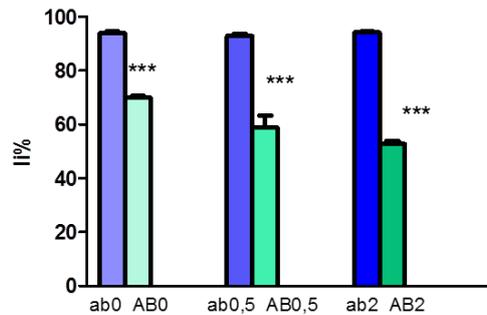
**Figura 1: Pellets resultantes da série 1: (a) recém-obtidos; (b) secos.**

Este resultado também foi observado por Pasqualim et al., que relataram a deformação das micropartículas de alginato quando a capacidade de encapsulação do material foi excedida [9]. A figura 2 apresenta os valores de conídios encapsulados e, apesar do aumento da concentração de conídios na série 2, em ambas as séries não foi encontrada diferença significativa entre as quantidades inicial e final de conídios. Assim, à medida que a quantidade de material encapsulado aumenta, a espessura das micropartículas diminui e, portanto, sua resistência também. Isso justifica a instabilidade dos *pellets* obtidos pela série 2, os quais provavelmente também atingiram a capacidade de encapsulação da *B. bassiana*.



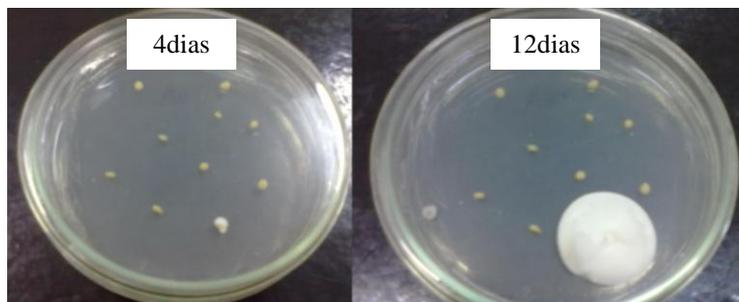
**Figura 2: Quantidade de conídios encapsulados em (a) série 1; (b) série 2. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão e estudadas pela análise de variância (ANOVA) para múltiplas comparações utilizando-se nível de significância  $P < 0,05$ .**

A diferença entre os *pellets* das séries 1 e 2 refletiu também em sua capacidade de intumescimento, revelando menores valores de intumescimento para os *pellets* da série 2 (Fig. 3).



**Figura 3: Comparação entre os índices de intumescimento ( $I_i\%$ ) das séries 1 e 2. Os pesos seco e após intumescimento foram expressos como média  $\pm$  erro padrão e estudados pela análise de variância com dois fatores (Two-way ANOVA) com valor de  $P < 0,001$ .**

O semeio dos *pellets* em meio nutritivo na série 1 resultou em germinação miceliana a partir do quarto dia, em apenas uma placa (ab2) e ao redor de um único *pellet* (Fig. 4). Já para na série 2, esta germinação ocorreu a partir do segundo dia, ao redor de todos os *pellets* semeados e em todas as placas. Este resultado pode estar associado à alta concentração de conídios utilizada ou até mesmo a fragilidade da estrutura dos *pellets* ocasionada pela alta carga fúngica a que foi submetido o material.



**Figura 4: Germinação miceliana a partir de *pellets* ab2 semeados em BDA**

## Conclusão

O alginato de sódio é um biopolímero derivado do ácido algínico que tem a habilidade de formar de gel, retendo uma grande quantidade de água em seu interior sem que haja dissolução. É bastante utilizado em formulações farmacêuticas e tem sido amplamente aplicado em técnicas de microencapsulação, sendo altamente biocompatível e biodegradável. Sua associação a bentonita sódica, argila mineral, é promissora, já que resulta em um material nanocompósito com propriedades orgânicas e inorgânicas, capaz de potencializar a encapsulação de princípios ativos. O presente estudo evidenciou suas propriedades encapsuladoras para a biomassa fermentada de *B. bassiana*. A técnica de reticulação utilizando-se CaCl<sub>2</sub> gerou *pellets* com capacidade de incorporar conídios, mesmo em grandes concentrações. Os *pellets* resultantes da suspensão com concentração mais baixa, série 1, resultou em valores mais altos de intumescimento, e, apesar deste ser um fator importante para prever a liberação dos esporos no meio ambiente, esta não ocorreu de forma satisfatória dentro das condições e período de tempo estudados. Nos experimentos da série 2 a capacidade de encapsulação do material foi provavelmente extrapolada, isso resultou em redução da estabilidade dos *pellets* e em índices de intumescimento menores, o que pode explicar a liberação rápida dos conídios fúngicos. Diante dos resultados obtidos, o nanocompósito mostrou ser uma potencial matriz para *B. bassiana*, no entanto, como perspectiva, concentrações intermediárias de suspensão fúngica devem ser avaliadas para se alcançar o equilíbrio entre a estabilidade dos *pellets* e a liberação modificada do fungo.

## Agradecimentos

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Alagoas (Fapeal) pelo apoio financeiro.

## Referências

1. J. M. S. Ferreira; D. R. N. Warwick; L.A. Siqueira in *A cultura do coqueiro no Brasil*, Embrapa – CPATC, Aracajú, 1998; ed. 2, 189-267.
2. D. Gallo; et al. in *Manual de entomologia agrícola*, Agronômica Ceres, São Paulo, 1988; ed. 2, 649.
3. S. B. Alves in *Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens*, Controle microbiano de insetos - FEALQ. Piracicaba, 1998; 21-37.
4. J. Calero; et al. in *Elaboración y Caracterización de Microcápsulas Gastrorresistentes de Diclofenac Obtenidas por Gelificación Iónica*, Universitas, 2008; vol. 1, 27-30.
5. R. M. D. G. Carneiro; C. B. Gomes in *Encapsulação do fungo Paecilomyces lilacinus em matrizes de alginato-argila e Avaliação e Viabilidade dos Conídeos em Duas Temperaturas*, Nematologia brasileira, 1997; vol. 21, 85-92.
6. O. A. Cavalcanti; et al. in *Polysaccharides as excipients for colon-specific coatings, permeability and swelling properties of casted films*, Drug Dev, Ind. Pharm, New York, 2002; vol. 28, 157-164.
7. K. Moebus; J. Siepmann; R. Bodmeier in *Alginate-ploxamer microparticles for controlled drug delivery to mucosal tissue*, European Journ. of Pharm. and Biopharm., 2009; vol. 72, 42-53.
8. I. S. Melo; F. G. Costa in *Desenvolvimento de uma Formulação Granulada a Base de Trichoderma harzianum para controle de fitopatógenos*. Comunicado técnico 31 – Embrapa, São Paulo, 2005; ISSN 1516-8638.
9. S. S. Ray; M. Okamoto. *Progress in Polymer Science*, Elsevier, 2003; vol. 28, 1539.
10. P. Pasqualim; et al. in *Microcápsulas de Alginato de Cálcio e Óleo Vegetal Pela Técnica de Gelificação Iônica: Um Estudo da Capacidade de Encapsulamento e Aplicação Dermatológica*. Visão Acadêmica, Curitiba, 2010; vol. 11, 23-37.