UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Desenvolvimento e avaliação
de micropartículas
contendo microrganismos viáveis utilizados como
bioinseticida**

Ana Lucia Santos Zimmermann

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Newton Lindolfo Pereira

São Paulo
2001

Ana Lucia Santos Zimmermann

**Desenvolvimento e avaliação
de micropartículas
contendo microrganismos viáveis utilizados como
bioinseticida**

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de
DOUTOR

Prof. Dr. Newton Lindolfo Pereira
Orientador/Presidente

Profa. Dra. Vladi Olga Consiglieri
1º Examinador

Profa. Dra. Teresinha de Jesus Andreoli Pinto
2º Examinador

Profa. Dra. Maria Inês Ré
3º Examinador

Prof. Dr. Osvaldo de Freitas
4º Examinador

São Paulo, 04 de outubro de 2001

CIÊNCIA E ARTE A CIÊNCIA EM SI

Se toda coincidência
Tende a que se entenda
E toda lenda
Quer chegar aqui
A ciência não se apreende
A ciência em si
Se toda estrela cadente
Cai pra fazer sentido
E todo mito
Quer Ter carne aqui
A ciência não se ensina
A ciência insemina
A ciência em si
Se o que se pode ver, ouvir, pegar, medir, pesar
Do avião a jato ao jaboti
Desperta o que ainda não, não se pôde pensar
Do sono eterno ao eterno devir
Como a órbita da terra abraça o vácuo devagar
Para alcançar o que já estava aqui
Se a crença quer se materializar
Tanto quanto a experiência quer se abstrair
A ciência não avança
A ciência alcança
A ciência em si.

Gilberto Gil & Arnaldo Antunes

À Deus por tornar tudo isto possível;

Ao meu companheiro Celio, por toda força e paciência;
aos meus filhos, Melissa e Sandro, por estarem sempre ao meu lado.

À D. Erminda, por ter me amado
e acrescentado algo muito importante na minha vida.

AGRADECIMENTOS

- ❖ Ao professor Newton Lindolfo Pereira pela oportunidade de realizar este trabalho;
- ❖ À Maria Inês Ré pela oportunidade de ter trabalhado no Laboratório de Tecnologia de Partículas, do Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT);
- ❖ Às minhas companheiras e assessoras Giovana Borini, Ana Julia Santinho e Juliana Cardoso;
- ❖ À Luci D.B.Machado, pelas discussões científicas e abraços calorosos;
- ❖ Aos pesquisadores, estagiários e técnicos do Agrupamento de Processos Químicos do IPT por todo apoio e prontidão nas horas de necessidade;
- ❖ Aos técnicos Paulo Sergio de Carvalho e Franklin C.F.Thomazini, do Dep. de Ciências Farmacêuticas da FCFRP-USP
- ❖ À FAPESP, minha mantenedora,

meus sinceros agradecimentos.

Sumário

OBJETIVOS	
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Microencapsulação.....	3
2.2 Polímeros Formadores de Micropartículas com Estrutura Matricial.....	8
2.2.1 Caseína.....	8
2.2.2 Derivados de celulose.....	9
2.2.3 Alginato como matriz encapsuladora.....	10
2.2.3.1 Estrutura e gelificação do alginato.....	11
2.2.3.2 Complexação do alginato com outros polímeros.....	16
2.2.3.3 Aplicações do alginato.....	20
2.3 Bioinseticida.....	23
2.3.1 Formulações de bioinseticidas.....	27
2.3.2 Alginato como polímero encapsulador de bioinseticida.....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1 Reagentes.....	33
3.2 Preparação de micropartículas por <i>spray drying</i>	33
3.3 Preparação de micropartículas por atomização e gelificação.....	36
3.4 Obtenção dos microorganismos.....	41
3.4.1 Esporos e toxinas de Btk	41
3.4.2 Poliedros de Bv	44
3.5 Determinação da massa seca dos microorganismos.....	44
3.6 Microencapsulação dos microorganismos.....	44
3.7 Determinação da viabilidade dos esporos de Btk	45
3.8 Bioensaio contra lagarta do cartucho do milho, <i>Spodoptera frugiperda</i>	46
3.9 Bioensaio contra lagarta da soja, <i>Anticarsia gemmatilis</i>	47
3.10 Caracterização físico-química das micropartículas.....	47
3.10.1 Microscopia óptica.....	47
3.10.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	48
3.10.3 Determinação do teor de cálcio.....	48
3.10.4 Análise Granulométrica.....	49
3.10.4.1 Análise de micropartículas obtidas por <i>spray drying</i>	49
3.10.4.2 Análise de micropartículas obtidas por atomização e gelificação.....	49
3.10.5 Porosidade.....	49
3.10.6 Análise Térmica.....	50
3.10.7 Determinação da umidade.....	50
3.10.8 Determinação da densidade aparente ou de empacotamento.....	50
3.10.9 Determinação da quantidade de água absorvida pelas micropartículas.....	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4.1 Obtenção de micropartículas utilizando o processo de <i>spray drying</i>	53
4.2 Caracterização das micropartículas obtidas pelo processo de <i>spray drying</i>	57
4.3 Obtenção de micropartículas secas de alginato de cálcio.....	60

4.4	Estudo de diferentes procedimentos e variáveis de processo na obtenção de micropartículas de alginato.....	65
4.5	Análise do teor de cálcio contido nas micropartículas de alginato.....	68
4.6	Análise da morfologia das micropartículas de alginato e alginato-quitosana.....	74
4.7	Análise granulométrica das micropartículas de alginato.....	82
4.8	Estudo da porosidade das micropartículas de alginato.....	86
4.9	Estudo das micropartículas de alginato por Análise Térmica.....	88
4.10	Determinação da umidade de pós de alginato obtidos por diferentes processos.....	89
4.11	Determinação da densidade aparente das micropartículas de alginato.....	90
4.12	Estudo da quantidade de água absorvida e do processo de dissolução das micropartículas de alginato.....	91
4.13	Influência do peso molecular (PM) da quitosana nas características das micropartículas.....	97
4.14	Estudo de micropartículas de alginato contendo leite desnatado (LD).....	99
4.15	Estudo de micropartículas contendo o bioinseticida Btk microencapsulado.....	103
4.15.1	Caracterização do bioinseticida Btk antes de ser microencapsulado.....	103
4.15.2	Caracterização dos sistemas multiparticulados obtidos com as formulações do bioinseticida Btk depois de microencapsulado.....	108
4.15.3	Mortalidade de larvas do cartucho do milho <i>Spodoptera frugiperda</i> com a ingestão do bioinseticida Btk antes e depois de terem sido microencapsulados.....	114
4.16	Estudo de micropartículas contendo o bioinseticida Bv microencapsulado.....	117
5	CONCLUSÕES.....	121
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	123

Figura 1	Estrutura química do alginato	11
Figura 2	Esquematização da reticulação e gelificação do alginato na presença do cálcio	13
Figura 3	Estrutura química da quitina e da quitosana	17
Figura 4	Diagrama representando a interação da quitosana com o alginato	19
Figura 5	Esquema do <i>spray drier</i> utilizado	34
Figura 6	Equipamento utilizado para obtenção de micropartículas por atomização	37
Figura 7	Esquema dos procedimentos I e II utilizados para o recobrimento de micropartículas de alginato com quitosana	39
Figura 8	Ilustração dos cristais de δ -endotoxinas da cepa S93 de Btk depois de purificados, na época do seu isolamento	43
Figura 9	Esquema do aparelho utilizado para os estudos do perfil de absorção de água	51
Figura 10	Fotomicrografias de MEV das micropartículas obtidas pelo processo de <i>spray drying</i> utilizando as misturas poliméricas de CasHPMC e CasHEC	58
Figura 11	Fotomicrografias ópticas de partículas de CasHEC e alginato de cálcio dispersas em água	61
Figura 12	Fotomicrografias de MEV de micropartículas de alginato de cálcio obtidas depois de filtradas, lavadas com água e secas à temperatura ambiente	63
Figura 13	Coalescência de partículas lavadas com água durante a secagem	63
Figura 14	Fotomicrografias obtidas por microscopia óptica das partículas de alginato atomizadas em diferentes soluções	67
Figura 15	Fotomicrografias de MEV mostrando uma visão geral das micropartículas obtidas em processos de uma etapa	75
Figura 16	Fotomicrografias de MEV mostrando uma visão geral das micropartículas obtidas em processos de duas etapas	76

Figura 17	Fotomicrografias de MEV mostrando o tamanho e a aparência de alguns aglomerados	77
Figura 18	Fotomicrografias de MEV mostrando a superfície de micropartículas de alginato obtidas por diversos processos	79
Figura 19	Fotomicrografias de MEV mostrando a superfície de micropartículas de alginato obtidas por processos feitos em duas etapas	80
Figura 20	Curva de distribuição de tamanho de micropartículas de alginato	85
Figura 21	Distribuição do volume de macro e mesoporos de micropartículas obtidas por diferentes processos	87
Figura 22	Perfis das curvas termogravimétricas (TG) feitos com micropartículas obtidas por diferentes processos	88
Figura 23	Quantidade de água absorvida em relação ao peso inicial de micropartículas obtidas por diferentes processos	92
Figura 24	Comportamento das partículas obtidas pelo processo $2\text{QUIHCl} + \text{CaCl}_2$ e 2QUIHCl em água e em citrato de sódio 0,05M	94
Figura 25	Comportamento das partículas obtidas pelo processo $1\text{QUIHCl} + \text{CaCl}_2$ e 1QUIHCl $2\text{QUIHCl} + \text{CaCl}_2$ em água e em citrato de sódio 0,05M	95
Figura 26	Comportamento das partículas obtidas pelo processo 2QUITacNa em água e em citrato de sódio 0,05M	96
Figura 27	Caracterização de micropartículas obtidas com quitosanas de diferentes pesos moleculares	98
Figura 28	Fotomicrografias de MEV mostrando uma visão geral e de aglomerados de micropartículas formadas com alginato de cálcio com 2% e 0,5% de leite desnatado	101
Figura 29	Fotomicrografias de MEV mostrando a superfície de micropartículas formadas com alginato sem e com adição de 2% e 0,5% de leite desnatado	102
Figura 30	Fotomicrografias ópticas do caldo fermentado por 28h e da suspensão concentrada de Btk do final da fermentação, depois de 48h. A coloração foi feita com verde malaquita e fucsina	104

Figura 31	Fotomicrografias ópticas do caldo fermentado por 28h e da suspensão concentrada de Btk do final da fermentação, depois de 48h. A coloração foi feita com amido black e fucsina	105
Figura 32	Fotomicrografias de MEV da suspensão concentrada de Btk	107
Figura 33	Fotomicrografias ópticas de gotículas de alginato de cálcio sem e com Btk , logo após a atomização	109
Figura 34	Fotomicrografias de MEV de micropartículas contendo 5% (p/p) de Btk	110
Figura 35	Distribuição de tamanho de partículas utilizadas como bioinseticidas	112
Figura 36	Fotomicrografias ópticas de partículas obtidas pelos processos 1CaCl ₂ 0,1M+ Btk 18% e 2QUIHCl+ Btk 18% logo depois de adicionadas em água	113
Figura 37	Visualização do aprisionamento do Bv em uma gota de alginato gelificado com cálcio antes e depois de seca	120

Índice de Tabelas

Tabela 1	Identificação e descrição dos procedimentos e processos estudados	40
Tabela 2	Estudo do efeito da temperatura no rendimento do <i>spray drier</i>	55
Tabela 3	Efeito no rendimento do <i>spray drier</i> com adição de aditivos	57
Tabela 4	Resultados da distribuição de tamanho das partículas obtidas no <i>spray drying</i>	59
Tabela 5	Porcentagem de cálcio contido em micropartículas de alginato obtidas por diferentes processos	68
Tabela 6	Resultados das análises granulométricas de micropartículas obtidas por diferentes processos	83
Tabela 7	Umidade e densidade aparente de pós contendo alginato de cálcio obtidos por diferentes processos	90
Tabela 8	Influência da adição do leite desnatado (LD) na distribuição granulométrica das micropartículas obtidas	100
Tabela 9	Mortalidade de lagartas de <i>S. frugiperda</i> provocada pela capacidade bioinseticida do Btk não formulado e formulado	115
Tabela 10	Porcentagem de mortalidade de lagartas de <i>A. gemmatilis</i> com a ingestão de Bv antes e depois de formulado	119

ABREVIACÕES

ALGNa	-	Alginato de sódio
Bt	-	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Btk	-	<i>Bacillus thuringiensis var. krustaki</i>
Bv	-	<i>Baculovirus anticarsia gemmatalis</i>
Cas	-	Caseína
HEC	-	Hidroxietilcelulose
HPMC	-	Hidroxipropilmetilcelulose
QUI	-	Quitosana
TacNa	-	Tampão acetato de sódio

RESUMO

Neste trabalho foi feito um estudo para obtenção de formulações multiparticuladas, formadas por micropartículas de polímeros naturais, solúveis em água, não tóxicos e biodegradáveis. Os polímeros utilizados foram: Caseína, Hidroxietilcelulose (HEC), Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), Alginato de sódio e Quitosana. As técnicas utilizadas para obtenção das micropartículas foram o *spray drying* e a atomização de alginato de sódio em uma solução de CaCl_2 , para gelificação das gotículas formadas, com uma complexação ou não com quitosana. O estudo de micropartículas secas de alginato de cálcio e alginato de cálcio recoberta com uma membrana de quitosana revelou que diferentes procedimentos e variáveis de processo influenciavam nas características das micropartículas obtidas. O diâmetro médio das micropartículas de alginato e alginato-quitosana variou de 60 a 553 μm . A superfície de micropartículas com quitosana se mostrou mais rugosa, com uma grande quantidade de poros menores que 1 μm . As micropartículas com diâmetro médio de 60 μm apresentaram uma boa esfericidade e uma distribuição de tamanho de partícula uniforme. O teor de cálcio apresentou variações, diminuindo em processos com quitosana. A maioria das micropartículas de alginato e alginato-quitosana eram estáveis em água, mas instáveis em soro fisiológico e tampão fosfato 0,1M. Após a realização do estudo das características destas micropartículas foram incorporados a elas materiais com atividade bioinseticida (*Bacillus thuringiensis* var. *krustaki* (Btk) e de *Baculovirus* (Bv)). As micropartículas obtidas com alginato de cálcio formaram pós contendo sistemas matriciais capazes de microencapsular e reter microrganismos entomopatogênicos, inclusive após redispersão em água. Os processos de microencapsulação de desenvolvidos e avaliados demonstraram ser adequados para a manutenção da viabilidade de Btk e da integridade dos poliedros de Bv, assim como, a conservação da capacidade bioinseticida destes microrganismos. As micropartículas obtidas com as misturas poliméricas Caseína/HEC e Caseína/HPMC pelo processo de *spray drying* revelaram-se inadequadas na medida que se dissolviam rapidamente depois de dispersas em água e não poderiam assim proteger o material bioinseticida no meio ambiente.

ABSTRACT

The aim of this work was to develop powder formulations containing microparticles, to be used as multiparticulate delivery systems.

Two different methods were investigated : 1) the preparation of microparticles by spray drying using casein, hydroxyethylcellulose (HEC) and hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) and 2) the preparation of calcium alginate and chitosan-alginate microparticles by using an atomizer device.

Different experimental procedures to prepare calcium alginate and chitosan-alginate microparticles were evaluated and variables believed to be important for the membrane formation were examined. The mean particles diameter ranged from 60 to 553 μm . When a comparison was made between the surface morphology of calcium alginate and alginate-chitosan microparticles, remarkable roughness and more porous structure was observed in the chitosan-alginate microparticles. Some properties of the microparticles depended on the method and the procedure conditions of forming the chitosan-alginate complex.

Calcium alginate and chitosan-alginate microparticles containing two different bioinsecticides were also prepared : 1) a spore/ δ -endotoxins complex of *Bacillus thuringiensis var.kurstaki* (Btk) and 2) polyhedra of *Baculovirus anticarsia* (Bv), a viral insecticide. The results shown that the encapsulation of suspensions of Btk containing spore/toxin complex or polyhedra of *B. anticarsia* in calcium alginate and chitosan-alginate microparticles did not decrease the larvicidal activity of these biopesticides against lepidopterous pests. The formulations developed in this study remained unchanged, did not swell, did not release the spores (Btk) or the polyhedra (Bv), when dispersed in water and could be useful to be applied by aqueous spray as bioinsecticides in agriculture.

On the other hand, casein, HEC and HPMC microparticles prepared by spray drying were not suitable to encapsulate bioinsecticides because they dissolved fastly after dispersion in water

OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram o desenvolvimento e a avaliação de micropartículas contendo microrganismos viáveis, através da utilização de técnicas e de procedimentos de microencapsulação.

A meta, na definição das técnicas de microencapsulação investigadas, foi o desenvolvimento de formulações sólidas de bioinseticidas microencapsulados, formando um sistema multiparticulado, ou seja, um pó que pudesse assegurar uma alta taxa de sobrevivência dos microrganismos, tanto durante o armazenamento, quanto durante a exposição ao meio ambiente. Além disso, estas formulações deverão permitir a liberação das células microbianas e suas toxinas somente no intestino das pragas alvo, permanecendo até este momento íntegras, protegendo o bioinseticida encapsulado.

1. INTRODUÇÃO

Durante muito tempo, os únicos sistemas terapêuticos conhecidos, forneciam a imediata liberação do fármaco, com sua ação acontecendo por um tempo limitado. Portanto, para alcançar e manter a concentração do fármaco, dentro dos níveis terapêuticos efetivos adequados para o tratamento, são necessárias se efetuar aplicações deste sistema de liberação do fármaco várias vezes ao dia. Isso resulta em uma flutuação significativa nos níveis da droga no seu sítio de ação e representa um incômodo para pacientes, médicos e enfermeiros.

Recentemente, inúmeros avanços técnicos têm sido alcançados, resultando no desenvolvimento de novas técnicas de liberação de fármacos. Essas técnicas são capazes de controlar a taxa de liberação, sustentando a duração da atividade terapêutica, assim como retardando o início de sua liberação e da sua ação. Com isso, a terapêutica tem sido revolucionada, trazendo vários benefícios aos pacientes, como a manutenção de um efeito farmacológico uniforme e diminuição dos efeitos secundários dos princípios ativos, ao se conseguir manter uma concentração constante e correta na corrente sangüínea (VOIGT & BORNSCHEIN, 1979; GARDNER, 1992). Entre estes avanços técnicos está a microencapsulação, como uma tecnologia que vem sendo desenvolvida e tem apresentado resultados importantes.

O aumento da estabilidade de um fármaco em ambientes pouco favoráveis ou a manutenção da viabilidade e atividade de microrganismos, adicionados ao meio ambiente, podem ser alcançados com o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada, utilizando-se técnicas de microencapsulação, uma vez que, estes materiais se encontrarão englobados e isolados com filmes de polímeros protetores, com características de dissolução, porosidade e permeabilidade apropriadas ao objetivo desejado.

Os microrganismos encapsulados, por exemplo, podem atuar como biorremediadores, em terras ou águas contaminadas com poluentes, ou atuar como bioinseticidas em substituição aos inseticidas químicos, que têm provocado grandes problemas ambientais, além de resistência das pragas alvo.

Durante as últimas três décadas várias técnicas de microencapsulação têm sido investigadas, com diferentes tipos de polímeros, para obtenção de formulações com polímeros formadores de membranas protetoras, com propriedades específicas de solubilidade, permeabilidade e resistência mecânica, dentre outras. Isto tem sido fundamental para a obtenção de produtos com alto desempenho em termos de liberação controlada de fármacos.

Este trabalho foi desenvolvido em conjunto com o Laboratório de Tecnologia de Partículas do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MICROENCAPSULAÇÃO

A microencapsulação é uma tecnologia que vem sendo desenvolvida nos últimos 50 anos, resultando no surgimento de novas técnicas de liberação de fármacos e outros materiais, como corantes, vitaminas, sais, detergentes, aromas, produtos agroquímicos, enzimas e microorganismos.

A microencapsulação consiste na obtenção de microcápsulas ou micropartículas que encapsulam, envolvem, aprisionam, recobrem, revestem ou empacotam uma grande variedade de materiais, com inúmeras finalidades. Um dos principais objetivos da microencapsulação é conseguir uma liberação controlada de fármacos ou outros materiais encapsulados, mantendo a sua concentração e/ou retardando o início da sua liberação.

Não existe até o momento uma definição universal da faixa de tamanho que estas cápsulas devem ter para serem classificadas como microcápsulas. Micropartículas ou microcápsulas tipicamente comerciais têm um diâmetro entre 3 e 800 μm (THIES, 1996).

A estrutura das micropartículas obtidas por microencapsulação pode ser distinguida por dois grupos, baseando-se na maneira como os materiais encapsulados (partículas sólidas, gotas de líquido ou gases) estão distribuídos dentro do sistema (PORTE & COUARRAZE, 1994):

- a) Aquele no qual o material encapsulado está concentrado perto do centro, envolto por um filme definido e contínuo recobrindo este material;
- b) Aquele no qual o material encapsulado está disperso uniformemente, através de uma matriz polimérica.

Uma grande variedade de materiais têm sido encapsulada, tais como fármacos, fragrâncias, pesticidas, enzimas ativas, microrganismos e células de animais. Os motivos para o uso de técnicas de microencapsulação podem ser resumidos em (FINCH, 1993):

- a) Proteção do material encapsulado contra condições ambientais adversas, como altas e baixas temperaturas, luz solar e umidade, aumentando, assim, sua estabilidade durante o armazenamento e antes da sua liberação no local adequado.
- b) Proteção do meio ambiente, no caso do material encapsulado ser perigoso ou tóxico.
- c) Mascaram propriedades indesejadas do material encapsulado, como odor, gosto ou pH.
- d) Separação de componentes, permitindo o controle de incompatibilidades entre eles.
- e) Formação de sistemas sólidos, convertendo componentes líquidos em pós.
- f) Controle da liberação do material encapsulado, com sua liberação somente no local desejado, como no ambiente intestinal ou acima de determinadas temperaturas.

Na verdade, qualquer material que precise ser protegido, isolado ou ter uma liberação controlada pode ser encapsulado. Portanto, as aplicações da microencapsulação são múltiplas.

Na área médica e farmacêutica, um dos principais objetivos da microencapsulação é a obtenção de uma liberação prolongada do fármaco encapsulado. Isto, por exemplo, eliminaria a necessidade de várias dosagens do medicamento, as quais poderiam causar flutuações não desejáveis nos níveis do fármaco na corrente sanguínea. Além disso, a liberação controlada de um fármaco causaria uma redução de irritação gástrica como a provocada pela aspirina e cloreto de potássio, protegeria vitaminas e antibióticos do pH extremamente ácido do estômago (BAKAN et al., 1992; CHIEN, 1992) e diminuiria o efeito citotóxico de fármacos anticancerígenos (MACLAUGHLIN & GOLDBERG, 1983).

Na indústria alimentícia, a microencapsulação oferece muitas vantagens, como proteção de componentes alimentares sensíveis de outros ingredientes durante o armazenamento, proteção contra a perda do valor nutricional ou mesmo a adição de substâncias nutricionais em alimentos depois de processados, incorporação de uma substância com uma liberação programada e mascaramento ou preservação de sabores e de aromas (SHAHIDI & HAN, 1993).

Na área ambiental, a microencapsulação pode melhorar a eficácia dos pesticidas com a liberação controlada destes produtos. Assim, menor quantidade dessas substâncias seria necessária com uma conseqüente redução da poluição ambiental (CHAMBERLAIN & SYMES, 1993).

A encapsulação de células microbianas e células animais intactas, em membranas semipermeáveis e com a manutenção de seus metabolismos, tem sido bastante investigada como uma tecnologia alternativa para:

- Obtenção de órgãos artificiais, onde, por exemplo, ilhotas de Langherans, responsáveis pela produção de insulina no pâncreas, são encapsuladas e implantadas em pacientes diabéticos (SKAUGRUD, 1995).
- Aumento do rendimento de colheitas com a inoculação, por exemplo, de bactérias da rizosfera, microencapsuladas e misturadas nas sementes. Estes microrganismos matam patógenos e estimulam o crescimento de determinadas plantas, causando um aumento da colheita (BASHAN & GONZALEZ, 1999).
- Produção de bioinseticida com a encapsulação de microrganismos que matam insetos nocivos a plantações, com a intenção de substituir os inseticidas químicos (COKMUS & ELÇIN, 1995).
- Encapsulação de microrganismos para biorremediação, como *Pseudomonas putida*, utilizados para degradar fenóis de águas residuais de produção de plásticos, coque e refinarias, que são altamente tóxicos para animais e plantas (BANDHYOPADHYAY et al., 1999).

Existem diferentes técnicas para produção de microcápsulas, com mais de 200 métodos identificados na literatura de patentes (THIES, 1996). Em geral, esses métodos podem ser divididos em 3 grupos conhecidos como (SHAHIDI & HAN, 1993):

- Processos físico-químicos: coacervação simples ou complexa, emulsão-solidificação, entrelaçamento em lipossomas.
- Processos químicos: polimerização interfacial, inclusão molecular
- Processos físicos: *spray drying*, *spray coating*, extrusão etc.

Uma das técnicas básicas de microencapsulação é a coacervação. Ela consiste na formação de duas fases distintas em uma dispersão polimérica homogênea, contendo um material ativo disperso. Uma fase possui uma alta concentração do polímero, por isso é altamente viscosa e outra é bem fluida, onde o polímero se encontra em pequena quantidade. Este fenômeno acontece devido à adição de um agente coacervante que diminui a solubilidade da dispersão polimérica inicial. Esses agentes podem ser, o etanol, o sulfato de sódio, um íon complexante, o abaixamento da temperatura. Com isto, na fase rica em polímero, formam-se gotas de coacervados que podem recobrir o material ativo disperso que, depois de coalescer, formam uma membrana polimérica líquida ao seu redor. A coacervação pode ser simples ou complexa dependendo da participação de um ou dois polímeros de cargas opostas. A fase final desse processo consiste na solidificação e eventual endurecimento da membrana formada para obter-se micropartículas com um material encapsulado (FINCH, 1993).

Uma técnica considerada bastante promissora hoje em dia para microencapsulação, é o *spray drying*. Embora a utilização do *spray drier* seja geralmente para processos de desidratação, pode também ser utilizado para microencapsulação (RÉ, 1998). Este processo consiste na transformação rápida de um líquido contendo o material a ser encapsulado, em uma forma particulada seca, onde os polímeros dispersos neste líquido, englobem esse material. Isto

acontece com a atomização deste líquido em uma câmara de secagem quente e a coleta das micropartículas formadas por um ciclone. A grande vantagem deste processo é a obtenção de microcápsulas contendo um material de interesse, em uma única operação e de forma contínua, como um pó com características bem definidas e constantes. O processo, como um todo, acontece em alguns segundos, onde a rápida evaporação da água mantém as partículas em uma temperatura baixa e, por isso pode ser utilizado para produtos sensíveis ao calor, como proteínas e células (MASTER, 1991).

As propriedades das microcápsulas ou micropartículas obtidas por microencapsulação, dependem não somente do método utilizado para sua formação e obtenção, mas, também, da natureza do polímero encapsulante que tem função importante na permeabilidade, solubilidade, porosidade, intumescimento, como em outras características fundamentais na determinação do comportamento destas micropartículas.

2.2 POLÍMEROS FORMADORES DE MICROPARTÍCULAS COM ESTRUTURA MATRICIAL

Hoje em dia existe uma grande variedade de polímeros utilizados como formadores de paredes ou matrizes para obtenção de micropartículas que encapsulam um material de interesse. Apesar de existirem muitos polímeros sintéticos como acrilatos, metacrilatos, polilactatos e poligliconatos, que podem ser utilizados como agentes encapsuladores em micropartículas, os polímeros naturais como polissacarídeos, gomas, proteínas e derivados de celulose são altamente atrativos e extensivamente investigados. Esses polímeros naturais têm como vantagens, baixa toxicidade, o fato de serem biodegradáveis e de formarem hidrogéis, além de poderem ser facilmente modificados (HEELAM & CORRIGAN, 1997).

Uma grande desvantagem dos polímeros sintéticos é a necessidade do uso de solventes orgânicos para sua solubilização, os quais oferecem perigos à segurança do meio ambiente e à saúde dos seres vivos.

Por estas razões, os estudos e aplicações de polímeros solúveis em água têm aumentado bastante. Matrizes hidrofílicas têm sido bastante utilizadas em formulações de dosagens orais com liberação controlada (SUJJAAREEVATH et al., 1998). MCLOUGHLIN (1994) sugeriu que células encapsuladas em matrizes formadoras de géis possam oferecer uma proteção estável, definida e consistente.

2.2.1 Caseína

A caseína constitui o principal componente protéico do leite (OPPENHEIM et al., 1978). Sendo uma proteína natural, solúvel em água e formadora de filme, apresenta grandes possibilidades de ser usada na formação de micropartículas biodegradáveis, como a albumina e a gelatina.

JAYAKRISNAN et al. (1994) sintetizaram microesferas de caseína, contendo o fármaco metotrexato, um anticancerígeno, também pelo método de reticulação com o glutaraldeído para endurecer uma emulsão água/óleo . Estas

micropartículas demonstraram ser mais hidrofílicas que microesferas de albumina, e sua degradação enzimática sugeriu que densidades mais baixas de reticulação aumentaram a velocidade de degradação.

Mais recentemente, HEELAN & CORRIGAN (1997) prepararam microesferas de caseinato de sódio como material carreador de hidroclorotiazida, eosina, violeta azul e salicilato de sódio. Estas microesferas apresentaram uma hidratação e um intumescimento imediato em um meio aquoso e suas morfologias variaram, conforme o material incorporado.

2.2.2 Derivados de celulose

A celulose é o polímero mais abundante na natureza, sendo a estrutura de sustentação e proteção do mundo vegetal. É constituída de moléculas de glicose interligadas por ligações glicosídicas β -(1 $\rightarrow$ 4).

Várias cadeias paralelas de celulose interagem entre si, através de pontes de hidrogênio que estabilizam um arranjo linear, em forma de fibrilas insolúveis em água (BERK, 1976).

Os tratamentos da celulose na presença de várias substâncias resultam na quebra de sua estrutura, assim como na substituição de alguns dos grupamentos hidroxilas disponíveis na posição 2, 3 e 6, formando ésteres ou éteres.

Hidroxietilcelulose (HEC) e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) são derivados éter de celulose, não iônicos, estáveis em variações de pH entre 2 a 11, formadores de filme, solúveis em água e formadores de gel (hidrogéis). O HEC é um ligante e um espessante bastante utilizado na área farmacêutica. O HPMC é utilizado como formador de filme em revestimento de comprimidos e como ligante na granulação para obtenção de comprimidos. É também utilizado como agente espessante, emulsificante e estabilizante de géis e pomadas.

O HPMC é também bastante utilizado em comprimido de liberação controlada, formando matrizes que sofrem intumescimento (WAN et al., 1991; COLOMBO et al., 1992). A liberação do fármaco nesses comprimidos é controlada através de variações no peso molecular do polímero, solubilidade do

fármaco, da relação fármaco-polímero, do tamanho das partículas do fármaco e a adição de diferentes aditivos (BODMEIER & PAERATAKUL, 1991).

MATSUO et al. (1995) estudaram a aplicação do HEC em uma forma de dosagem com liberação retardada a qual, rapidamente liberou o fármaco de um reservatório feito por compressão depois de um tempo de “lag” predeterminado de várias horas, controlado, principalmente, pela espessura da parede de HEC que envolvia o núcleo.

WAN et al. (1992) compararam a liberação de um fármaco incorporado em micropartículas formadas com diferentes derivados de celulose, utilizando o processo de *spray drying*. Demonstraram que a liberação foi dependente da hidrofobicidade do polímero.

Poucos são os trabalhos na literatura, dentro da área farmacêutica, que descrevem a obtenção de micropartículas desses dois derivados de celulose aqui citados. BODMEIER et al. (1991) obtiveram micropartículas de HPMC com alginato de cálcio que incorporavam indometacina, através do gotejamento de uma dispersão destes dois polímeros com o fármaco, em uma solução de CaCl_2 . As gotas obtidas apresentaram propriedades de liberação sustentada por causa da rápida hidratação com formação de uma camada de gel.

2.2.3 Alginato como matriz encapsuladora

O alginato, um polissacarídeo natural, é extraído da matriz extracelular de algas marrons (Phaeophyceae), onde age como material estrutural. As espécies mais utilizadas para produção comercial são *Macrocystis pyrifera*, *Ascophyllum nodosum*, *Lamaria hyperborea* e *L. digitata*. Os países que mais produzem alginato são os Estados Unidos, Inglaterra, Noruega, França, Canadá, Espanha e Japão (KING, 1983).

Alginatos (ALG) são amplamente utilizados para microencapsulação devido à rapidez e simplicidade na formação de gel com íons metálicos divalentes, como o Ca^{2+} . A microencapsulação em gotas de alginato de

cálcio tem como vantagens serem feitas em condições amenas e de manterem a atividade de moléculas biológicas ou células (HARI, 1996b).

Alginatos, sendo não tóxicos e biocompatíveis, são utilizados como aditivos em alimentos, como fármaco antiácido, como desintegradores de comprimido e como carreadores de fármacos na microencapsulação. Além disso, desde meados de 1970, o alginato de cálcio tem sido largamente utilizado como material encapsulante de células (PONCELET et al., 1995).

2.2.3.1 Estrutura e gelificação do alginato.

Embora o alginato seja conhecido desde 1881, a primeira caracterização estrutural não foi relatada antes de 1965 (SKAUGRUD, 1995).

O alginato é um copolímero linear, não ramificado, de resíduos de ácido urônico, β -D-manurônico (M) e α -L-gulurônico (G), com ligações entre o carbono 1 e 4, arranjados em blocos homopoliméricos de cada resíduo (MM e GG) e blocos heteropoliméricos dos dois resíduos (MG), como mostrado na Figura 1. Sua composição e seqüência variam dependendo do organismo e do tecido do qual foram isolados. A flexibilidade desses blocos poliméricos nas moléculas de alginato em solução, decresce na ordem $MG > MM > GG$ enquanto que a viscosidade depende, principalmente, do tamanho da molécula.

Figura 1 – Estrutura química do alginato (SMIDSRØD & SKJÅK-BRÆK, 1990).

A reticulação e gelificação do alginato são feitas por cátions divalentes, sendo a afinidade: $\text{Pb}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Co}^{2+} = \text{Ni}^{2+} = \text{Zn}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$. Contudo devido à alta toxicidade da maioria desses cátions, os agentes reticuladores do alginato limitam-se, principalmente, ao Ca^{2+} , Sr^{2+} e Ba^{2+} , sendo o íon cálcio o mais utilizado nas concentrações de 20 a 200 mM. Esse cátion se liga, preferencialmente, aos grupos carboxílicos dos blocos GG de uma maneira altamente cooperativa (Figura 2a). Esta ligação seletiva do cátion cálcio no alginato tem influência direta na sua capacidade de formar géis ionotrópicos.

Os resíduos G formam cavidades que funcionam como sítios do Ca^{2+} (Figura 2b). Este cátion pode interagir com 5 diferentes átomos de oxigênio de dois monômeros adjacentes de ácido gulurônico, na parte interna da cadeia. Assim, forma-se um “modelo de caixa de ovo” com a ligação intercadeia de cálcio com o alginato. O gel formado é, provavelmente, uma estrutura tridimensional de cadeias longas de polímero contendo seções firmes feitas por blocos GG, que se mantêm juntas e por estruturas com interseções mais flexíveis de blocos MM/MG em seqüências alternadas (Figura 2a).

Figura 2 – Esquematização da reticulação e gelificação do alginato na presença do cálcio (SMIDSRØD & SKJÅK-BRÆK, 1990).

- a) formação do “modelo caixa de ovo” para a reticulação do alginato com o cálcio (representado por pontos). As partes que apresentam ondulações do polímero representam blocos de GG
- b) ligação do Ca^{2+} (círculo grande) com $\alpha\text{-L-G}$ (1-4)-L-G de cadeias adjacentes.

Os géis de alginatos ricos em M são mais flexíveis do que os ricos em G, que apresentam maior firmeza. O intumescimento do gel será um reflexo direto da quantidade de blocos MM, que refletirá na sua capacidade de expansão. Alginatos ricos em resíduos G e com blocos longos têm apresentado uma menor retração durante a gelificação e resultam em gotas de gel úmidas, com maior porosidade e resistência mecânica (MARTINSEN et al., 1989).

A gelificação que ocorre com o contato das gotas de alginato de sódio com uma solução de CaCl_2 é irreversível, sendo estável com o calor. Substâncias sequestradoras de cátions, como fosfatos, lactatos, citratos e EDTA irão seqüestrar o íon Ca^{2+} reticulador do alginato, desestabilizando-o até dissolvê-lo completamente (KING, 1983). Como o Ca^{2+} pode ser substituído por outros cátions, o gel formado poderá ser desestabilizado por altas concentrações de íons não indutores de gel, tais como Na^+ e Mg^{2+} (Figura 2a).

Assim sendo, as propriedades de gelificação e retenção de água do alginato dependem da sua composição monomérica, arranjos seqüenciais e o comprimento de blocos GG, além das condições de gelificação (McLOUGHLIN, 1994 e SKAUGRUD, 1995).

A técnica de adição do alginato na solução de íons cálcio influencia bastante no tamanho das gotas resultantes. O gotejamento ou atomização pode resultar em gotas de 1 a 4 mm ou de 100 a 600µm respectivamente (SUGAWARA et al., 1994). Técnicas de emulsão têm sido usadas para obtenção de gotas pequenas, mas, geralmente, resultam em uma ampla distribuição de tamanho de partículas. Além disso, apresentam grande dificuldade para difundir o Ca^{2+} na fase oleosa na medida que o CaCl_2 é insolúvel nesse meio, além de dificultar o processo de separação com a lavagem das gotas gelificadas, para eliminação do óleo de suas superfícies (PONCELET et al., 1995; STORMO & CRAWFORD, 1992). O tamanho e a forma esférica das gotas dependem, também, da viscosidade da solução de alginato de sódio, a qual, por sua vez é determinada pela concentração e peso molecular do alginato, assim como da distância entre o aparato de gotejamento ou atomização e a superfície da solução gelificante de CaCl_2 .

As gotas resultantes do processo de reticulação e gelificação podem ser conservadas em temperaturas entre 4 e 10 °C, por um período de até 12 meses, sendo a secagem o método mais eficiente para conservação do gel formado (KING, 1983). Quando as gotas de gel de alginato de cálcio são secas à temperatura ambiente ou em estufa, estas podem perder a esfericidade inicial, tornando-se matrizes menores e mais densas. Quando secas por liofilização, são formadas matrizes quase esféricas e porosas que se quebram com facilidade no manuseio (ØSTBERG & GRAFFNER, 1992). Conforme o método de secagem, a porosidade do gel de alginato de cálcio pode ser significativamente reduzida.

Os géis formados com adição de alginato de sódio em solução de CaCl_2 podem ser não homogêneos, com uma maior concentração do complexo polímero- Ca^{2+} na interface da solução, decrescendo em direção ao centro do gel (McLOUGHLIN, 1994). Este parece ser um fenômeno relativo à taxa de difusão dos íons Ca^{++} que vai sendo limitada, na medida que as moléculas de alginato mais superficiais vão gelificando irreversivelmente. Quanto maior a concentração da solução de CaCl_2 , maior compactação da superfície do gel, diminuindo a porosidade e a velocidade de formação do gel no centro da partícula. Géis homogêneos são obtidos quando formados na presença de cátions, como Na^+ ou Mg^{2+} , durante a gelificação. Quanto menor forem as partículas, maior será a homogeneidade do gel obtido.

O gel de alginato de cálcio possui uma ampla faixa de tamanho de poros, entre 5 nm a 200 nm, liberando com facilidade moléculas de baixo peso molecular, principalmente as hidrossolúveis, e restringindo o transporte de moléculas grandes, como proteínas. Sua utilização é ideal para a retenção de células e suas organelas (SMIDSRØD & SKJÅK – BRÆK, 1990).

Para microencapsular materiais como fármacos ou células, estes são dispersos homogeneamente na solução de alginato de sódio, antes desta ser adicionada à solução de CaCl_2 . O gel resultante depois da reticulação com o íon Ca^{2+} apresenta a estrutura de uma matriz, com o material encapsulado aprisionado entre as cadeias de alginato de cálcio.

2.2.3.2 Complexação do alginato com outros polímeros

Com a finalidade de aumentar a retenção do material encapsulado e a estabilidade das partículas feitas com alginato de Ca^{2+} , na presença de quelantes (fosfato, lactato ou citrato) ou cátions não gelificantes (Na^+ ou Mg^{2+}), pode-se recobrir estas partículas com polímeros policatiônicos. Eles formam uma membrana na superfície das gotas, complexando com os grupos aniônicos do alginato (MURATA et al., 1993b; HUGUET & DELLACHERIE, 1996). O alginato forma complexos estáveis com policátions como a quitosana ou polímeros sintéticos, como polietilemimina e polisina. Uma membrana de alginato-polication também reduzirá e controlará a permeabilidade da cápsula, além de, quando usada para imobilização ou transplante de células, a membrana da cápsula serve como uma barreira imunoprotetora.

Outro mecanismo que pode ser utilizado para estabilizar o gel de alginato é a reticulação covalente. Este método resulta em um gel com grande estabilidade e resistência mecânica, mas esta técnica utiliza substâncias químicas altamente reativas, limitando sua aplicação para encapsulação de células mortas ou outras substâncias, como fármacos ou herbicidas, que não sofrem alterações durante este processo (SMIDSRØD & SKJÅK – BRÆK, 1990).

Os policátions mais utilizados na formação de cápsulas ou membranas em gotas de gel de alginato de cálcio são a polilisina e a quitosana. A polilisina é um produto muito mais caro que a quitosana e sua ligação com o alginato é mais fraca do que a ligação entre alginato e quitosana (LEE et al., 1997; GÅSERØD et al., 1999).

A quitosana é um poliaminossacarídeo natural, derivado da N-deacetilação da quitina (Figura 3). A quitina é, depois da celulose, o segundo polissacarídeo mais abundante na terra. Ela é considerada o principal constituinte do exoesqueleto de insetos e parede celular de leveduras e fungos, onde sua quantidade relativa é em torno de 30 a 60% (PETER, 1995). Ela é um polímero constituído de ligações β -1-4 glucosamina, com alto grau de N-acetilação, sendo

assim, insolúvel em soluções aquosas. Quando este polissacarídeo é adicionado em solução alcalina, a proporção de grupos N-acetil diminui, obtendo-se a quitosana com a conversão das unidades glucosamina para uma forma solúvel, $R-NH_3^+$. Ela é uma base fraca, solúvel em soluções ácidas diluídas (LIN & LIN, 1992).

O maior produtor de quitina e quitosana é o Japão, onde se concentram também a maioria dos trabalhos científicos sobre seus usos.

Figura 3 – Estrutura química da quitina e da quitosana

Primeiramente a quitosana foi utilizada como floculante no tratamento de águas residuais e, recentemente, tem sido utilizada, também, no campo da biomedicina e farmacêutico, devido às suas propriedades de biodegradabilidade, baixa toxicidade e biocompatibilidade (HIRANO & NOISHIKI,

1985). A quitosana tem sido ainda utilizada pelo seu efeito antiácido e pela sua capacidade de abaixamento na taxa de colesterol dos alimentos ingeridos. Também é utilizada no tratamento de queimaduras, cicatrização de feridas, para lentes de contato firmes e macias, para membranas de órgãos artificiais e encapsulação de enzimas e células vivas (LIN & LIN, 1992).

As cápsulas de alginato-quitosana podem ser produzidas por diferentes procedimentos, ilustrados na Figura 4. No procedimento I, o processo pode ser feito em uma etapa, com o gotejamento de uma solução de alginato de sódio em uma solução de CaCl_2 , contendo quitosana, ou em duas etapas, onde uma solução de alginato de sódio é gotejada em uma solução de CaCl_2 , sendo posteriormente transferida para uma solução de quitosana (0,1 a 0,8%) aonde ocorrerá a formação da membrana na superfície das gotas. No procedimento II, o gotejamento da solução de alginato de sódio é feito primeiro em uma solução de quitosana e, depois, o CaCl_2 é adicionado (Figura 4). Estes procedimentos resultam em partículas com resistência mecânica, porosidade, tamanho, intumescimento, permeabilidade e taxas de liberação características (MURATA et al., 1993b; GÅSERØD et al., 1999).

Figura 4 – Diagrama representando a interação da quitosana com o alginato (adaptado de MURATA et al., 1993b).

Procedimento I - alginato gelificado com cálcio e complexado com quitosana.

Procedimento II – alginato complexado com quitosana e depois gelificado com cálcio.

2.2.3.3 Aplicações do alginato

O alginato possui muitas aplicações na tecnologia farmacêutica e de alimentos e sua gelificação por cátion divalentes é amplamente utilizada (LEE et al., 1997). A gelificação de alginato com o cálcio (ALG-Ca) é utilizada para imobilização de células, para a produção de órgãos artificiais híbridos, para o transporte de hemoglobina e em sistemas de liberação de fármacos, especialmente macromoléculas (HARI et al., 1996b).

MARTINSEN et al. (1989) estudaram a capacidade de retenção de proteínas com vários pesos moleculares em micropartículas feitas de alginato de cálcio, utilizando alginatos com proporções diferentes entre M:G. Verificaram que, quanto menor a relação M/G, menor o intumescimento e maior a porosidade e resistência mecânica das partículas. Observaram, também, que a porcentagem de retenção aumentava com o aumento do peso molecular da proteína. TANAKA et al. (1984) verificaram que micropartículas de ALG-Ca retinham somente moléculas com peso molecular maior que 2×10^4 como albumina, γ -globulina e fibrinogênio. GRAY & DOWSET (1988) estudaram a estabilidade em tampão fosfato pH 7,8 de micropartículas de ALG-Ca contendo insulina.

Encontram-se na literatura, vários estudos sobre a preparação de micropartículas de ALG-Ca para encapsulação de fármacos como cloranfenicol e sulfadiazina (SALIB et al., 1978), sulfametoxazol (BADWAN et al., 1985), teofilina (ØSTBERG et al., 1992, ØSTBERG & CHRISTINA, 1994), nifedipina (ACARTÜRK et al., 1999) e dipiridamol (GURSOY et al., 1999). Nestes trabalhos, o enfoque principal tem sido a estabilidade, a retenção e a liberação do fármaco das micropartículas, em função de variáveis do processo (concentração do alginato, do fármaco e de CaCl_2).

PFISTER et al., (1986), estudando a liberação em H_2O de vários tipos de herbicidas encapsulados em micropartículas de ALG-Ca, verificaram que, quanto menor a solubilidade do herbicida, mais lenta era a sua liberação.

O uso de gotas feitas com gel de ALG-Ca destaca-se como método promissor e versátil para encapsulação de células vivas.

No tratamento de diabetes, muitos testes com transplante de células pancreáticas não foram viáveis devido à rejeição desencadeada pelo sistema imunológico. No entanto, o uso de Ilhotas de Langerhans, incluídas em cápsulas de alginato tem proporcionado bons resultados. Os primeiros testes foram realizados no St. Vincent Hospital de Los Angeles em 1993. Cada cápsula contém centenas de células β de cadáveres humanos produzindo insulina e age como um pâncreas artificial. As células são suspensas em gel de alginato de cálcio e revestidas com uma membrana formada pelo complexo alginato-polilisina (SKAUGRUD, 1995).

PEIRONE et al. (1998) encapsularam vários tipos de células recombinantes de mamíferos para serem utilizadas em terapias gênicas com ALG-Ca e ALG-Ba recobertas com uma membrana de alginato-polilisina.

Existem inúmeros trabalhos que estudam os mais diversos microorganismos para as mais diversas finalidades, depois de encapsulados em partículas de ALG-Ca.

DAINTY et al. (1986) estudaram a encapsulação de células de algas para utilização em bioreatores na produção de biomoléculas complexas. CASSON & EMERY (1987) observaram a estrutura de partículas de ALG-Ca, contendo *Saccharomyces cerevisiae*, para serem utilizadas na fermentação alcoólica.

Vários pesquisadores encapsularam diferentes microrganismos com a finalidade de protegê-los durante a degradação de produtos tóxicos em águas residuais (KEWELOH et al., 1989; XIAOMING et al., 1996; BANDHYOPADDHYAY et al., 1999).

BASHAN et al. (1999) mostraram que dois tipos de bactérias que melhoram o crescimento de plantas, quando inoculadas juntamente com as sementes, mantiveram sua viabilidade e capacidade de aumentar o crescimento das plantas, depois das micropartículas secas de ALG-Ca terem sido armazenadas por 14 anos, em temperatura ambiente. ELÇIN (1995) encapsulou o *Bacillus sphaericus* em gel de ALG-Ca e verificou que a atividade bioinseticida contra larvas do mosquito *Culex* foi mantida e que o processo de encapsulação

protegeu o microorganismo encapsulado de irradiações UV e de exposição a valores extremos de pH.

Microcápsulas com um núcleo de gel de ALG-Ca e uma membrana de alginato-quitosana (ALG-QUI) têm sido amplamente investigadas para obtenção de um sistema que resulte em uma liberação sustentada de um material encapsulado por um tempo mais prolongado e, também, para aumento da retenção e da estabilidade das micropartículas.

SEZER et al. (1999 a e b) concluíram que o recobrimento de géis de ALG-Ca com o polímero policatiônico quitosana aumentava a retenção de macromoléculas e moléculas pequenas nas micropartículas obtidas. A estabilidade em tampão fosfato pH 7,4 também foi melhorada.

A liberação da albumina em microcápsulas de ALG-QUI foi estudada por diferentes pesquisadores (POLK et al., 1994; HARI et al., 1996b; OKHAMAFE et al., 1996; HUGUET & DELLACHERIE, 1996). Eles verificaram que, quanto maior o peso molecular da quitosana utilizada, mais lenta foi a liberação. Estudaram, também, a concentração ideal para maior retenção da albumina, utilizando soluções de quitosana com concentrações de 0,3 a 0,8 %.

A retenção de vários fármacos, microencapsulados em partículas de ALG-QUI, assim como a estabilidade destas partículas, foi bastante estudada, em função de variáveis do processo de obtenção. Alguns fármacos estudados foram a guaifenesina (LEE et al., 1997), sal de diclofenato (FERNANDEZ-HERVÁS et al., 1998) e fenitoina (MURATA et al., 1999b).

Por outro lado, o uso de cápsulas de ALG-QUI para imobilização de células não tem sido muito estudado. LI (1996) estudou o aumento da estabilidade de gotas de ALG-Ca na encapsulação de *Saccharomyces cerevisiae*. Acrescentou poliânions, como trifosfato e pirofosfato, na solução de alginato de sódio, antes de gotejá-lo na solução de quitosana. Com isto, o autor conseguiu obter partículas estáveis em tampão fosfato, pH 5,5, por 48h. PANDYA & KNORR (1991) observaram que a viabilidade de células de plantas, encapsuladas em partículas de ALG-QUI, foi devidamente mantida.

2.3 BIOINSETICIDA

Todo ano, pragas provocadas por insetos causam uma perda entre 15 e 25% da produção agrícola mundial. Várias estratégias têm sido utilizadas para reduzir e controlar estes danos na agricultura, sendo a principal delas, o uso de pesticidas químicos. A aplicação destes compostos sintéticos tem resultado na estabilidade ou mesmo em um aumento na produção agrícola; no entanto, esta estratégia tem apresentado outros sérios problemas. Assim, o uso em larga escala destes pesticidas, que muitas vezes é feito de maneira inapropriada, também vem causando danos ao homem e ao meio ambiente, contaminando alimentos, solo, água e favorecendo uma rápida seleção de insetos resistentes (SANCHIS et al., 1999).

Além disso, o uso de inseticidas químicos leva a desequilíbrios biológicos causados pela destruição de outros insetos úteis, como polinizadores e controladores naturais de pragas. Finalmente, estes produtos químicos são geralmente tóxicos, inclusive para os aplicadores dos mesmos.

O controle de insetos-praga é um aspecto fundamental na produção agrícola, tanto para grandes como para pequenos produtores. O mercado mundial de agroquímicos está estimado em 30 bilhões de dólares, dos quais 25% corresponde ao controle de insetos (ALVES, 1998). Nos dias de hoje, apenas uma pequena proporção deste mercado de 0,7% está baseado na utilização de inseticidas biológicos. O percentual é aparentemente pequeno, porém esse mercado está crescendo entre 10 e 25% ao ano, contra um crescimento do mercado de pesticidas químicos a taxas de 1 a 2 % ao ano (NARDO & CAPALBO, 1998). O uso de biopesticidas na América Latina é ainda muito limitado, correspondendo a 8% do mercado mundial. No entanto, prevê-se que esta utilização aumente, à medida que, legislações mais rigorosas voltadas à proteção ambiental forem adotadas e produtos mais eficientes e baratos forem desenvolvidos e lançados no mercado de insumos agrícolas (DIAS, 1992).

Uma alternativa ao controle químico é o controle biológico de insetos, isto é, o envolvimento de outros seres vivos para controlar insetos-praga. O uso de microorganismos na agricultura para este fim já e vem sendo empregado desde os anos 70, devido aos problemas advindos da utilização dos inseticidas químicos, já mencionados aqui. Muitos microrganismos são utilizados no controle de pragas da agricultura, destacando-se as bactérias, fungos e vírus. Eles podem ser formulados ou não, aplicados de maneira similar a um inseticida químico. Os produtos que utilizam microorganismos para controlar insetos que sejam nocivos à agricultura ou vetores de doenças são denominados de bioinseticidas.

No Brasil, gasta-se em torno de US\$ 5 milhões com a compra de bioinseticidas, ou seja, 1% do valor total de inseticidas. O mercado de bioinseticida no Brasil é bastante limitado pelo alto custo dos produtos (quase todos importados), pela falta de assistência técnica e de normas objetivas e adequadas à avaliação desta categoria de produtos (ALVES, 1998).

Os bioinseticidas mais utilizados no mundo são à base de preparações com a bactéria *Bacillus thuringiensis*, mais conhecida como **Bt** (POWELL, 1993). Esta espécie de bactéria é aeróbica, gram positiva e caracteriza-se pela produção, no momento de sua esporulação, de inclusões protéicas cristalinas responsáveis pela sua atuação entomopatogênica. Estas inclusões se distinguem como cristais de formas definidas por microscopia de contraste de fase. São formadas por várias cadeias de polipeptídios e denominados δ -endotoxina ou proteínas Cry, as quais são altamente tóxicas a uma grande variedade de insetos pragas importantes na agricultura e para a saúde pública (BRAVO, 1997).

As δ -endotoxina apresentam peso molecular variando de 65 a 138 kDa. O processo de formação desse cristal está ligado à esporulação da célula vegetativa e ele é liberado quando as células são lisadas, no final da esporulação, juntamente com o esporo (MONNERAT & BRAVO, 1999). Dependendo da espécie de inseto atingido, tem sido demonstrado que a presença dos esporos potencializa os efeitos tóxicos da δ -endotoxina (JOHNSON et al., 1996) e que alguns destes esporos contém toxina na superfície (DU et al., 1996).

A δ -endotoxina na forma como é sintetizada, apresenta-se como pró-toxina, sem ação entomopatogênica, necessitando ser ativada para o desencadeamento de seus efeitos tóxicos. Seu modo de ação se faz por via oral, dependendo de uma série de passos: primeiramente, é necessário que o cristal protéico seja ingerido pela larva de um inseto susceptível, ocorrendo, a seguir, uma solubilização do cristal no intestino médio do inseto, devido ao pH básico, em torno de 10, nesse local. Depois disso, pela ação de proteases específicas, a toxina é liberada na sua forma ativa, ligando-se a partir daí, a receptores específicos, localizados na membrana das células epiteliais do intestino do inseto, o que resulta em lise celular, suspensão da alimentação, paralisia intestinal e a morte da larva do inseto (LERECLUS et al. 1993).

Segundo BRAVO (1997), programas intensivos de *screening*, em todas as partes do mundo, têm identificado cepas de **Bt** de amostras de solo, superfície de plantas, insetos mortos e grãos estocados. As cepas isoladas mostram uma faixa ampla de especificidade contra diferentes ordens de insetos (Lepdoptera, Díptera, Coleoptera, Homenoptera, Phthiroptera e Acari) e outros invertebrados (Nemathelminthes, Platyhelminthes e Sarcomastigophora).

O uso do **Bt** no Brasil cobre uma área de 150.000 ha e vários produtos comerciais têm sido utilizados, sendo a Abbott Laboratórios do Brasil Ltda o principal fornecedor (ALVES, 1990).

Os mais importantes vírus empregados no controle biológico estão concentrados na família Baculoviridae. Cerca de 600 espécies de insetos, incluindo lepidópteros, himenópteros, coleópteros e dípteros foram relatadas como suscetíveis aos Baculoviridae (GRANADOS & FEDERIZI, 1986). No entanto, a maioria dos Baculovirus é bastante específica, afetando, geralmente, uma única espécie de inseto dentro do gênero. Por outro lado, devido à sua alta especificidade, eles são considerados extremamente seguros (NARDO & CAPALBO, 1998).

Talvez, o caso de maior sucesso registrado no mundo venha ocorrendo no Brasil, no controle da lagarta da soja, a *Anticarsia gemmatalis*, pelo uso do *Baculovirus anticarsia* (**Bv**), um vírus da poliedrose nuclear. O Centro

Nacional de Pesquisa da Soja da EMBRAPA, em Londrina, no estado do Paraná, já transferiu a tecnologia lá desenvolvida para algumas empresas privadas (AZEVEDO, 1998) e, anualmente, 500.000 ha da cultura da soja têm sido tratadas com o vírus.

As partículas do vírus da lagarta da soja, como todo Baculovirus, apresentam a forma de bastonetes e são denominados vírions. Os vírions são incrustados em uma matriz protéica de formato poliédrico, a qual confere uma certa proteção às partículas do vírus. Os poliedros, embora diminutos, são facilmente visíveis no microscópio óptico, a um aumento de 400 vezes.

O vírus só vai atuar sobre a lagarta quando ingerido. Os poliedros localizados sobre as folhas de soja, ao serem ingeridos pela lagarta, atingem o intestino do inseto e ali são dissolvidos, propiciando a liberação das partículas de vírus, os vírions. Estes penetram na membrana da parede intestinal, atingem a hemolinfa e multiplicam-se no núcleo de células de diferentes tecidos. As consequências do processo de infecção iniciam-se com a suspensão da alimentação e duram em média de seis a sete dias até a morte da lagarta (MOSCARDI, 1983).

Vários vírus têm sido registrados para uso nos Estados Unidos e na Europa mas, na realidade, poucos são comercialmente produzidos no mundo. As principais razões para a pequena comercialização de vírus são, em geral, seu alto custo de produção, tanto *in vivo* como *in vitro*, e a demora para matar a praga, característica geralmente não aceita favoravelmente pelos agricultores. Outros fatores negativos apontados são a alta especificidade e a falta de formulações apropriadas que contenham uma proteção efetiva contra as irradiações ultravioletas, que diminuam a atividade residual do **Bv** sobre as folhas, exigindo, em certos horários do dia, cuidados na aplicação (NARDO & CAPALBO, 1998).

2.3.1 Formulações de bioinseticidas

A produção dos microrganismos utilizados para controle biológico, assim como formulações adequadas destes microrganismos, são áreas pouco desenvolvidas, apesar da enorme quantidade de informação científica disponível sobre as características dos microrganismos entomopatogênicos e o comportamento dos insetos-praga.(MELLO & AZEVEDO, 1999). Formulações que sejam econômicas e que possam liberar organismos vivos no seu local de ação são fatores críticos para o desenvolvimento de produtos efetivos no biocontrole de patógenos das plantas.

Uma boa formulação é a base para o sucesso de um bioinseticida (ALVES, 1998). Ela deve levar em conta os seguintes fatores:

- A manutenção das características do microrganismo entomopatogênico, necessárias para sua atuação como bioinseticida. No caso do **Bt**, a manutenção da viabilidade do esporo e a integridade do cristal protéico são fundamentais, assim como a integridade dos poliedros para o **Bv**.
- A biologia e o comportamento do inseto alvo.
- Ser de fácil aplicação nas culturas.
- Ter tamanhos de partículas não maiores de 300 µm (100 mesh), para prevenir o entupimento dos equipamentos de pulverização (BEEGLE et al., 1991), assim como garantir a ingestão pelas pragas alvo.
- Possibilidade de armazenamento por um maior tempo possível (pelo menos 24 meses) em condições ambientais, sem afetar as propriedades do bioinseticida.
- Proteger o material ativo, esporos e toxinas para o **Bt** e os vírions para o **Bv**, das irradiações de UV, principalmente se forem depositados sobre a superfície foliar. Isto prolongaria a eficiência do bioinseticida no campo.

- Proteger o material ativo das condições adversas, como baixa umidade, extremas temperaturas e presença de outros microrganismos.
- Presença de ingredientes que possam contribuir para o aumento da estabilidade, virulência e eficácia do bioinseticida.
- Deve ser facilmente dispersada em água para a obtenção de uma suspensão homogênea.
- Apresentar uma liberação do material ativo somente no ambiente aonde irá atuar, como no intestino da lagarta.
- Baixo custo para poder garantir competitividade no mercado.

Cerca de 92% dos bioinseticidas comercializados são preparados com **Bt**. As formulações sólidas são mais adequadas para as espécies de **Bt** que matam lagartas que se alimentam de folhas de plantas baixas, como milho e soja. Podem ser pós, contendo o microrganismo seco com ingredientes inertes, aplicáveis como dispersões aquosas ou como grânulos secos, aplicados no solo ou na inserção da folha no caule (ALVES, 1998). A maior parte destas formulações possui uma atividade inseticida residual pequena, causada pelo arraste do produto pela chuva ou pela inativação causada pela luz solar. Além disso, a maioria das preparações comerciais dessas espécies de **Bt** não é atrativa para os insetos, limitando a sua eficácia (GILLESPIE et al., 1994). Esforços para contornar estes problemas têm sido feitos com o desenvolvimento de adjuvantes contendo amido de milho (BARTELT et al., 1990 e McGUIRE & SHASHA, 1992) ou farinha de milho (McGUIRE et al., 1996) como aditivos nos tanques de pulverização. Por outro lado, a adição destes adjuvantes em quantidades específicas na hora da pulverização dificulta a sua utilização, necessitando de embalagens individuais, uma para o bioinseticida e outra para o adjuvante.

O desenvolvimento de formulações em grânulos insolúveis, que são aplicados secos, tem resultado em um aumento na atividade do bioinseticida (DUNKLE & SHASHA, 1988 e TAMEZ-GUERRA et al., 1996). No entanto, o uso

desses grânulos grandes é restrito ao milho e outras plantas com características anatômicas tais que garantam a retenção desses grânulos.

TAMEZ-GUERRA et al. (1996) investigaram uma formulação pulverizável que aumentou o tempo de atividade do bioinseticida no campo. Os aditivos protetores (amido pregelatinizado, açúcar, ácido cítrico e verde malaquita) mantinham um contato com o ingrediente ativo (microrganismo + toxina) durante o armazenamento, na mistura no tanque de pulverização e no processo de aplicação. Durante a formulação, o *Bt* foi adicionado à mistura e as micropartículas foram obtidas por processo de *spray drying*. As micropartículas obtidas eram menores que 250 µm (60 mesh).

A maioria dos bioinseticidas virais usados comercialmente tem sido formulada como pó molhável e a secagem constitui uma etapa importante no desenvolvimento do produto (ALVES, 1998). Suspensões de lagartas mortas pelo vírus, depois de maceradas e filtradas, também têm sido utilizadas e aplicadas na avoura da mesma forma que um inseticida químico (MOSCARDI, 1983). BATISTA (1985) realizou estudos preliminares do emprego da liofilização como processo de preservação de *Baculovirus anticarsia*, obtendo produtos com alta potência.

A baixa eficácia de muitas formulações contendo bactérias e vírus resulta da perda da atividade biológica depois da aplicação no campo. Isto se deve a causas diversas, dentre elas, desnaturação do cristal ou dos poliedros pela luz solar, pouco tempo de persistência no local de aplicação devido à chuva, perda da viabilidade devido aos raios UV, baixa umidade, altas temperaturas e acidez ou ainda, sedimentação em ambientes aquáticos (BURGES, 1998 e SKOVMAND et al., 1999).

Muitos esforços têm sido feitos com a adição de protetores solares e nutrientes na preparação de novas formulações, para aumentar a meia vida dos produtos utilizados para controle biológico. A substância protetora utilizada, assim como outros ingredientes da formulação, devem ter grande aderência ao material responsável pela atividade bioinseticida, para que sua proteção seja efetiva. Para superar esta limitação, a preparação de formulações com produtos que

encapsulem os microorganismos e as toxinas formando um filme protetor ao redor de ambos, parece ideal (COKMUS & ELÇIN, 1995 e BURGESS, 1998).

LAMBERT & PEFEROEN (1992) citam dois produtos registrados, o MVP e o M-one Plus, fabricados pela empresa Mycogen, que consistem de **Bt** encapsulados de duas variedades diferentes. No entanto, a falta de formulações, tecnologias de aplicação mais adequadas e o alto custo de produção do produto, ainda são os grandes empecilhos para o desenvolvimento de bioinseticidas efetivos (NARDO & CAPALBO, 1998). Portanto uma maior ênfase e novos estudos são ainda necessários para um avanço significativo no desenvolvimento de formulações efetivas para o controle de insetos-praga na agricultura.

2.3.2 Alginato como polímero encapsulador de bioinseticida.

A não toxicidade e a biodegradabilidade de partículas de alginato são atrativos interessantes para o uso desse polímero em formulações adicionados ao solo. (KITAMIKATO et al., 1990). Formulações com alginato, como polímero encapsulador, propiciam um ambiente protetor para os microorganismos, quando comparado a outros carreadores, como argila e farinha de milho, preservando a viabilidade e a atividade biológica por um longo período de tempo (BASHAN, 1986; TREVORS et al., 1993; McLOUGHLIN, 1994). Uma outra característica interessante de partículas de alginato é a habilidade de liberarem lentamente os microorganismos na terra ou rapidamente em pH básico ou, ainda, na presença de sais seqüestradores de cálcio (BASHAN, 1986).

Como o processo de encapsulação com o alginato é feito em condições de “não stress” ou brandas, como temperatura ambiente, pH neutro, baixas concentrações de íons reticulantes e rapidez na gelificação, existem grandes chances de se manter a viabilidade dos microorganismos, depois de encapsulados (CASSIDY, et al., 1996; e DAIGLE & COTTY, 1995).

Muitos trabalhos apresentados na literatura estudam a encapsulação de microorganismos, com inúmeras finalidades para serem adicionados ao solo, mas são poucos aqueles que estudam a encapsulação de microorganismos para usos específicos como bioinseticidas.

FRAVEL et al. (1985) estudou a conservação da viabilidade durante e depois da encapsulação, com alginato, de conídios de vários fungos e células de *Pseudomonas* utilizados no controle biológico de pragas. Observou que todos os fungos permaneceram viáveis após a formação de partículas de alginato de cálcio, mas, depois de quatro semanas, a população viável diminuía de 10 a 100x.

Por outro lado, BASHAN et al. (1999) observaram que partículas de alginato de cálcio secas, contendo ou não leite desnatado, mantiveram um grande número de células viáveis das bactérias *Azospirillum brasilienses* e *Pseudomonas fluorescens* (10^5 - 10^6 UFC/g), depois de 14 anos armazenadas em temperatura ambiente.

AXTELL & GUZMAN (1987) encapsularam, também em alginato, um fungo que mata larvas do mosquito *Culex quiquefasciatus*. Observaram que este microorganismo se mantinha efetivo depois de encapsulado e armazenado a 15°C, por 75 dias. As partículas foram feitas em condições adequadas de assepsia, mas não em condições estéreis e um nível baixo de contaminação foi desenvolvido depois do armazenamento. Estas partículas de alginato também provocaram menor abrasão nos bicos dispersores em comparação aos pós molháveis que utilizam argilas na formulação.

DeLUCCA et al. (1990), desenvolveram uma formulação que continha partículas de alginato encapsulando o fungo *T. flavus* utilizado no biocontrole de patógenos de plantas. Eles verificaram que a viabilidade deste microorganismo se manteve por 84 dias.

A maioria destes trabalhos científicos mostra estudos com partículas de alginato de cálcio obtidas com técnicas de gotejamento, onde as partículas resultantes variam entre 1 a 4 mm. No entanto, elas seriam inviáveis na utilização como bioinseticida em aplicações de larga escala, com o emprego dos equipamentos de pulverização disponíveis.

Apoiado nas informações técnico-científicas desta revisão bibliográfica, o estudo aqui realizado sobre o desenvolvimento e avaliação de

micropartículas contendo microrganismos viáveis com potencial uso como bioinseticidas, concentrou-se na investigação das seguintes técnicas de microencapsulação: 1) *spray drying* e 2) reticulação de alginato de sódio com íons cálcio, com e sem a presença de quitosana.

Durante o processo de preparação das micropartículas, investigou-se a influência de parâmetros de processo e composição das formulações nas características físico químicas e de desempenho dos produtos encapsulados obtidos.

A técnica e as formulações mais promissoras foram testadas para a microencapsulação de microrganismos entomopatogênicos, que matam lagartas de plantações de milho e soja, como uma variedade de **Bt**, a *krustaki* (**Btk**) e de vírus, o *Baculovirus anticarsia gemmatalis* (**Bv**).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

A Caseína (Cas) foi adquirida da Inlab, a Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) foi obtida da Sigma e a Hidroxietilcelulose (HEC) foi da marca Cellosize QP-100.

O Alginato (ALG) de sódio utilizado foi fornecido pela SKW-Biosystems, denominado Saltialgine 1100x, apresentando uma viscosidade de 550-750 mPa.s em soluções aquosas 1%, a 20°C e pH entre 6 e 8,5. As Quitosana (Sigma) utilizada foram de baixo e médio peso molecular (PM) e apresentando uma viscosidade de 10 e 70 mPa.s, respectivamente, quando dissolvida em HCl em uma concentração de 0,5% e uma temperatura de 25°C. O grau de deacetilação da quitosana de baixo PM foi de 75-85%. Todos os outros reagentes utilizados, como acetato de sódio, ácido clorídrico e cloreto de sódio foram de grau analítico.

3.2 PREPARAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS POR *SPRAY DRYING*

As micropartículas foram produzidas em um *spray drier* mostrado esquematicamente na Figura 5, que foi projetado e montado no Departamento de Ciências Farmacêuticas, da USP- Ribeirão Preto.

A altura da câmara de secagem do *spray drier* era de 50 cm com 9 cm de diâmetro, feita de vidro e acoplada a uma base cônica, com ângulo de 60°C (Figura 5).

Figura 5 – Esquema do *spray drier* utilizado.

1- câmara de secagem; 2- bico de atomização (duplo fluido), 3- entrada do ar de atomização, 4- entrada da alimentação (dispersão polimérica), 5- distribuidor do ar, 6- entrada do ar soprador, 7- ciclone, 8- frasco coletor, 9- saída do ar, 10- medida da temperatura de saída, 11- medida da temperatura de entrada.

O bico atomizador utilizado era do tipo duplo fluido, com mistura interna, cujo diâmetro externo era de 1,0 mm. As temperaturas de entrada e saída foram medidas por um termopar e variaram de 85 e 105°C e de 65 e 75°C, respectivamente. As duas entradas do ar de atomização tiveram a pressão mantida em 15 l/min. A vazão de alimentação era regulada por uma bomba peristáltica e foi de 2 ou 8 ml/min. A alimentação era realizada com duas misturas poliméricas aquosas, CasHPMC ou CasHEC, 1:1, com uma concentração final de 1,5%, sob agitação constante. Elas eram colocadas em um becker pesado antes e depois da secagem, para o cálculo da massa polimérica adicionada no início do processo. A massa recuperada no coletor, depois de resfriada, era colocada em um saco plástico e pesada.

Os adjuvantes ou aditivos polisorbato 80 (Tween 80), ou lactose, eram adicionados na dispersão polimérica, um pouco antes do início do processo, na proporção de 0,5% e 10% (p/V), respectivamente.

O rendimento era calculado pela relação entre a massa recuperada no coletor e a massa de polímeros, mais aditivos, introduzida no equipamento, multiplicada por 100.

Para se verificar qual o máximo rendimento que poderia ser esperado com o equipamento de *spray drier* utilizado, este aparelho foi alimentado com uma solução de Na₂SO₄ a 20%, mantendo-se uma temperatura de entrada de 85°C e uma vazão de alimentação de 2,0 ml/min. No final, a massa obtida foi quantificada. A média de rendimento foi de 14%. Isto indica que grande parte do produto deve estar sendo perdida durante o processo da seguinte maneira:

- na parede da câmara de secagem que ficou toda esbranquiçada, devido à aderência e à secagem do sal
- no cone de saída da câmara de secagem e no início do tubo coletor, onde houve um acúmulo de uma grande quantidade de sal nas paredes
- ao redor do bico de atomização, onde foi observada a formação de bolhas indicando vazamento nos encaixes.

3.3 PREPARAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS POR ATOMIZAÇÃO E GELIFICAÇÃO

O equipamento utilizado para gelificação de microgotículas de alginato de sódio é mostrado na Figura 6. Ele consiste de um reator de 4 litros, aberto, encamisado, onde a solução gelificante de CaCl_2 era adicionada e a temperatura controlada em 20°C. A solução contida no reator era agitada durante todo o processo de preparação por um agitador mecânico, a uma velocidade de 150 – 200 rpm.

A solução de alginato de sódio 2%, preparada com água deionizada, era atomizada no reator utilizando-se um bico de duplo fluido, de mistura externa, com diâmetro de 1,0mm (dispositivo acessório de um *spray dryer* BÜCHI 190). O ar de atomização era mantido a uma pressão de 5 bar e o fluxo em 400 NI/h. A vazão de alimentação era regulada para 1,5ml/min. A distância entre o bico de atomização e a superfície da solução gelificante no reator foi fixada em 18cm e a temperatura de trabalho, em 20°C. As microesferas ou micropartículas formadas de alginato de cálcio eram mantidas sob agitação nesta solução, por 30 minutos, depois do final da atomização.

Em seguida, estas micropartículas gelificadas foram filtradas a vácuo e lavadas com água, por duas vezes. Duas lavagens finais foram realizadas, com etanol, a 50% e a 99%. Depois disso, as micropartículas foram espalhadas cuidadosamente em um vidro relógio e colocadas em dessecador a vácuo, para secagem à temperatura ambiente, por 24 horas. Depois de secas, as micropartículas, armazenadas em frascos de vidro, eram mantidas em dessecador para serem posteriormente caracterizadas.

Legenda:

- 1) banho termostatzado
- 2) reator encamizado
- 3) bico atomizador
- 4) agitador mecânico
- 5) bomba dosadora

Figura 6 – Equipamento utilizado para obtenção de micropartículas por atomização: (a) esquema geral, (b) detalhe do reator.

Quando foi realizado um estudo da influência do leite desnatado(LD) nas micropartículas, este foi adicionado na solução de alginato de sódio 2,5%, depois de previamente dissolvido, para obtenção de uma solução homogênea de alginato de sódio 2,0%, contendo uma determinada porcentagem de LD(2 e 0,5%).

O recobrimento das micropartículas de alginato de cálcio com quitosana de baixo PM foi realizado por dois tipos de procedimentos, esquematizados na Figura 7 e também, identificados e descritos de forma resumida, na Tabela 1.

No **procedimento I** desenvolvido em **uma etapa**, a atomização da solução de alginato de sódio ocorreu diretamente em uma solução de quitosana 0,5%, contendo CaCl_2 0,1M (Fig. 7a). A quitosana foi dissolvida com tampão acetato de sódio 0,1M (TacNa) ou HCl, com pH acertado para 5,0.

O **procedimento I**, desenvolvido em **duas etapas**, tem como primeira etapa a atomização da solução de alginato de sódio em uma solução de CaCl_2 0,1M e, em uma segunda etapa, o recobrimento com quitosana das microesferas formadas anteriormente (Fig.7b). Esta segunda etapa, foi realizada de duas maneiras diferentes:

- 1) Adicionando uma solução de quitosana 1% dissolvida em TacNa ou HCl, pH 5,0 na solução de CaCl_2 0,1M, utilizada na primeira etapa. A solução final de recobrimento continha quitosana 0,5% e CaCl_2 0,05M.
- 2) Adicionando uma solução de quitosana 0,5%, dissolvida em TacNa ou HCl, no reator, contendo microesferas de alginato de cálcio, obtidas na primeira etapa, que haviam sido previamente lavadas com água, no próprio reator. Esta lavagem anterior ao recobrimento das microesferas com quitosana teve a finalidade de eliminar o CaCl_2 na segunda etapa, com a solução final de recobrimento, contendo somente quitosana 0,5%.

PROCEDIMENTO I

PROCEDIMENTO II

Figura 7 - Esquema dos procedimentos I e II utilizados para o recobrimento de micropartículas de alginato com quitosana: a) processo em uma etapa; b) e c) processos em duas etapas.

Tabela 1 – Identificação e descrição dos procedimentos e processos estudados.

IDENTIFICAÇÃO DO PROCESSO	CONDIÇÕES DE PROCESSO	
	1ª etapa	2ª etapa
1 CaCl ₂ 0,1M	Solução de CaCl ₂ 0,1M	---
1 CaCl ₂ 0,05M	Solução de CaCl ₂ 0,05M	---
1 CaCl ₂ 0,1M TacNa	Solução de CaCl ₂ 0,1M em TacNa	---
PROCEDIMENTO I		
1 QUITacNa + CaCl ₂	Solução de quitosana 0,5% em TacNa com CaCl ₂ 0,1M	---
1 QUIHCl + CaCl ₂	Solução de quitosana 0,5% em HCl com CaCl ₂ 0,1M	---
2 QUIHCl + CaCl ₂	Solução de CaCl ₂ 0,1M	Solução de quitosana 0,5% em HCl com CaCl ₂ 0,05M
2 QUIHCl	Solução de CaCl ₂ 0,1M	Solução de quitosana 0,5% em HCl
2 QUITacNa + CaCl ₂	Solução de CaCl ₂ 0,1M	Solução de quitosana 0,5% em TacNa com CaCl ₂ 0,05M
2 QUITacNa	Solução de CaCl ₂ 0,1M	Solução de quitosana 0,5% em TacNa
PROCEDIMENTO II		
1 QUIHCl 2 QUIHCl + CaCl ₂	Solução de quitosana 0,5% em HCl	Solução de quitosana 0,25% em HCl com CaCl ₂ 0,05M

O número 1, na identificação do processo, significa: uma etapa ou primeira etapa; o número 2 significa: duas etapas ou segunda etapa. A solução atomizada em todos os processos foi de alginato de sódio 2%. A 1ª e 2ª etapa ocorreram no reator mostrado na Figura 6, a 20°C, sob agitação. TacNa: tampão acetato de sódio, 0,1 M, pH 5,0; HCl: ácido clorídrico utilizado para dissolver a quitosana a pH 5,0; QUI: quitosana de baixo peso molecular.

O **procedimento II** foi realizado em **duas etapas** (Figura 4). Na primeira, a solução de alginato de sódio era atomizada diretamente em uma solução de quitosana 0,5%, dissolvida em HCl, contida no reator. Assim, obtinha-se microesferas de alginato de sódio com uma membrana de alginato-quitosana (ALG-QUI) na superfície das gotículas. Depois de 15 minutos do final da atomização, estas microesferas eram gelificadas, em uma segunda etapa, com adição de CaCl_2 0,1M na solução de quitosana 0,5%, utilizada anteriormente (Fig.7c), resultando em uma solução final de quitosana 0,25% mais CaCl_2 0,05M.

No final desses procedimentos as micropartículas obtidas eram filtradas, lavadas por duas vezes com água, depois com álcool 50% e, por último, com álcool 99%. Finalmente, eram espalhadas em um vidro relógio e armazenadas em um dessecador a vácuo, à temperatura ambiente.

A quitosana de PM médio foi dissolvida com HCl, em pH 5,0, e também foi utilizada no procedimento I, desenvolvido em 2 etapas, sem a presença de CaCl_2 na solução de recobrimento.

Os processos, descritos na Tabela 1, utilizados para microencapsular os agentes microbianos com ação bioinseticida foram, para o **Btk**, 1 CaCl_2 0,1M (BT7 e BT8) e 2 QUIHCl (BT9) enquanto que, para o **Bv**, foram 1 CaCl_2 0,1M (BV4), 2 QUIHCl (BV5), 1 QUIHCl + CaCl_2 (BV6) e 1 CaCl_2 0,1M+0,5%LD (BV7).

3.4 OBTENÇÃO DOS MICROORGANISMOS

3.4.1 Esporos e toxinas de Btk

A cepa S93 de *B.thuringiensis* var.*kurstaki*, utilizada neste trabalho, foi isolada de amostras de solo brasileiro pelo CENARGEN-EMBRAPA. Os cristais de δ -endotoxinas, produzidos por esta cepa, são de dois tipos: bipiramidal e cúbico, conforme observado por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) por DE-SOUZA et al. (1999) e mostrado na figura 8.

A massa de esporos e toxinas deste **Btk** foi obtida por fermentação realizada pelo Laboratório de Fermentações Industriais do Agrupamento de Biotecnologia, do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo. A fermentação teve um tempo de duração de 48h e o caldo fermentado foi acidificado com ácido fosfórico para pH 5,3. Um litro desse caldo foi congelado e os quatro litros restantes foram centrifugados e lavados com solução salina estéril de NaCl 0,85% a 10.000 rpm, a 20°C, por 30 min. A massa lavada foi ressuspensa em 200 ml de solução salina para obtenção de uma suspensão concentrada de esporos e toxinas de **Btk**. Depois disso, ela foi dividida em volumes menores de 10 ml e conservada no freezer até o momento da preparação das micropartículas.

Figura 8 – Ilustração dos cristais de δ -endotoxinas da cepa S93 de Btk depois de purificados, na época do seu isolamento (SOUZA et al., 1999): a) cristais com formato bipiramidal; b) cristais com formato cúbico.

3.4.2 Poliedros de Bv

A suspensão de **Bv** foi produzida e purificada pelo Centro Nacional de Pesquisa e Monitoramento de Impacto Ambientais (CNPMA), da EMBRAPA, e obtida de lagartas criadas e infectadas em laboratório. A suspensão de **Bv** purificada foi conservada em geladeira, até o momento da preparação das micropartículas.

3.5 DETERMINAÇÃO DA MASSA SECA DOS MICRORGANISMOS

A massa seca das suspensões de **Btk** e de **Bv** foi determinada, adicionando-se em uma placa de Petri tarada, 1,0ml das respectivas suspensões que foram secas em estufa, por 4 horas, a 104°C, até peso constante. Depois de resfriadas em um dessecador, eram pesadas e o peso da placa descontado, para se obter o peso seco das amostras analisadas.

3.6 MICROENCAPSULAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Para a microencapsulação dos microorganismos **Btk** e **Bv**, as respectivas suspensões previamente congeladas eram descongeladas momentos antes de serem misturadas homogeneamente com uma solução de alginato de sódio (2% em massa).

No caso das formulações para microencapsulação de **Btk**, foram adicionados 3,1ml da suspensão concentrada do microrganismo na solução de alginato de sódio para, a partir da massa seca, obter-se 5% (p/p) deste material (esporos+toxinas), em relação à massa total do formulado. Para a formulação que utilizou o **Btk** do caldo final de fermentação, 23,2ml desse caldo foram misturados

à solução de alginato de cálcio, para obtenção de 5% (p/p) deste material, em relação à massa total do formulado.

No caso das formulações com **Bv**, misturou-se 20µl da suspensão purificada à solução de alginato de sódio.

As dispersões de alginato de sódio, contendo os diferentes microrganismos, foram submetidas aos processos 1 CaCl₂ 0,1M (BT7 e BT8) e 2 QUIHCl (BT9), no caso do **Btk**, e 1 CaCl₂ 0,1M (BV4), 2 QUIHCl (BV5), 1 QUIHCl + CaCl₂ (BV6) e 1 CaCl₂ 0,1M+0,5%LD (BV7) no caso do **Bv**, que foram descritos no item 3.3 e Tabela 1. Com isto, obteve-se as micropartículas contendo microrganismos microencapsulados. Depois de secas, estas micropartículas foram utilizadas em bioensaios, para verificação de suas respectivas atividades bioinseticidas, assim como para caracterizações físico-químicas.

3.7 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE DOS ESPOROS DE BTK

O número de esporos viáveis de **Btk** foi obtido por semeadura utilizando-se o meio de cultura sólido, de agar nutritivo, contendo (em g/1000ml de água destilada): extrato de levedura, 1,0; MgSO₄.7H₂O, 0,1; KH₂PO₄, 1,0; caldo nutritivo, 8,0; carbonato de cálcio, 0,1; FeSO₄.7H₂O, 0,01; ZnSO₄.7H₂O, 0,01; agar, 15 e pH acertado para 7,0. A suspensão de esporos foi diluída com salina contendo 0,05% de Tween 80 e um volume de 0,1ml das diluições apropriadas foi espalhado com alça de Drigalski em placas, contendo o meio sólido descrito. Depois disso, as placas foram encubadas, por 15 horas, em estufa á 30°C. O número de esporos viáveis por ml é dado pelo número de colônias, multiplicado por 10 e pela diluição utilizada. Os materiais e as soluções utilizadas no plaqueamento eram estéreis e as técnicas descritas foram realizadas em fluxo laminar.

Para determinação do número de esporos viáveis por grama de formulado, uma quantidade definida de pó foi primeiramente dispersa em 100ml

de citrato de sódio 0,05M estéril, sob agitação, por 15 horas. Depois disso, essa dispersão foi diluída e o plaqueamento foi realizado, conforme descrito acima. O número de esporos por ml foi multiplicado por 100 e dividido pela massa do pó que tinha sido dissolvido para se obter a quantidade de esporos por g de formulado.

3.8 BIOENSAIO CONTRA LAGARTA DO CARTUCHO DO MILHO, *SPODOPTERA FRUGIPERDA*.

As lagartas utilizadas nos bioensaios foram criadas e fornecidas pelo laboratório de Entomologia do CENARGEN-EMBRAPA. A escolha da lagarta *S.frugiperda* foi determinada pela sua maior resistência ao **Btk** do que a lagarta *Anticarsia gemmatilis*.

O microrganismo entomopatogênico avaliado foi o **Btk**, antes e depois de ter sido formulado. As suas suspensões de 1ml de esporos-cristais foram adicionadas em um tubo de ensaio, contendo 9ml água destilada estéril, resultando em uma suspensão-mãe de 100.000 ppm. Com esta solução, procedeu-se às diluições seriadas que variaram de 10^{-1} a 10^{-8} , realizadas em fluxo laminar. Quando as amostras testadas foram os formulados de **Btk**, adicionou-se 10mg das micropartículas obtidas em tubo de ensaio, contendo 10ml de água destilada estéril, obtendo-se uma solução-mãe desses formulados de 1000 ppm. Após completa homogeneização em agitador tipo *vortex*, foram obtidas diluições decimais de 10^{-1} a 10^{-6} com esta suspensão.

Para realização dos bioensaios foi preparada e esterilizada uma dieta artificial para *S.frugiperda*, sem conservante (farinha de feijão, 45,64g; levedo de cerveja, 13,76; germe de trigo, 22g; agar, 5,52 e água, 500ml) que, depois de pronta, foi vertida, ainda quente, nos poços de placas de Elisa, em capela de fluxo laminar. Depois de ter esfriado, 35µl de cada diluição seriada, feita com as amostras a serem testadas, foram espalhados em cima de cada poço. Após secagem da superfície da dieta, foi adicionada uma lagarta de 3º estágio de *S.frugiperda* em cada poço que foi fechado com uma tampa de acrílico. Doze

indivíduos foram testados para cada diluição e foi realizado um controle com dieta, sem esporo cristal. Os bioensaios foram mantidos em sala, com temperatura de aproximadamente 26°C. Após 48 horas, a dieta foi trocada por dieta normal, contendo conservante, porém sem a bactéria. A leitura da mortalidade foi realizada de dois em dois dias, até o sexto dia.

3.9 BIOENSAIO CONTRA LAGARTA DA SOJA, *ANTICARSIA GEMMATALIS*.

As lagartas utilizadas para estes bioensaios foram criadas e fornecidas pelo Laboratório de Entomologia da CNPMA-EMBRAPA.

O microorganismo avaliado foi o **Bv** e para a realização dos bioensaios, foram adicionado 3µl, contendo um número determinado de poliedros em cima de discos de dieta solidificada. Depois da superfície ter secado, foi colocada uma lagarta de *A.gemmatalis* de 3º estágio em cada disco, sendo, depois, tampado. Após 48 horas, a dieta foi trocada por dieta normal, sem o vírus. A leitura da mortalidade foi realizada diariamente até a emergência do adulto. Tecidos de larvas mortas foram examinados ao microscópio para se verificar se a morte foi causada pelo vírus estudado. Foi realizado um controle sem vírus por batelada de bioensaios e 30 indivíduos foram testados para cada amostra.

3.10 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MICROPARTÍCULAS

3.10.1 Microscopia óptica

As fotomicrografias ópticas foram obtidas com um microscópio óptico modelo Eclipse E 400POL, munido de uma câmara fotográfica NIKON, em aumentos de 200, 400 e 1000 vezes.

A coloração do **Btk** foi realizada em lâminas, contendo a amostra fixada. A coloração com o amido black (corante amido Black-MERCK, 1,5g;

metanol 98%, 50ml; água destilada, 40ml; ácido acético, 10ml) foi realizada por 1min e, depois de lavada, foi adicionada uma solução de fucsina por mais 1 min (Sol.I: Fucsina básica-MERCK, 1,0g; metanol 95%, 10ml. Sol.II: fenol, 5,0ml; água destilada, 90ml; as soluções I e II foram misturadas e utilizadas a 30% em solução aquosa).

Também foram feitas colorações do **Btk** com verde malaquita a 6%, em solução aquosa, à quente, por 10 min. Depois de lavadas, foi adicionada uma solução de fucsina por 30 seg.

Depois de coradas, as lâminas eram lavadas e secas para observação no microscópio óptico com aumento de 1000x.

3.10.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia e a estrutura da superfície das micropartículas secas foram observadas através da técnica de microscopia eletrônica de varredura, depois de espalhadas sobre uma fita adesiva de cobre e recobertas com uma fina camada de ouro, utilizando Íon Sputter, JFC-1100. Logo em seguida, foram transferidas para um suporte de alumínio e examinadas em um microscópio JEOL JSM-5200, com uma voltagem de 15 ou 20 KV. As fotomicrografias, mostrando uma visão geral das micropartículas, foram obtidas com aumento de 150x, as que mostram aglomerados, com aumento de 1500 e 2000x e as que mostram a estrutura da superfície, com aumento de 10.000x.

3.10.3 Determinação do teor de cálcio

Uma massa de cerca de 150mg das micropartículas resultantes dos processos estudados foi dissolvida e digerida com 10ml de ácido nítrico concentrado, sob fervura lenta, até secagem de quase todo o volume. Depois de frio, o volume restante foi transferido para um balão de 50ml, diluído com 10ml de ácido nítrico 1% e água deionizada. O conteúdo de cálcio foi determinado por espectrometria de plasma ICP e expresso em porcentagem. As análises foram realizadas em triplicata.

3.10.4 Análise Granulométrica

3.10.4.1 Análise de micropartículas obtidas por *spray drying*

Um analisador de difração a laser MALVERN SB.08 (Malvern Instruments) foi utilizado para medir a distribuição do tamanho das partículas dos pós obtidos por *spray drying*. Alguns miligramas do pó foram suspensos em 150 ml de vaselina líquidos. As suspensões foram submetidas ao ultra-som por 5 minutos, antes de serem adicionadas a uma célula simples com agitação. A distância focal foi de 45 ou 100 nm. O diâmetro do volume médio é o diâmetro de 50% da distribuição de volume, ou seja, D[4,3].

3.10.4.2 Análise de micropartículas obtidas por atomização e gelificação

A distribuição do tamanho das micropartículas por atomização e gelificação foi determinada por difração de raio laser, utilizando analisador MASTERSIZER 2000 (Malvern Instruments). As partículas foram dispersas em água deionizada com vigorosa agitação. O tamanho médio das partículas foi expresso pela média da distribuição de volume (D[4,3]).

3.10.5 Porosidade

Para determinação do volume total de poros, assim como da distribuição do volume entre meso e macroporos medindo de 0,005 μm (50 Å) a 470 μm , utilizou-se um instrumento marca Micromeritics, modelo Autopore III, que opera a pressões de até 4000 bar, com mercúrio.

Uma determinada quantidade de amostra, entre 100 a 150mg, foi pesada e adicionada em uma cela nº 14, que foi vedada e fechada antes de ser introduzida no aparelho. A primeira etapa da análise consistia na obtenção de vácuo dentro da cela e preenchimento com mercúrio. Depois disso, a cela era submetida a pressões crescentes, previamente programadas, as quais resultavam no volume correspondente de uma faixa de tamanho de poros da amostra analisada.

3.10.6 Análise Térmica

As curvas termogravimétricas TG das diferentes micropartículas obtidas por atomização e gelificação foram obtidas com instrumento da SHIMADZU TGA-50. As amostras pesando entre 2 a 6mg eram colocadas em cadinhos de platina. A taxa de aquecimento empregada foi de 10°C/min e a atmosfera de nitrogênio. A faixa de temperatura estudada foi de 25 a 800°C.

3.10.7 Determinação da umidade

A porcentagem de umidade residual das micropartículas, obtidas pelos vários processos estudados, foi determinada, utilizando-se uma estufa à vácuo, com temperatura de 55°C, por 12 horas. As amostras foram pesadas, antes de serem colocadas na estufa (peso inicial) e depois do tratamento térmico descrito (peso final). Com a diferença entre o peso inicial e o final, calculou-se a porcentagem de umidade das micropartículas dos pós analisados.

3.10.8 Determinação da densidade aparente ou de empacotamento

Essa análise foi realizada com o instrumento da AUTOTAP-QUANTACHROME CORPORATION, baseando-se na metodologia descrita em ASTM D 4164-88. Ela consistiu na pesagem de determinada massa de pó, em uma proveta de 10ml. Em seguida, essa proveta foi submetida a 1000 *taps* e o volume resultante foi anotado. O resultado expressa a relação da massa do pó e do volume resultante, depois das micropartículas terem sido compactadas durante os *tappings*, até volume constante.

3.10.9 Determinação da quantidade de água absorvida pelas micropartículas

A razão do aumento de peso dos pós, em função da quantidade de água absorvida foi determinada, em tempos pré-estabelecidos, utilizando-se a aparelhagem descrita por VAN KAMP et al. (1986) e esquematizada na Figura 9.

Figura 9 – Esquema do aparelho utilizado para os estudos do perfil de absorção de água. (1) cilindro para colocação da amostra 2) placa sinterizada sobre a qual é colocada a amostra 3) reservatório de água 4) e 5) válvulas utilizadas para encher o sistema de água antes do início do experimento 6) Becker 7) recipiente de medida com água 8) balança eletrônica → trajeto de deslocamento da água

O funcionamento do aparelho é baseado no princípio de sifonamento. Primeiramente, o sistema foi todo preenchido com água, garantindo assim, que a amostra estivesse sempre em contato com o meio aquoso. Massas de cerca de 0,5g de pó, contendo as micropartículas obtidas por diferentes processos, foram pesadas e adicionadas no cilindro destinado à colocação da amostra, sendo distribuída homogênea. Com a absorção da água pela amostra, através da placa sinterizada, o sistema retirou água do recipiente depositado

sobre a balança, para equilibrar a pressão hidrostática do sistema. Com isso, obteve-se uma medida gravimétrica indireta da água absorvida pela amostra.

A sala onde foi realizado o experimento foi mantida com desumificador, para se manter uma umidade relativa de 60% no ambiente. O aparelho foi acondicionado dentro de uma cuba vedada que continha recipientes com soluções saturadas de NaBr, para manter o ambiente com umidade relativa próxima a 58%, reduzindo, assim, a perda de água para o ambiente. Um controle foi efetuado nas mesmas condições experimentais, onde o aparelho foi mantido sem amostra, com a finalidade de se determinar a perda de água para o ambiente. O valor obtido foi subtraído dos valores encontrados nos experimentos realizados.

A razão do aumento de peso da amostra em função do tempo foi calculada pelo peso inicial da amostra, mais o peso da água absorvida (P), dividido pelo peso inicial da amostra (P_0). Os experimentos foram realizados em duplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a preparação de micropartículas (10-800 μm) de alginato de cálcio foi utilizada a técnica de atomização, por ser esta uma técnica amplamente difundida e de fácil aplicação tecnológica. Essas partículas de tamanhos menores são mais fáceis de serem dispersas, pulverizadas, podem ser ingeridas pelas larvas de insetos e apresentam uma grande área superficial, facilitando, assim, o contato com o ambiente onde o material encapsulado deve atuar.

Foram estudadas algumas variáveis durante o processo de preparação que poderiam afetar significativamente as características das micropartículas.

No início, utilizamos os polímeros caseína (Cas), HPMC e HEC e, depois, optamos pelo alginato (ALG) e alginato-quitosana (ALG-QUI), por se adequarem melhor aos nossos objetivos.

4.1 OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS UTILIZANDO O PROCESSO DE *SPRAY DRYING*

Filmes preparados, usando-se uma mistura de várias macromoléculas naturais, como polissacarídeos e proteínas, têm apresentado funcionalidades cooperativas previsíveis (KESTER & FENNEMA, 1986). Os polissacarídeos podem fornecer uma estrutura coesa e servir como uma matriz estrutural. Com as proteínas, pode-se obter uma estrutura bem atada por entrelaçamentos inter ou intramoleculares. As glicoproteínas, presentes nas estruturas celulares, são um exemplo de um sistema natural, formado por dois tipos de macromoléculas. Além disso, misturas poliméricas de componentes naturais, que são amplamente disponíveis no mercado, estão sendo avaliadas por

vários autores com o objetivo de se obter uma microencapsulação efetiva (RÉ, 1998).

Por isso, no início deste trabalho, foi estudada a obtenção de micropartículas com duas misturas poliméricas aquosas: CasHEC e CasHPMC, depois de processadas em um *spray drier* (item 3.2) que, em uma segunda etapa, poderiam conter microrganismos bioinseticidas microencapsulados.

Desde meados de 1970, o estudo da técnica de *spray drying*, para produção de sistemas microparticulados para liberação controlada de fármacos, tem ganho bastante importância (TAKENAKA et al., 1980; BODMEIER & CHEN, 1988; DUNCAN et al., 1996; KRITMUNDSDÓTTIR et al., 1996).

Materiais sensíveis ao calor, como enzimas e microrganismos, têm sido secos e também microencapsulados com a utilização do *spray drying* (BROADHEAD et al., 1994 e AMIET-CHARPENTIER et al., 1998). Na maioria dos processos de secagem por *spray drier*, o tempo total de contato entre as partículas e o ar quente é menor que 20 a 30 seg (ELIZONDO & LABUZA, 1974). Assim, materiais biologicamente ativos, como agentes microbianos com atividade bioinseticida, podem ser secos por *spray drying*, sem grandes perdas de suas atividades biológicas.

A temperatura de do ar na saída do *spray drier* é considerada o fator mais importante na atividade residual de materiais sensíveis ao calor, como os microrganismos (BROADHEAD et al., 1994), assim como no rendimento obtido. Essa temperatura não pode ser controlada diretamente, mas, sim, pela temperatura do ar na entrada e a vazão de alimentação. Estudos mostram que, quando a temperatura de saída for de 60°C, o número de células vivas no final do processo diminui 100 vezes e que, a cada aumento de 10°C, até 80°C, acarretaria uma diminuição de mais 100 vezes na viabilidade, a cada 10°C aumentado (ELIZONDO & LABUZA, 1974 e STRUMILLO & ADAMIEC, 1991).

A temperatura mínima de entrada do ar conseguida foi de 85°C. Portanto foi realizado um estudo variando esta temperatura de 85, 100 e 105°C, juntamente com as vazões de alimentação, para verificarmos os valores da

temperatura de saída obtidas, assim como a porcentagem de massa recuperada. A tabela 2 mostra os resultados .

Tabela 2 – Estudo do efeito da temperatura no rendimento do *spray drier*.

Mistura polimérica	Temperatura de entrada(°C)	Temperatura de saída(°C)	Vazão de alimentação (ml/min)	Rendimento (%)
CasHEC	85	63	2,0	3,3
	100	69	8,0	1,3
	105	76	2,5	4,5
CasHPMC	85	63	2,0	5,1
	100	69	8,0	2,4
	105	76	2,5	10,5

Os experimentos foram realizados em duplicatas

Pode-se observar, nesta Tabela 2, que os maiores rendimentos conseguidos, com as duas misturas poliméricas estudadas, foram com uma temperatura de entrada do ar de 105°C e uma vazão de alimentação de 2,5 ml/min. Nessas condições, a temperatura de saída resultante foi de 76°C. Além disso, pode-se notar que, com a mistura CasHEC, os rendimentos obtidos são menores, comparados aos rendimentos obtidos com a mistura CasHPMC. Isto pode ser explicado pela maior viscosidade da primeira mistura, que acarretou muitos entupimentos e mudanças na distribuição das gotas atomizadas na câmara de secagem, devido aos desvios nos jatos, causados pela solidificação dos polímeros no bico de atomização.

Para proteção da atividade de materiais sensíveis durante o processo de *spray drying*, existem vários estudos com adição de adjuvantes ou aditivos nas soluções com proteínas ou dispersões de microorganismos no início do processo. Entre estes pode-se mencionar : sílica, trealose, manitol, maltose, sacarose, lactose e arginina (BROADHEAD et al., 1994; DAIGLE & COTTY, 1995; SALEK & ARNOLD, 1995; DUNCAN et al., 1996). Por ser a lactose um adjuvante bastante utilizado e ter um baixo custo, ele foi adicionado nas misturas poliméricas para se verificar a variação do rendimento obtido (Tabela 3).

A adição de tensoativos nas soluções ou dispersões que alimentam o *spray drier* resulta em mudanças nas características das micropartículas obtidas, como maior uniformidade no tamanho e na morfologia (MANNING et al., 1989 e MAA et al., 1997). Por esta razão, estudou-se a influência no rendimento com a adição do Tween 80, um tensoativo não tóxico, nas dispersões poliméricas, antes do início do processo de *spray drying*. Os resultados obtidos estão na Tabela 3. Pode-se observar, por esta Tabela 3, que a adição de Tween 80 ou lactose na mistura de CasHEC diminuiu, sensivelmente, os rendimentos obtidos, enquanto que a adição desses aditivos na mistura de CasHPMC resultou em um aumento nesse rendimento . Isto se deve, provavelmente, ao aumento da viscosidade da solução de CasHEC, causando entupimento do bico atomizador e desvios no jato pulverizado.

Tabela 3 – Efeito no rendimento do *spray drier* com incorporação de aditivo.

Mistura polimérica	Aditivo	Rendimento (%)
CasHEC	—	4,5
	Tween 80	0,6
	Lactose	1,7
CasHPMC	—	10,5
	Tween 80	6,6
	Lactose	6,7

Os experimentos foram realizados em duplicatas. O Tween 80 foi adicionado na concentração de 0,5% e a lactose de 10% (p/V). As temperaturas de entrada e saída foram de 105 e 76°C respectivamente. A vazão foi de 2,5 ml/min.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS OBTIDAS PELO PROCESSO DE *SPRAY DRYING*

A morfologia das micropartículas obtidas pelo *spray drying* pode ser observada na Figura 10. Nota-se através desta Figura, uma grande semelhança no formato das micropartículas obtidas com CasHPMC (Fig. 10a) e com CasHEC (Fig. 10d), com um formato tendendo ao esférico, uma superfície lisa, aparentemente sem rachaduras, mas com presença de depressões. Essas depressões se formam, provavelmente, pelo encolhimento das gotas, durante os primeiros estágios do processo de secagem (RÊ, 1998).

Figura 10 – Fotomicrografias de MEV das micropartículas obtidas pelo processo de *spray drying* utilizando as misturas poliméricas de CashPMC: a) sem aditivo; b) com 0,5% de Tween 80; c) com 10% de lactose e de CasHEC: d) sem aditivo; e) com 0,5% de Tween 80; f) com 10% de lactose. O aumento foi de 2000x.

O diâmetro médio da distribuição volumétrica de tamanho destas micropartículas foi de 17,3 μm para a mistura CasHEC e de 15,3 μm para a de CasHPMC (Tabela 4).

Tabela 4 – Resultados da distribuição de tamanho das partículas obtidas no *spray drying*

Mistura polimérica	Aditivo	Diâmetro médio(μm)	Amplitude de tamanho
CasHEC	-----	17,3	2,15
	Lactose	31,9	2,70
CasHPMC	-----	15,3	3,78
	Lactose	18,8	1,96
	Tween 80	19,0	2,37

Os experimentos foram realizados em duplicatas. O Tween 80 foi adicionado na concentração de 0,5% e a lactose de 10% (p/V). As temperaturas de entrada e saída foram de 105 e 76°C respectivamente. A vazão foi de 2,5 ml/min.

Essa pequena diferença nos diâmetros médios destas micropartículas, obtidas das duas misturas poliméricas, sem aditivo, não pode ser considerada. Por outro lado, pode-se observar nesta Tabela 4, que as micropartículas resultantes, da mistura polimérica CasHPMC, apresentaram uma amplitude de variação de tamanho 78% maior que a mistura CasHEC, indicando uma menor uniformidade das micropartículas de CasHPMC.

A adição de Tween 80 parece melhorar a uniformidade das micropartículas, obtidas com CasHPMC, com a diminuição da amplitude de tamanho de 3,78 para 2,37 (Tabela 4), enquanto que a morfologia não apresentou alterações com a adição desse tensoativo (Figura 10a, 10b).

A adição da lactose aumentou em quase 50% a uniformidade no tamanho das micropartículas, formadas com a mistura CasHPMC, mas causou rugosidade na superfície, provavelmente pela alta concentração de sólidos na dispersão inicial, causando uma secagem mais rápida e heterogênea (Fig. 10c).

Quando a lactose foi adicionado à mistura CasHEC, observou-se maior tendência à aglomeração, com uma partícula fortemente aderida a outra, causando um aumento do diâmetro médio (Tabela 4 e Figura 10f). Isto pode ter sido devido ao aumento da viscosidade da mistura CasHEC, com a adição de 10% de lactose.

4.3 OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS SECAS DE ALGINATO DE CÁLCIO

É de importância fundamental a escolha dos polímeros encapsulantes, que serão utilizados para englobar um material bioinseticida (ou microrganismos entomopatogênicos), para que a sua proteção durante o armazenamento e no campo, seja efetiva. Para que isso aconteça, as micropartículas contendo os microrganismos entomopatogênicos, devem ser facilmente dispersíveis em água e manterem-se íntegras, não se dissolvendo, para garantir a manutenção da atividade desses microrganismos até o momento de serem ingeridos pelas pragas alvo, onde devem ser liberados.

As micropartículas que foram estudadas nos itens anteriores, feitas com as misturas poliméricas Caseína-HPMC e Caseína-HEC, utilizando a técnica de *spray drying*, são facilmente solubilizadas em água (Figura 11a) limitando, assim, a proteção do material encapsulado ao seu armazenamento.

de citrato de sódio 0,05M estéril, sob agitação, por 15 horas. Depois disso, essa dispersão foi diluída e o plaqueamento foi realizado, conforme descrito acima. O número de esporos por ml foi multiplicado por 100 e dividido pela massa do pó que tinha sido dissolvido para se obter a quantidade de esporos por g de formulado.

3.8 BIOENSAIO CONTRA LAGARTA DO CARTUCHO DO MILHO, *SPODOPTERA FRUGIPERDA*.

As lagartas utilizadas nos bioensaios foram criadas e fornecidas pelo laboratório de Entomologia do CENARGEN-EMBRAPA. A escolha da lagarta *S.frugiperda* foi determinada pela sua maior resistência ao **Btk** do que a lagarta *Anticarsia gemmatilis*.

O microrganismo entomopatogênico avaliado foi o **Btk**, antes e depois de ter sido formulado. As suas suspensões de 1ml de esporos-cristais foram adicionadas em um tubo de ensaio, contendo 9ml água destilada estéril, resultando em uma suspensão-mãe de 100.000 ppm. Com esta solução, procedeu-se às diluições seriadas que variaram de 10^{-1} a 10^{-8} , realizadas em fluxo laminar. Quando as amostras testadas foram os formulados de **Btk**, adicionou-se 10mg das micropartículas obtidas em tubo de ensaio, contendo 10ml de água destilada estéril, obtendo-se uma solução-mãe desses formulados de 1000 ppm. Após completa homogeneização em agitador tipo *vortex*, foram obtidas diluições decimais de 10^{-1} a 10^{-6} com esta suspensão.

Para realização dos bioensaios foi preparada e esterilizada uma dieta artificial para *S.frugiperda*, sem conservante (farinha de feijão, 45,64g; levedo de cerveja, 13,76; germe de trigo, 22g; agar, 5,52 e água, 500ml) que, depois de pronta, foi vertida, ainda quente, nos poços de placas de Elisa, em capela de fluxo laminar. Depois de ter esfriado, 35µl de cada diluição seriada, feita com as amostras a serem testadas, foram espalhados em cima de cada poço. Após secagem da superfície da dieta, foi adicionada uma lagarta de 3º estágio de *S.frugiperda* em cada poço que foi fechado com uma tampa de acrílico. Doze

indivíduos foram testados para cada diluição e foi realizado um controle com dieta, sem esporo cristal. Os bioensaios foram mantidos em sala, com temperatura de aproximadamente 26°C. Após 48 horas, a dieta foi trocada por dieta normal, contendo conservante, porém sem a bactéria. A leitura da mortalidade foi realizada de dois em dois dias, até o sexto dia.

3.9 BIOENSAIO CONTRA LAGARTA DA SOJA, *ANTICARSIA GEMMATALIS*.

As lagartas utilizadas para estes bioensaios foram criadas e fornecidas pelo Laboratório de Entomologia da CNPMA-EMBRAPA.

O microorganismo avaliado foi o **Bv** e para a realização dos bioensaios, foram adicionado 3µl, contendo um número determinado de poliedros em cima de discos de dieta solidificada. Depois da superfície ter secado, foi colocada uma lagarta de *A.gemmatalis* de 3º estágio em cada disco, sendo, depois, tampado. Após 48 horas, a dieta foi trocada por dieta normal, sem o vírus. A leitura da mortalidade foi realizada diariamente até a emergência do adulto. Tecidos de larvas mortas foram examinados ao microscópio para se verificar se a morte foi causada pelo vírus estudado. Foi realizado um controle sem vírus por batelada de bioensaios e 30 indivíduos foram testados para cada amostra.

3.10 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MICROPARTÍCULAS

3.10.1 Microscopia óptica

As fotomicrografias ópticas foram obtidas com um microscópio óptico modelo Eclipse E 400POL, munido de uma câmara fotográfica NIKON, em aumentos de 200, 400 e 1000 vezes.

A coloração do **Btk** foi realizada em lâminas, contendo a amostra fixada. A coloração com o amido black (corante amido Black-MERCK, 1,5g;

metanol 98%, 50ml; água destilada, 40ml; ácido acético, 10ml) foi realizada por 1min e, depois de lavada, foi adicionada uma solução de fucsina por mais 1 min (Sol.I: Fucsina básica-MERCK, 1,0g; metanol 95%, 10ml. Sol.II: fenol, 5,0ml; água destilada, 90ml; as soluções I e II foram misturadas e utilizadas a 30% em solução aquosa).

Também foram feitas colorações do **Btk** com verde malaquita a 6%, em solução aquosa, à quente, por 10 min. Depois de lavadas, foi adicionada uma solução de fucsina por 30 seg.

Depois de coradas, as lâminas eram lavadas e secas para observação no microscópio óptico com aumento de 1000x.

3.10.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia e a estrutura da superfície das micropartículas secas foram observadas através da técnica de microscopia eletrônica de varredura, depois de espalhadas sobre uma fita adesiva de cobre e recobertas com uma fina camada de ouro, utilizando Íon Sputter, JFC-1100. Logo em seguida, foram transferidas para um suporte de alumínio e examinadas em um microscópio JEOL JSM-5200, com uma voltagem de 15 ou 20 KV. As fotomicrografias, mostrando uma visão geral das micropartículas, foram obtidas com aumento de 150x, as que mostram aglomerados, com aumento de 1500 e 2000x e as que mostram a estrutura da superfície, com aumento de 10.000x.

3.10.3 Determinação do teor de cálcio

Uma massa de cerca de 150mg das micropartículas resultantes dos processos estudados foi dissolvida e digerida com 10ml de ácido nítrico concentrado, sob fervura lenta, até secagem de quase todo o volume. Depois de frio, o volume restante foi transferido para um balão de 50ml, diluído com 10ml de ácido nítrico 1% e água deionizada. O conteúdo de cálcio foi determinado por espectrometria de plasma ICP e expresso em porcentagem. As análises foram realizadas em triplicata.

3.10.4 Análise Granulométrica

3.10.4.1 Análise de micropartículas obtidas por *spray drying*

Um analisador de difração a laser MALVERN SB.08 (Malvern Instruments) foi utilizado para medir a distribuição do tamanho das partículas dos pós obtidos por *spray drying*. Alguns miligramas do pó foram suspensos em 150 ml de vaselina líquidos. As suspensões foram submetidas ao ultra-som por 5 minutos, antes de serem adicionadas a uma célula simples com agitação. A distância focal foi de 45 ou 100 nm. O diâmetro do volume médio é o diâmetro de 50% da distribuição de volume, ou seja, D[4,3].

3.10.4.2 Análise de micropartículas obtidas por atomização e gelificação

A distribuição do tamanho das micropartículas por atomização e gelificação foi determinada por difração de raio laser, utilizando analisador MASTERSIZER 2000 (Malvern Instruments). As partículas foram dispersas em água deionizada com vigorosa agitação. O tamanho médio das partículas foi expresso pela média da distribuição de volume (D[4,3]).

3.10.5 Porosidade

Para determinação do volume total de poros, assim como da distribuição do volume entre meso e macroporos medindo de 0,005 μm (50 Å) a 470 μm , utilizou-se um instrumento marca Micromeritics, modelo Autopore III, que opera a pressões de até 4000 bar, com mercúrio.

Uma determinada quantidade de amostra, entre 100 a 150mg, foi pesada e adicionada em uma cela nº 14, que foi vedada e fechada antes de ser introduzida no aparelho. A primeira etapa da análise consistia na obtenção de vácuo dentro da cela e preenchimento com mercúrio. Depois disso, a cela era submetida a pressões crescentes, previamente programadas, as quais resultavam no volume correspondente de uma faixa de tamanho de poros da amostra analisada.

3.10.6 Análise Térmica

As curvas termogravimétricas TG das diferentes micropartículas obtidas por atomização e gelificação foram obtidas com instrumento da SHIMADZU TGA-50. As amostras pesando entre 2 a 6mg eram colocadas em cadinhos de platina. A taxa de aquecimento empregada foi de 10°C/min e a atmosfera de nitrogênio. A faixa de temperatura estudada foi de 25 a 800°C.

3.10.7 Determinação da umidade

A porcentagem de umidade residual das micropartículas, obtidas pelos vários processos estudados, foi determinada, utilizando-se uma estufa à vácuo, com temperatura de 55°C, por 12 horas. As amostras foram pesadas, antes de serem colocadas na estufa (peso inicial) e depois do tratamento térmico descrito (peso final). Com a diferença entre o peso inicial e o final, calculou-se a porcentagem de umidade das micropartículas dos pós analisados.

3.10.8 Determinação da densidade aparente ou de empacotamento

Essa análise foi realizada com o instrumento da AUTOTAP-QUANTACHROME CORPORATION, baseando-se na metodologia descrita em ASTM D 4164-88. Ela consistiu na pesagem de determinada massa de pó, em uma proveta de 10ml. Em seguida, essa proveta foi submetida a 1000 *taps* e o volume resultante foi anotado. O resultado expressa a relação da massa do pó e do volume resultante, depois das micropartículas terem sido compactadas durante os *tappings*, até volume constante.

3.10.9 Determinação da quantidade de água absorvida pelas micropartículas

A razão do aumento de peso dos pós, em função da quantidade de água absorvida foi determinada, em tempos pré-estabelecidos, utilizando-se a aparelhagem descrita por VAN KAMP et al. (1986) e esquematizada na Figura 9.

Figura 9 – Esquema do aparelho utilizado para os estudos do perfil de absorção de água. (1) cilindro para colocação da amostra 2) placa sinterizada sobre a qual é colocada a amostra 3) reservatório de água 4) e 5) válvulas utilizadas para encher o sistema de água antes do início do experimento 6) Becker 7) recipiente de medida com água 8) balança eletrônica → trajeto de deslocamento da água

O funcionamento do aparelho é baseado no princípio de sifonamento. Primeiramente, o sistema foi todo preenchido com água, garantindo assim, que a amostra estivesse sempre em contato com o meio aquoso. Massas de cerca de 0,5g de pó, contendo as micropartículas obtidas por diferentes processos, foram pesadas e adicionadas no cilindro destinado à colocação da amostra, sendo distribuída homogênea. Com a absorção da água pela amostra, através da placa sinterizada, o sistema retirou água do recipiente depositado

sobre a balança, para equilibrar a pressão hidrostática do sistema. Com isso, obteve-se uma medida gravimétrica indireta da água absorvida pela amostra.

A sala onde foi realizado o experimento foi mantida com desumificador, para se manter uma umidade relativa de 60% no ambiente. O aparelho foi acondicionado dentro de uma cuba vedada que continha recipientes com soluções saturadas de NaBr, para manter o ambiente com umidade relativa próxima a 58%, reduzindo, assim, a perda de água para o ambiente. Um controle foi efetuado nas mesmas condições experimentais, onde o aparelho foi mantido sem amostra, com a finalidade de se determinar a perda de água para o ambiente. O valor obtido foi subtraído dos valores encontrados nos experimentos realizados.

A razão do aumento de peso da amostra em função do tempo foi calculada pelo peso inicial da amostra, mais o peso da água absorvida (P), dividido pelo peso inicial da amostra (P_0). Os experimentos foram realizados em duplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a preparação de micropartículas (10-800 μm) de alginato de cálcio foi utilizada a técnica de atomização, por ser esta uma técnica amplamente difundida e de fácil aplicação tecnológica. Essas partículas de tamanhos menores são mais fáceis de serem dispersas, pulverizadas, podem ser ingeridas pelas larvas de insetos e apresentam uma grande área superficial, facilitando, assim, o contato com o ambiente onde o material encapsulado deve atuar.

Foram estudadas algumas variáveis durante o processo de preparação que poderiam afetar significativamente as características das micropartículas.

No início, utilizamos os polímeros caseína (Cas), HPMC e HEC e, depois, optamos pelo alginato (ALG) e alginato-quitosana (ALG-QUI), por se adequarem melhor aos nossos objetivos.

4.1 OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS UTILIZANDO O PROCESSO DE *SPRAY DRYING*

Filmes preparados, usando-se uma mistura de várias macromoléculas naturais, como polissacarídeos e proteínas, têm apresentado funcionalidades cooperativas previsíveis (KESTER & FENNEMA, 1986). Os polissacarídeos podem fornecer uma estrutura coesa e servir como uma matriz estrutural. Com as proteínas, pode-se obter uma estrutura bem atada por entrelaçamentos inter ou intramoleculares. As glicoproteínas, presentes nas estruturas celulares, são um exemplo de um sistema natural, formado por dois tipos de macromoléculas. Além disso, misturas poliméricas de componentes naturais, que são amplamente disponíveis no mercado, estão sendo avaliadas por

vários autores com o objetivo de se obter uma microencapsulação efetiva (RÉ, 1998).

Por isso, no início deste trabalho, foi estudada a obtenção de micropartículas com duas misturas poliméricas aquosas: CasHEC e CasHPMC, depois de processadas em um *spray drier* (item 3.2) que, em uma segunda etapa, poderiam conter microrganismos bioinseticidas microencapsulados.

Desde meados de 1970, o estudo da técnica de *spray drying*, para produção de sistemas microparticulados para liberação controlada de fármacos, tem ganho bastante importância (TAKENAKA et al., 1980; BODMEIER & CHEN, 1988; DUNCAN et al., 1996; KRITMUNDSDÓTTIR et al., 1996).

Materiais sensíveis ao calor, como enzimas e microrganismos, têm sido secos e também microencapsulados com a utilização do *spray drying* (BROADHEAD et al., 1994 e AMIET-CHARPENTIER et al., 1998). Na maioria dos processos de secagem por *spray drier*, o tempo total de contato entre as partículas e o ar quente é menor que 20 a 30 seg (ELIZONDO & LABUZA, 1974). Assim, materiais biologicamente ativos, como agentes microbianos com atividade bioinseticida, podem ser secos por *spray drying*, sem grandes perdas de suas atividades biológicas.

A temperatura de do ar na saída do *spray drier* é considerada o fator mais importante na atividade residual de materiais sensíveis ao calor, como os microrganismos (BROADHEAD et al., 1994), assim como no rendimento obtido. Essa temperatura não pode ser controlada diretamente, mas, sim, pela temperatura do ar na entrada e a vazão de alimentação. Estudos mostram que, quando a temperatura de saída for de 60°C, o número de células vivas no final do processo diminui 100 vezes e que, a cada aumento de 10°C, até 80°C, acarretaria uma diminuição de mais 100 vezes na viabilidade, a cada 10°C aumentado (ELIZONDO & LABUZA, 1974 e STRUMILLO & ADAMIEC, 1991).

A temperatura mínima de entrada do ar conseguida foi de 85°C. Portanto foi realizado um estudo variando esta temperatura de 85, 100 e 105°C, juntamente com as vazões de alimentação, para verificarmos os valores da

temperatura de saída obtidas, assim como a porcentagem de massa recuperada. A tabela 2 mostra os resultados .

Tabela 2 – Estudo do efeito da temperatura no rendimento do *spray drier*.

Mistura polimérica	Temperatura de entrada(°C)	Temperatura de saída(°C)	Vazão de alimentação (ml/min)	Rendimento (%)
CasHEC	85	63	2,0	3,3
	100	69	8,0	1,3
	105	76	2,5	4,5
CasHPMC	85	63	2,0	5,1
	100	69	8,0	2,4
	105	76	2,5	10,5

Os experimentos foram realizados em duplicatas

Pode-se observar, nesta Tabela 2, que os maiores rendimentos conseguidos, com as duas misturas poliméricas estudadas, foram com uma temperatura de entrada do ar de 105°C e uma vazão de alimentação de 2,5 ml/min. Nessas condições, a temperatura de saída resultante foi de 76°C. Além disso, pode-se notar que, com a mistura CasHEC, os rendimentos obtidos são menores, comparados aos rendimentos obtidos com a mistura CasHPMC. Isto pode ser explicado pela maior viscosidade da primeira mistura, que acarretou muitos entupimentos e mudanças na distribuição das gotas atomizadas na câmara de secagem, devido aos desvios nos jatos, causados pela solidificação dos polímeros no bico de atomização.

Para proteção da atividade de materiais sensíveis durante o processo de *spray drying*, existem vários estudos com adição de adjuvantes ou aditivos nas soluções com proteínas ou dispersões de microorganismos no início do processo. Entre estes pode-se mencionar : sílica, trealose, manitol, maltose, sacarose, lactose e arginina (BROADHEAD et al., 1994; DAIGLE & COTTY, 1995; SALEK & ARNOLD, 1995; DUNCAN et al., 1996). Por ser a lactose um adjuvante bastante utilizado e ter um baixo custo, ele foi adicionado nas misturas poliméricas para se verificar a variação do rendimento obtido (Tabela 3).

A adição de tensoativos nas soluções ou dispersões que alimentam o *spray drier* resulta em mudanças nas características das micropartículas obtidas, como maior uniformidade no tamanho e na morfologia (MANNING et al., 1989 e MAA et al., 1997). Por esta razão, estudou-se a influência no rendimento com a adição do Tween 80, um tensoativo não tóxico, nas dispersões poliméricas, antes do início do processo de *spray drying*. Os resultados obtidos estão na Tabela 3. Pode-se observar, por esta Tabela 3, que a adição de Tween 80 ou lactose na mistura de CasHEC diminuiu, sensivelmente, os rendimentos obtidos, enquanto que a adição desses aditivos na mistura de CasHPMC resultou em um aumento nesse rendimento . Isto se deve, provavelmente, ao aumento da viscosidade da solução de CasHEC, causando entupimento do bico atomizador e desvios no jato pulverizado.

Tabela 3 – Efeito no rendimento do *spray drier* com incorporação de aditivo.

Mistura polimérica	Aditivo	Rendimento (%)
CasHEC	—	4,5
	Tween 80	0,6
	Lactose	1,7
CasHPMC	—	10,5
	Tween 80	6,6
	Lactose	6,7

Os experimentos foram realizados em duplicatas. O Tween 80 foi adicionado na concentração de 0,5% e a lactose de 10% (p/V). As temperaturas de entrada e saída foram de 105 e 76°C respectivamente. A vazão foi de 2,5 ml/min.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS OBTIDAS PELO PROCESSO DE *SPRAY DRYING*

A morfologia das micropartículas obtidas pelo *spray drying* pode ser observada na Figura 10. Nota-se através desta Figura, uma grande semelhança no formato das micropartículas obtidas com CasHPMC (Fig. 10a) e com CasHEC (Fig. 10d), com um formato tendendo ao esférico, uma superfície lisa, aparentemente sem rachaduras, mas com presença de depressões. Essas depressões se formam, provavelmente, pelo encolhimento das gotas, durante os primeiros estágios do processo de secagem (RÊ, 1998).

Figura 10 – Fotomicrografias de MEV das micropartículas obtidas pelo processo de *spray drying* utilizando as misturas poliméricas de CashPMC: a) sem aditivo; b) com 0,5% de Tween 80; c) com 10% de lactose e de CasHEC: d) sem aditivo; e) com 0,5% de Tween 80; f) com 10% de lactose. O aumento foi de 2000x.

O diâmetro médio da distribuição volumétrica de tamanho destas micropartículas foi de 17,3 μm para a mistura CasHEC e de 15,3 μm para a de CasHPMC (Tabela 4).

Tabela 4 – Resultados da distribuição de tamanho das partículas obtidas no *spray drying*

Mistura polimérica	Aditivo	Diâmetro médio(μm)	Amplitude de tamanho
CasHEC	-----	17,3	2,15
	Lactose	31,9	2,70
CasHPMC	-----	15,3	3,78
	Lactose	18,8	1,96
	Tween 80	19,0	2,37

Os experimentos foram realizados em duplicatas. O Tween 80 foi adicionado na concentração de 0,5% e a lactose de 10% (p/V). As temperaturas de entrada e saída foram de 105 e 76°C respectivamente. A vazão foi de 2,5 ml/min.

Essa pequena diferença nos diâmetros médios destas micropartículas, obtidas das duas misturas poliméricas, sem aditivo, não pode ser considerada. Por outro lado, pode-se observar nesta Tabela 4, que as micropartículas resultantes, da mistura polimérica CasHPMC, apresentaram uma amplitude de variação de tamanho 78% maior que a mistura CasHEC, indicando uma menor uniformidade das micropartículas de CasHPMC.

A adição de Tween 80 parece melhorar a uniformidade das micropartículas, obtidas com CasHPMC, com a diminuição da amplitude de tamanho de 3,78 para 2,37 (Tabela 4), enquanto que a morfologia não apresentou alterações com a adição desse tensoativo (Figura 10a, 10b).

A adição da lactose aumentou em quase 50% a uniformidade no tamanho das micropartículas, formadas com a mistura CasHPMC, mas causou rugosidade na superfície, provavelmente pela alta concentração de sólidos na dispersão inicial, causando uma secagem mais rápida e heterogênea (Fig. 10c).

Quando a lactose foi adicionado à mistura CasHEC, observou-se maior tendência à aglomeração, com uma partícula fortemente aderida a outra, causando um aumento do diâmetro médio (Tabela 4 e Figura 10f). Isto pode ter sido devido ao aumento da viscosidade da mistura CasHEC, com a adição de 10% de lactose.

4.3 OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS SECAS DE ALGINATO DE CÁLCIO

É de importância fundamental a escolha dos polímeros encapsulantes, que serão utilizados para englobar um material bioinseticida (ou microrganismos entomopatogênicos), para que a sua proteção durante o armazenamento e no campo, seja efetiva. Para que isso aconteça, as micropartículas contendo os microrganismos entomopatogênicos, devem ser facilmente dispersíveis em água e manterem-se íntegras, não se dissolvendo, para garantir a manutenção da atividade desses microrganismos até o momento de serem ingeridos pelas pragas alvo, onde devem ser liberados.

As micropartículas que foram estudadas nos itens anteriores, feitas com as misturas poliméricas Caseína-HPMC e Caseína-HEC, utilizando a técnica de *spray drying*, são facilmente solubilizadas em água (Figura 11a) limitando, assim, a proteção do material encapsulado ao seu armazenamento.

a)

b)

c)

Figura 11 – Fotomicrografias óptica de partículas de (a) Caseína-HEC, 1:1; (b) e (c) alginato de cálcio secas dispersas em água. (a) e b) momentos depois da dispersão ter sido feita (c) depois de 6 horas em água . O aumento foi de 400x.

Levando esse fato em consideração e dando continuidade ao estudo de técnicas e escolha de polímeros encapsulantes, decidiu-se pelo estudo de obtenção de micropartículas, utilizando o alginato de cálcio como polímero encapsulante. Testes preliminares indicaram que partículas feitas com alginato gelificado com o cálcio, depois de secas, mantinham-se integras quando dispersas em água, como mostrado nas Figuras 11b e 11c.

Técnicas utilizando o gotejamento produzem gotas de alginato de cálcio com diâmetros de 0,5 – 3,5 mm. Várias técnicas que possam ser facilmente adaptadas para escalas de grande produção têm sido desenvolvidas para produção de partículas pequenas de alginato, entre 10 a 500µm (WILLAERT & BARON, 1996). Quando as partículas são da ordem de micrômetros (10–500 µm), consegue-se uma suspensão homogênea em água, com agitações moderadas. Isso poderia minimizar o *stress* para células encapsuladas nestas micropartículas (KLEIN & KRESSDORF, 1989) e tornaria possível a pulverização de suspensões aquosas no campo, com os equipamentos disponíveis atualmente.

A técnica de atomização, que utiliza um fluxo de ar comprimido concêntrico na matriz de extrusão, pode resultar em gotículas menores de 100µm. Um dos problemas críticos na obtenção de partículas dessa ordem de grandeza é a aglomeração por pontes líquidas, quando a partícula está úmida (PIETSCH, 1991).

Um dos problemas encontrados nesse trabalho foi a recuperação das micropartículas de alginato de cálcio, após a atomização em uma solução de CaCl_2 0,1M. Antes da etapa de filtração, estas micropartículas se encontravam bem dispersas na solução de gelificação, mas depois da filtração e lavagem com água, para a retirada do meio de reação, obtinham-se grandes aglomerados. Depois da secagem, havia a formação de placas devido à coalescência das micropartículas gelificadas, como mostrado nas fotomicrografias na Figura 12 e pelo esquema da Figura 13, que representa uma explicação esquemática das forças exercidas em partículas esféricas durante o processo de evaporação e secagem.

Figura 12 – Fotomicrografias de MEV de micropartículas de alginato de cálcio obtidas depois de filtradas, lavadas com água e secas à temperatura ambiente sendo a) e b) o mesmo aglomerado em aumentos de 150x e 2000x respectivamente.

Figura 13 – Coalescência de partículas lavadas com água durante a secagem (WHEATLEY & STEUERNAGEL, 1997).

Nesta Figura 13, as microesferas de polímero gelificado estão próximas umas das outras e forças de capilaridade exercidas entre elas fazem com que elas coalesçam (WHEATLEY & STEVERNAGEL, 1997).

Diversas tentativas foram feitas no sentido de solucionar este problema de aglomeração, adicionando-se 0,5% de Tween 80 ou SDS (sódio dodecil sulfato) na água de lavagem, assim como 10% de PEG 400 ou 50% de etanol, não obtendo-se sucesso com estas alternativas. Então outro procedimento foi investigado: o alginato de sódio foi atomizado em uma solução de CaCl_2 0,1M com quitosana 0,5%, dissolvida em tampão acetato de sódio 0,1 M, com a finalidade de verificar se a membrana formada na superfície da partícula, pela interação ALG-QUI, impediria a coalescência das micropartículas, durante o processo de secagem. Os resultados mostraram que grandes aglomerados continuavam sendo formados apesar das micropartículas terem mantido seus formatos originais de uma maneira mais homogênea.

Outra alternativa para evitar a aglomeração das partículas gelificadas, consistiu de uma lavagem destas partículas com água, seguida de lavagem com etanol 50% e uma lavagem final com etanol 99%. O álcool desidrata as partículas gelificadas e evapora rapidamente durante a secagem, eliminando as pontes líquidas entre elas, que exerciam as forças responsáveis pela coalescência.

A literatura também menciona o uso do etanol como agente desidratante de partículas de alginato de cálcio (MOE et al., 1991 e SKJÅK-BRÆK et al., 1989). Outros autores utilizaram outros solventes orgânicos como acetona ou álcool isopropílico, no entanto estes solventes são mais tóxicos, em comparação com o etanol, capazes de desestruturar células vivas e proteínas encapsuladas nestas partículas.

4.4 ESTUDO DE DIFERENTES PROCEDIMENTOS E VARIÁVEIS DE PROCESSO NA OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO

Inúmeras variáveis nas diversas etapas do processo de preparação de micropartículas podem afetar significativamente as características do produto obtido.

No item 3.3 apresentado anteriormente, a Tabela 1 identifica e descreve de maneira resumida as etapas e condições de cada processo realizado neste trabalho. Com base naquela Tabela, as variáveis estudadas durante a formação das micropartículas de alginato foram basicamente:

- Concentração de Ca^{++} durante a primeira etapa
- O número de etapas envolvidas
- O meio de dissolução da quitosana
- A presença de Ca^{2+} e Na^+ na complexação de ALG-QUI

A influência destas variáveis de processo nas características das micropartículas sólidas resultantes pode ser avaliada mediante caracterizações físico-químicas e morfológicas destas partículas.

Os rendimentos dos processos utilizando-se os diferentes procedimentos descritos nessa Tabela 1, variaram entre 70 e 95%. No entanto, nos processos 2QUIHCl e 2QUITacNa, onde o recobrimento de micropartículas de alginato de cálcio com quitosana foi feito na ausência de Ca^{++} , o rendimento caiu para 50%. Isso foi devido à realização de uma etapa suplementar de lavagem com as micropartículas de alginato gelificado previamente, para a eliminação do íon Ca^{++} , antes da adição da solução de quitosana.

Utilizando-se a microscopia óptica, procurou-se mostrar algumas diferenças observadas durante a realização destes processos descritos na Tabela 1. Assim, pode-se observar na Figura 14a, que gotículas gelificadas de alginato de cálcio ficavam bem dispersas depois da atomização da solução de alginato de sódio na solução de CaCl_2 . Estas gotículas apresentavam, de modo geral,

tamanhos menores que 100 μ m. Pode-se notar também que a dispersão destas gotículas gelificadas se mantinha depois destas partículas terem sido adicionadas a uma solução de quitosana para a formação da membrana ALG-QUI no processo 2QUIHCl + CaCl₂ e 2QUITacNa + CaCl₂ (Fig.14b e Tabela 1).

Por outro lado, observou-se que quando a membrana de quitosana era formada ao mesmo tempo em que a gelificação do alginato pelo íon cálcio, como nos processos 1QUIHCl + CaCl₂ e 1QUITacNa + CaCl₂ (Tabela 1), as partículas formavam pequenos aglomerados na superfície da solução (Fig.14c). Isto deve ter sido causado pelo aumento da viscosidade da solução de CaCl₂ com a dissolução de 0,5% de quitosana, causando um agrupamento das gotículas durante a gelificação pelo cálcio e complexação com a quitosana. FERNANDEZ-HERVÁS et al. (1998) notaram que partículas de alginato preparadas em uma solução com 0,2 e 0,3% de quitosana, na presença de CaCl₂, mostravam uma tendência para formar aglomerados. GÅSERØD et al. (1999) também observaram que se formava uma quantidade maior de aglomerados quando o tamanho das gotículas atomizadas era reduzido e com o aumento da concentração e do peso molecular da quitosana.

A Figura 14d mostra que, na primeira etapa do processo 1QUIHCl 2QUIHCl+CaCl₂ (Tabela 1), houve a formação de grandes gotas irregulares de alginato de sódio após a atomização em uma solução de 0,5% de quitosana, na ausência de CaCl₂. Isto provavelmente foi o resultado da aglomeração de pequenas gotículas formadas na atomização. A cápsula formada pela membrana de ALG-QUI envolveu um centro líquido de alginato de sódio formado pela coalescência de várias gotículas. Quando, na segunda etapa, foi adicionada uma solução de CaCl₂ na dispersão destas cápsulas, ocorreu a gelificação do alginato de sódio no interior da partícula, provocando um encolhimento e a formação de dobraduras em toda a cápsula de ALG-QUI formada anteriormente (fig.14e).

Estes comportamentos observados durante a formação das micropartículas se refletirão nas suas características depois de secas, resultando em diferentes morfologias, tamanhos e densidades aparente, como será mostrado posteriormente.

Figura 14 – Fotomicrografias obtidas por microscopia óptica das partículas de alginato atomizadas em diferentes soluções; ALGNa: alginato de sódio; QUI: solução de quitosana, pH 5,0. As fotos a), b), c) aumento de 400x; d), e) aumento de 200x.

4.5 ANÁLISE DO TEOR DE CÁLCIO CONTIDO NAS MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO

A Tabela 5 apresenta a porcentagem de cálcio contida nas micropartículas obtida por diferentes procedimentos experimentais descritos na Tabela 1 e no item 3.3.

Tabela 5 – Porcentagem de cálcio contido em micropartículas de alginato obtidas por diferentes processos.

PROCESSOS	TEORES DE CÁLCIO	
	% Ca $\pm$ D.P.	% de redução de Ca ^(*)
1 CaCl ₂ 0,1M	7,94 $\pm$ 0,06	0
1 CaCl ₂ 0,05M	7,82 $\pm$ 0,04	0
1 CaCl ₂ 0,1M Tac Na	7,86 $\pm$ 0,04	0
PROCEDIMENTO I		
1 QUITacNa + CaCl ₂	4,59 $\pm$ 0,01	42
1 QUIHCl + CaCl ₂	4,88 $\pm$ 0,06	38
2 QUIHCl + CaCl ₂	5,55 $\pm$ 0,03	29
2 QUIHCl	6,83 $\pm$ 0,12	14
2 QUITacNa + CaCl ₂	5,49 $\pm$ 0,00	30
2 QUITacNa	4,59 $\pm$ 0,10	42
PROCEDIMENTO II		
1 QUIHCl 2 QUIHCl + CaCl ₂	6,96 $\pm$ 0,04	11

As análises foram feitas em triplicatas, sendo apresentados os valores médios obtidos com os respectivos desvios padrões (D.P.). (*): esta porcentagem de redução foi calculada estipulando-se que a maior quantidade de cálcio das partículas estudadas foi de 7,9%.

Com os resultados apresentados na Tabela 5 pode-se observar que as micropartículas resultantes de processos onde acontece somente a reticulação e gelificação do alginato com íons de cálcio: 1CaCl₂ 0,1M; 1CaCl₂ 0,05M e 1CaCl₂ 0,1M TacNa, a porcentagem de cálcio observada é cerca de 7,9%. Pode-se concluir com isto que o aumento da concentração de CaCl₂ de 0,05M para 0,1M na solução reticulante do alginato não influenciou os valores de porcentagem de cálcio nas micropartículas resultantes, indicando que nestas condições, a concentração de 0,05M de CaCl₂ seria suficiente para preencher os sítios de reticulação do alginato atomizado. Pode-se notar, também, que a presença do tampão acetato de sódio (TacNa) 0,1M na solução reticulante de CaCl₂ não alterou a porcentagem de cálcio contido nas micropartículas obtidas. Isto é um indicativo de que a reação de reticulação do Ca²⁺ com os grupos carboxílicos ionizados do ácido gulurônicos do alginato não foi influenciada pela presença do Na⁺ na relação 1 : 0,7 (Ca:Na).

KING (1983) afirmou que a produção de alginato de cálcio insolúvel acontece quando o conteúdo de cálcio atinge 7,2% em relação ao peso do alginato. YOTSUYANAGI et al. (1987) mostraram que a quantidade de cálcio necessária para formar partículas de alginato de cálcio estáveis em água foi de 6,4%. KIM & LEE, (1992) observaram que a porcentagem máxima de Ca²⁺ em gotas de alginato de cálcio secas foi de 7,6%, depois de 10 minutos em solução de CaCl₂ 0,1M. Estes resultados sugerem que estas pequenas diferenças nas porcentagens de cálcio encontradas nas micropartículas de alginato de cálcio apresentadas na Tabela 5, em relação aos valores encontrados nos trabalhos citados da literatura, podem ser atribuídas por diferenças na origem do alginato utilizado, assim como diferenças no processo de obtenção.

Os resultados da Tabela 5 mostram que, para as micropartículas de alginato de cálcio-quitosana obtidas pelos procedimentos I e II, onde ocorre o recobrimento do alginato com quitosana, a porcentagem de cálcio observada foi sempre menor em relação as partículas obtidas em solução de CaCl₂, na ausência de quitosana. Este fato está provavelmente associado à variação de quitosana ligada ao alginato nestas partículas. Como a porcentagem de cálcio é de uma

fração mássica de um componente das partículas em relação à massa total destas partículas, a fração de Ca^{++} diminui à medida que a fração de quitosana aumenta.

Esta explicação pode ser sustentada por resultados de estudos realizados por GÅSERØD et al. (1998, 1999) que demonstraram que a quantidade de quitosana complexada com o alginato depende de vários fatores dentre eles, do processo de produção das partículas de alginato de cálcio-quitosana:

- quando as partículas são obtidas pelo procedimento II onde, na primeira etapa, alginato de sódio é introduzido em soluções de quitosana (1 QUIHCl 2QUIHCl+ CaCl_2), a quantidade de quitosana complexada ao alginato é pequena. Isto, segundo estes autores, se deve provavelmente à membrana alginato-quitosana criada na superfície das gotas de alginato de sódio, cujos poros passam a controlar e limitar a difusão de quitosana em direção ao centro das gotas. Assim sendo, a diluição do teor de cálcio pela quitosana complexada ao alginato seria pequena, ou seja, de cerca de 11%, como mostrado na Tabela 5
- quando o processo de produção consiste na reação de alginato de sódio com quitosana, na presença de CaCl_2 (1 QUIHCl+ CaCl_2 ou 1 QUITacNa+ CaCl_2), uma quantidade maior de quitosana complexou com o alginato, na superfície e no interior das partículas. Segundo GÅSERØD et al. (1998), este procedimento resulta em uma complexação de quitosana 100 vezes maior que pelo procedimento II, que envolve a formação de uma membrana alginato-quitosana e posterior formação de alginato de cálcio, com a difusão de íons Ca^{++} através desta membrana. Os dados apresentados na Tabela 5 demonstram que o efeito da diluição na porcentagem de cálcio nas micropartículas que reagiram com quitosana na presença de CaCl_2 , em uma etapa, foi cerca de 40%, bem maior que nas micropartículas resultantes do procedimento II, com uma redução de somente 11%. Este fato estaria confirmando a presença de uma maior quantidade de quitosana nas partículas

resultantes dos processos 1 QUIHCl+CaCl₂ e 1 QUITacNa+CaCl₂ em relação às partículas resultantes do processo 1 QUIHCl 2QUIHCl+CaCl₂.

- quando o processo de produção da membrana alginato-quitosana foi realizado em uma segunda etapa, com o recobrimento de partículas de alginato de cálcio, obtidas em uma primeira etapa, em uma solução de quitosana, na presença de cálcio (2 QUIHCl+CaCl₂ ou 2 QUITacNa+CaCl₂), a quantidade de quitosana complexada nas partículas resultantes foi maior que nas partículas obtidas pelo procedimento II (1 QUIHCl 2QUIHCl+CaCl₂) e menor que nas partículas onde o recobrimento com quitosana foi feito em uma etapa, na presença de CaCl₂ (1 QUIHCl+CaCl₂ ou 1 QUITacNa+CaCl₂). Neste caso intermediário, a redução da porcentagem de cálcio destas partículas também foi intermediária, ou seja, cerca de 30% (2QUIHCl+CaCl₂ ou 2QUITacNa+CaCl₂).
- quando o recobrimento de partículas de alginato de cálcio, obtidas em uma primeira etapa, foi realizado em uma segunda etapa, com uma solução de quitosana, sem a presença do íon Ca⁺⁺ e com uma lavagem prévia da superfície no final da primeira etapa, para eliminar o excesso de cálcio, a quantidade de quitosana detectada por GÅSERØD et al. (1998) nestas partículas foi pequena, mas foi maior em relação às partículas obtidas pelo procedimento II. Pela Tabela 5 pode ser observado que, em processo idêntico a este, 2 QUIHCl, com o recobrimento de quitosana feito em uma segunda etapa, na ausência de cálcio, a redução no teor de Ca⁺⁺ foi de 14%, sendo maior que das partículas do procedimento II (11%) e menor que das partículas resultantes dos processos de recobrimento, realizados na presença de Ca⁺⁺ (cerca de 30 e 40%). MURATA et al. (1993b) também observaram a influência do cálcio na solução de quitosana, durante o recobrimento de partículas de alginato de cálcio contendo *Brilliant Blue*. A liberação deste corante foi bem mais lenta em partículas recobertas na presença de cálcio, indicando a

presença de poros menores com uma diferença na conformação da matriz do gel.

Segundo GÅSERØD et al. (1998 e 1999), a fração de quitosana ligada ao alginato depende da facilidade de sua difusão no interior do gel formado e é favorecida por um baixo peso molecular da quitosana e pela presença de íons Ca^{++} na solução de quitosana. De acordo com seus resultados experimentais, a presença de CaCl_2 na solução de quitosana influencia a quantidade deste polímero presente nas partículas formadas ($\mu\text{m}/\text{mm}^2$).

A idéia de que a interação entre íons Ca^{++} e alginato levam a um gel de estrutura porosa, que permite uma melhor difusão da quitosana para o interior deste gel, foi investigada por GÅSERØD et al. (1998), através de experimentos onde eles avaliaram o efeito dos íons Ca^{++} na velocidade de liberação do corante *blue dextran*, usado como modelo, do interior de partículas de alginato de cálcio, depois de dispersas em soluções com concentrações diferentes de CaCl_2 . Os autores verificaram que a velocidade de liberação do *blue dextran* era significativamente maior para as maiores concentrações de íons Ca^{++} no meio, o que eles atribuíram a uma maior porosidade das partículas gelificadas de alginato na presença deste íon.

Em resumo, com base nos dados apresentados por GÅSERØD et al. (1998, 1998), conclui-se que a variação do teor de cálcio nas formulações apresentadas na Tabela 5, deve-se à variação inversamente proporcional da quantidade de quitosana complexada ao alginato nestas partículas. Reforçando esta conclusão, foi ainda observado por outros autores (TAKKA & ACARTÜK, 1999) um menor teor de cálcio em partículas formadas, a partir da introdução de alginato de sódio em uma solução de quitosana e CaCl_2 , quando comparado ao teor de cálcio em partículas de alginato de cálcio.

Entretanto, considerando os resultados de outros estudos, também pode-se levantar a hipótese de que a diminuição do teor de cálcio, observada em partículas de alginato de cálcio-quitosana, mostrada na Tabela 5, possa ter ocorrido, não só pelo efeito de diluição provocado pela quitosana

complexada com o alginato, mas também por um deslocamento de íons cálcio pela quitosana, polímero carregado positivamente. Existem trabalhos na literatura que verificaram que quanto maior a quantidade de propranololHCl, um fármaco carregado positivamente, que permanecia ligado a partículas de alginato depois da sua gelificação em solução de cloreto de cálcio, menor foi o teor de cálcio encontrado nestas partículas, indicando que o propranolol e o Ca^{2+} compartilham sítios de ligação comuns na cadeia de alginato (LIM & WAN, 1997). FUNDUEANU et al.(1998) verificaram um aumento do intumescimento de micropartículas de alginato de cálcio, na presença de uma substância tetra amidina, fármaco carregado positivamente, podendo ser esta, uma evidência que o fármaco provocou um deslocamento do íon cálcio quando formou um complexo eletrostático com o alginato.

A Tabela 5 também mostra que micropartículas recobertas, na segunda etapa, com a quitosana dissolvida em TacNa e na ausência do cálcio, apresentaram uma redução na porcentagem de cálcio de 42%. Isto poderia estar indicando que o deslocamento do Ca^{2+} nestas condições, estaria sendo feito, não somente pela quitosana, mas também pelo Na^+ , na medida em que o Ca^{2+} está ausente durante a complexação de quitosana e alginato.

A suscetibilidade de géis de alginato de cálcio por íon sódio é bastante conhecida na literatura (SMDSRØD & SKJÅK-BRÆK, 1990 e MURATA et al., 1993a). McLOUGLIN (1994) afirmou que o Na^+ desloca o Ca^{2+} do sítio de reticulação, em soluções onde a relação $\text{Ca} : \text{Na}$ não apresente um valor mínimo. Como o Na^+ é incapaz de realizar a reticulação do alginato, o gel resultante fica cheio de “buracos”. A presença destes “buracos” poderia explicar o intumescimento observado das micropartículas obtidas durante a etapa de filtração e lavagem.

Pode-se concluir com a discussão desta Tabela 5, que a porcentagem de Ca^{2+} nas micropartículas de alginato de cálcio com quitosana apresentaram valores diferentes que dependem de vários fatores, como do número de etapas do processo de recobrimento utilizado e da presença do Ca^{2+} durante a reação de complexação entre alginato e quitosana.

4.6 ANÁLISE DA MORFOLOGIA DAS MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO E ALGINATO-QUITOSANA

As Figuras 15 e 16 apresentam uma visão geral de lotes representativos de cada tipo de processo estudado. Pode ser observada a presença de micropartículas formadas por pequenos (20-50 μ m), médios (50-100 μ m) e grandes aglomerados (100-600 μ m). Os maiores aglomerados estão presentes nos processos 1QUITacNa+CaCl₂ e 1QUIHCl+CaCl₂ (Fig.15), confirmando o que foi observado durante a formação destas partículas, logo após a atomização (item 4.4 e Fig.14c).

Os processos que apresentaram aglomerados esféricos de menor tamanho e em menor quantidade foram aqueles no qual as partículas eram gelificadas com CaCl₂ sem quitosana (fig.15: 1CaCl₂ 0,1M e 1CaCl₂ 0,1M TacNa) e também no processo onde as partículas de alginato de cálcio, formadas previamente, foram recobertas com quitosana dissolvida em HCl, na ausência de CaCl₂ (fig.16: 2QUIHCl).

No processo 2QUIHCl foi onde se obteve micropartículas mais homogêneas e de menor tamanho (Fig.16 e Fig. 17: 2 QUIHCl). O pó obtido com estas micropartículas foi o mais fino e de maior fluidez.

A Figura 17 mostra a morfologia de alguns aglomerados. Pode-se observar que a superfície é rugosa e bastante irregular, com grandes cavidades, provavelmente devido à secagem do gel de alginato de cálcio, mesmo com o recobrimento feito com a quitosana. O mesmo fenômeno foi observado por CHANDY et al. (1998) em partículas de alginato de cálcio e por OKHAMAFE et al. (1996) com partículas de alginato de cálcio recobertas com quitosana. Em geral, em-se verificado que a secagem destes géis diminui em cerca de até 2/3 o tamanho original da partícula gelificada.

1 CaCl_2 0,1 M

1 CaCl_2 0,1M TacNa

1 QUI TacNa + CaCl_2

1 QUI HCl + CaCl_2

Figura 15 – Fotomicrografias de MEV mostrando uma visão geral das micropartículas obtidas em processos de uma etapa, com um aumento de 150x. Os detalhes de cada processo estão descritos na Tabela 1 e no item 3.3

2 QUIHCl + CaCl₂ 2 QUI TacNa + CaCl₂

2 QUIHCl

2 QUI TacNa

1 QUIHCl 2 QUIHCl + CaCl₂

Figura 16 – Fotomicrografias de MEV mostrando uma visão geral das micropartículas obtidas em processos de duas etapas, com aumento de 150x. Os detalhes de cada processo estão descritos na Tabela 1 e no item 3.3.

1 CaCl_2 0,1 M 2 QUIHCl + CaCl_2

2 QUIHCl

2 QUIHCl

Figura 17 – Fotomicrografias de MEV mostrando o tamanho e aparência de alguns aglomerados com aumento de 1500x. Os detalhes de cada processo estão descritos na Tabela 1 e no item 3.3.

Através da Figura 17 nota-se também que os aglomerados do processo 2QUITacNa apresentam micropartículas menos definidas, provavelmente por terem sofrido um processo de dissolução e coalescência, quando as micropartículas de alginato de cálcio, formadas em uma primeira etapa, foram lavadas e adicionadas a uma solução de quitosana, preparada com tampão acetato sódio (70 mM de Na^+) sem a presença de Ca^{2+} . Alguns íons monovalentes como sódio, têm a capacidade de deslocar o Ca^{2+} do alginato, solubilizando esse polímero, intumescendo a partícula, diminuindo sua resistência mecânica e facilitando a sua deformação (McLOUGHLIN, 1994 e SMIDSRØD & SKJÅK-3RÆK, 1990). Nas discussões e conclusões feitas sobre o teor de cálcio presente nas micropartículas, obtidas por este processo (item 4.5), foi observado que o abaixamento da porcentagem de cálcio em 41%, não foi somente causado pela complexação da quitosana com o alginato mas também devido ao deslocamento do Ca^{2+} pelos íons Na^+ que estavam presentes na solução de recobrimento com quitosana (item 2.2.3.1 e Figura 2).

Nas Figuras 18 e 19 é apresentado um estudo da estrutura da superfície das micropartículas de alginato, obtidas por diferentes processos. A Figura 19 mostra a superfície de partículas secas formadas somente por alginato de cálcio (1CaCl₂ 0,1M). Observa-se que ela tem uma estrutura homogeneamente ondulada, com cavidades e ranhuras, onde se pode observar poros menores que 1,5µm. Quando esta superfície é formada com a presença de quitosana, pelos processos descritos no procedimento I (Tabela 1), nota-se um significativo aumento no número de poros menores que 0,1µm, assim como um aumento da rugosidade nestas superfícies (Fig.18 1QUIHCl+CaCl₂; 1QUITacNa+CaCl₂; 2QUITacNa e Fig. 19 2QUITacNa+CaCl₂; 2QUIHCl+CaCl₂ e 2QUIHCl).

HARI, et al. (1996a e b) e SEZER & AKBÜGA (1999) também observaram, por MEV, uma superfície rugosa e porosa quando o alginato de sódio foi recoberto com quitosana.

1CaCl₂ 0,1 M 1QUIHCl + CaCl₂ 1QUITacNa + CaCl₂

2QUITacNa

Figura 18 – Fotomicrografias de MEV mostrando a superfície de micropartículas de alginato obtidas por diversos processos e com aumento de 10.000x. Os detalhes de cada processo estão descritos na Tabela 1 e no item 3.3.

2QUITacNa + CaCl₂ 2QUIHCl + CaCl₂

2QUIHCl

1QUIHCl 2QUIHCl + CaCl₂

Figura 19 – Fotomicrografias de MEV mostrando a superfície de micropartículas de alginato obtidas por processos feitos em duas etapas e com aumento de 10.000x. Os detalhes de cada processo estão descritos na Tabela 1 e no item 3.3.

Entretanto pode ser notado que os tipos de poros observados na Figura 18 processos 1QUITacNa+CaCl₂ e 2QUITacNa, não são cilíndricos como parecem ser os das outras superfícies. No processo 1QUITacNa+CaCl₂ isto pode significar que a presença do Na⁺ também afetou a estrutura da superfície composta por alginato de cálcio e alginato–quitosana, mesmo na presença de CaCl₂. Mas no processo 2QUITacNa, onde a formação da membrana ALG – QUI ocorreu na ausência de Ca²⁺ e na presença de Na⁺, o tamanho dos poros, assim como a quantidade deles, são bem maiores, provocando um intumescimento das micropartículas durante o processo e depois, ao serem reidratadas (descrito mais adiante).

Uma outra característica importante de ser observada é a estrutura da superfície de micropartículas recobertas por quitosana dissolvida em HCl, na segunda etapa e na ausência de CaCl₂ (Fig.19 2QUIHCl). Ela parece ser mais compacta, rugosa, com sulcos mais acentuados e com maior número de pequenos poros (< 0,1µm). LIU et al. (1997) também observaram uma estrutura semelhante em micropartículas de alginato de sódio recobertas com quitosana dissolvida em HCl, mas concluíram que esta estrutura porosa foi consequência da liofilização. Coincidentemente, com este processo, foi obtido o pó com menor tamanho de partículas. O tamanho reduzido de partículas talvez possa ser explicado por esta diferença na estrutura da superfície, responsável por uma adesão mais fraca entre as partículas.

Para finalizar os comentários sobre as características morfológicas das micropartículas de alginato, é importante observar a superfície das partículas obtidas pelo processo 1QUIHCl 2QUIHCl + CaCl₂ (Fig. 19), feitas pelo procedimento II. Esta superfície é caracterizada por uma morfologia bastante diferente das demais partículas. De fato, o processo de formação desta partícula começou com a complexação do alginato com a quitosana na superfície das gotículas de alginato de sódio atomizadas portanto, bastante diferente dos outros processos apresentados no procedimento I. Uma superfície similar também foi observada na figura 14e, no item 4.4, durante a formação destas partículas.

4.7 ANÁLISE GRANULOMÉTRICA DAS MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO

A tabela 6 mostra os resultados das análises granulométricas feitas com as micropartículas obtidas pelos procedimentos descritos no item 3.3, na tabela 1. Observa-se que os diâmetros médios apresentaram uma variação dependendo do processo utilizado.

Como a etapa de atomização foi idêntica para todos os processos utilizados, as diferenças observadas podem ter sido devido à aglomeração ocorrida nas etapas finais de separação dos produtos. Esta aglomeração apresenta variações dependendo do processo utilizado.

O processo 2QUIHCl resultou em micropartículas com o menor diâmetro médio ($D[4,3]$), sendo o seu valor de 60 μm . Este resultado também foi observado nas fotomicrografias de MEV, mostradas nas Figuras 16 e 17 e confirmado com observações visuais desta amostra. Por outro lado, o processo 2QUITacNa resultou em micropartículas com diâmetro médio de 553 μm , sendo este, o maior valor observado. Isto pode ser explicado pela presença do Na^+ e ausência do Ca^{++} na etapa de recobrimento das micropartículas de alginato de cálcio com a quitosana, o que causou a formação de aglomerados maiores (Fig. 17 2QUITacNa) devido à dissolução parcial do alginato de cálcio durante esta etapa.

Tabela 6 - Resultados das análises granulométricas de micropartículas obtidas por diferentes processos.

AMOSTRA	DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA (*)		
	D[4,3]	d(0,1)	d(0,9)
1 CaCl ₂ 0,1M	290	42	711
PROCEDIMENTO I			
1 QUI TacNa+CaCl ₂	428	99	908
1 QUI HCl+CaCl ₂	410	102	810
2 QUI HCl+CaCl ₂	116	17	322
2 QUI TacNa+CaCl ₂	240	60	495
2 QUI HCl	60	23	150
2 QUI TacNa	553	177	1057
PROCEDIMENTO II			
1 QUI HCl 2 QUI HCl+CaCl ₂	191	67	348

(*) Os valores dos diâmetros dados em micra (μm) e o meio de dispersão utilizado foi a água com exceção da amostra 2QUI TacNa onde se utilizou o álcool. As descrições detalhadas dos processos utilizados na obtenção das partículas analisadas estão no item 3.3.e na tabela 1.

Os resultados apresentados na Tabela 6 mostra que, o sistema de dissolução da quitosana, TacNa ou HCl, utilizado no procedimento I feito em uma etapa e na presença de Ca^{2+} (1QUI TacNa+ CaCl_2 e 1QUIHCl+ CaCl_2), não resultou em partículas com diâmetro médio muito diferente, ou seja, 428 e 410 μm , respectivamente. Estes valores indicam a presença de grandes aglomerados observados durante a sua formação no item 4.4 e Fig.14c.

Baseando-se nas recomendações de BEEGLE et al.,(1991), as partículas de bioinseticidas que forem pulverizadas como os inseticidas químicos, utilizando os mesmos equipamentos, não deveriam apresentar diâmetros maiores que 300 μm para evitar problemas de entupimento dos bicos pulverizadores, ao mesmo tempo em que se pretende garantir uma distribuição homogênea do produto nas plantações depois destes produtos serem pulverizados. Sendo assim, as micropartículas obtidas pelo procedimento I, em duas etapas, com a quitosana dissolvida em HCl (2QUIHCl e 2QUIHCl+ CaCl_2) são as que mais se adequarão para este fim. A Figura 21b mostra a curva de distribuição de tamanho das micropartículas obtidas por estes dois processos. A única diferença entre estes processos reside na presença ou não do CaCl_2 na segunda etapa do procedimento. A presença causou a formação de um maior número de aglomerados maiores que 100 μm .

A Figura 20b mostra como o recobrimento de partículas de alginato de cálcio (1 CaCl_2 0,1M) com quitosana pelo processo 2QUIHCl resultou em partículas com uma distribuição de tamanho mais homogênea, representada por uma curva normal de distribuição. Esta Figura 20b mostra também que partículas sem a membrana ALG-QUI, apresentam uma distribuição de tamanho bimodal.

Figura 20 - Curva de distribuição de tamanho de micropartículas de alginato. A identificação e descrição dos processos na obtenção das partículas analisadas estão no item 3.3 e na tabela 1.

4.8 ESTUDO DA POROSIDADE DAS MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO

Nas fotomicrografias do MEV, no item 4.6, foi observada a presença de poros a partir do que, se pretendeu analisar a distribuição do volume destes poros, nas micropartículas obtidas pelos diferentes processos estudados. Para isto foi utilizado o microporosímetro de mercúrio descrito no item 3.10.5. A Figura 22 mostra os resultados obtidos.

Os poros são classificados em três grupos, segundo o *International Committe for Characterization and Terminology of Carbon-IUPAC* (ALDEIA, 1999): macroporos $> 0,05\mu\text{m}$; mesoporos entre $0,05$ e $0,002\mu\text{m}$ e microporos $< 0,002\mu\text{m}$.

A primeira evidência que pode-se observar nesta figura 21a é que o maior volume de poros encontra-se na faixa de 5 a $470\mu\text{m}$. Esta faixa, teoricamente, refere-se a macroporos, mas o volume de poros até $40\mu\text{m}$, seria o volume dos interstícios inter-partículas, ou seja, uma leitura indireta da aglomeração resultante de cada processo estudado. Assim pode-se concluir que a amostra resultante do processo 2QUIHCl foi a que resultou em aglomerados menores, confirmando os resultados encontrados por microscopia eletrônica de varredura (Fig.16 e 17). Por outro lado, a maior quantidade de aglomerados foi encontrada nos seguintes processos, em ordem decrescente: 1QUIHCl+CaCl₂, 1QUITacNa+CaCl₂, 2QUITacNa, 1QUIHCl 2QUIHCl+CaCl₂ e 2QUITacNa+CaCl₂.

Os resultados encontrados nesta Figura 22a mostram também, que o volume de poros $< 1,0\mu\text{m}$ é muito pequeno em relação ao volume total de poros, fato que poderia mascarar a medida de poros menores que $1,0\mu\text{m}$. A figura 22b mostra a distribuição do pequeno volume encontrado na faixa de $1,0$ a $0,002\mu\text{m}$. Pode ser observado que não existe diferença considerável entre as diferentes amostras. Nota-se também a existência de mesoporos ($< 0,005\mu\text{m}$), mas que esta metodologia não tem sensibilidade para medi-los.

a)

b)

Figura 21 – Distribuição do volume de macro e mesoporos de micropartículas obtidas por diferentes processos. (a) distribuição de poros total, (b) distribuição de poros $\leq 1,0\mu\text{m}$, ou seja, mesoporos. A descrição de cada processo está no item 3.3 e na tabela 1.

4.9 ESTUDO DAS MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO POR ANÁLISE TÉRMICA

Com o objetivo de obter-se informação da evidência da complexação do alginato com a quitosana, assim como da quantidade de quitosana complexada em cada processo estudado, foi feito curvas termogravimétricas com as micropartículas obtidas por diversos processos.

Observando as curvas termogravimétricas da Figura 22, pode-se notar que os polissacarídeos alginato de sódio e quitosana utilizados para obtenção das micropartículas estudadas possuem perfis semelhantes, mas com estabilidade térmica diferente. Enquanto o alginato inicia a sua decomposição em torno de 210°C, a quitosana começa a sua decomposição em torno de 260°C.

O início da decomposição térmica das micropartículas analisadas nesta Figura 22 coincide com a do alginato de sódio, mas o processo de termodecomposição é mais lento e não permite a caracterização das amostras por esta técnica.

Figura 22 - Perfis das curvas termogravimétricas (TG) feito com micropartículas obtidas por diferentes processos, conforme descrito na Tabela 1: (azul) alginato de sódio, (preto) quitosana, (azul pontilhado) 1CaCl₂ 0,1M, (vermelho) 1CaCl₂ 0,1M TacNa, (rosa) 1QUITacNa+CaCl₂, (verde) 1QUIHCl+CaCl₂, (preto pontilhado) 2QUITacNa+CaCl₂, (turquesa) 2QUIHCl+CaCl₂, (vermelho pontilhado) 2QUITacNa, (verde pontilhado) 2QUIHCl, (rosa pontilhado) 1QUIHCl 2QUIHCl+CaCl₂.

4.10 DETERMINAÇÃO DA UMIDADE DE PÓS DE ALGINATO OBTIDOS POR DIFERENTES PROCESSOS

A Tabela 7 mostra a porcentagem de umidade encontrada nos produtos dos vários processos estudados. Pode-se observar que a umidade encontrada manteve-se na faixa de 6,5 a 11% para todas as amostras analisadas.

ØSTBERG & GRAFFNER (1992) verificaram que a porcentagem de umidade de partículas de alginato de sódio variava conforme o método de secagem. Quando secas a temperatura ambiente, a porcentagem de umidade encontrada foi de 8,3%, a 45°C de 5,4% e de 1,6%, se utilizado processo de liofilização.

DIGAT (1993) observou que um dos pontos-chaves para se manter a viabilidade de um microrganismo é deixá-lo em ambiente com umidade residual entre 8 a 10%. KUTS & TUTOVA (1983-84) estudando a secagem de materiais contendo microrganismos, demonstrou que a viabilidade é preservada quando a umidade final é mantida em torno de 5 a 10%.

A Organização Mundial de Saúde, na Conferência de abril de 1999 recomendou que o conteúdo de água de bioinseticidas contendo bactérias que matam larvas não deveria ser maior que 10% para evitar a degradação prematura do produto (WHO, 1999).

Assim sendo, pode-se concluir que a porcentagem de umidade observada nas micropartículas obtidas por este trabalho, encontra-se em uma boa faixa para a preservação da atividade dos microrganismos encapsulados, assim como para atender as especificações da Organização Mundial de Saúde.

4.11 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE APARENTE DAS MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO

Os resultados da densidade aparente estão resumidos na tabela

7.

Tabela 7 – Umidade e densidade aparente de pós contendo alginato de cálcio obtidos por diferentes processos.

Processos	Umidade (%)	Densidade aparente (g/ml)
1 CaCl_2 0,1M	9,48	0,50
PROCEDIMENTO I		
1 CaCl_2 0,1M TacNa	9,41	0,52
1 QUITacNa + CaCl_2	10,87	0,31
1 QUIHCl + CaCl_2	8,16	0,22
2 QUIHCl + CaCl_2	6,39	0,48
2 QUIHCl	10,74	0,65
2 QUITacNa + CaCl_2	8,51	0,48
2 QUITacNa	8,24	0,45
PROCEDIMENTO II		
1 QUIHCl 2 QUIHCl + CaCl_2	9,17	0,42

Todas as análises foram realizadas em duplicata. Os processos indicados estão descritos no item 3.3 e na tabela 1.

Nota-se que o processo 2QUIHCl gerou as micropartículas de maior densidade, sendo o mesmo que originou micropartículas com menor tamanho (Tabela 6) e maior homogeneidade (Figura 16). Seu valor foi de 0,65g/ml. Por outro lado, os processos que resultaram em micropartículas com grandes aglomerados, 1QUIHCl+CaCl₂ e 1QUITacNa+CaCl₂ (Fig. 15 e Fig. 21a) foram os que resultaram em pós com menor densidade aparente, ou seja, 0,22 e 0,31g/ml, respectivamente. Estes valores dependem do processo utilizado, mas também de variações operacionais, dentre elas a etapa final de lavagem com etanol.

4.12 ESTUDO DA QUANTIDADE DE ÁGUA ABSORVIDA E DO PROCESSO DE DISSOLUÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO

Utilizando o aparelho e a metodologia descritos no item 3.10.9, mediu-se a quantidade de água absorvida por cinco amostras de pós contendo micropartículas obtidas por diferentes processos. Os resultados estão apresentados na Figura 23.

Pode ser notado através desta Figura, que cinco das seis amostras analisadas: 1CaCl₂ 0,1M; 1QUIHCl+CaCl₂; 2QUIHCl+CaCl₂; 2QUIHCl; 1QUIHCl 2QUI+CaCl₂ absorveram de 3 a 5 vezes o seu peso em água. Esta absorção de água ocorreu praticamente antes da primeira hora do início do experimento, não apresentando grande variação depois disso. Isto poderia estar indicando uma boa afinidade destes pós com a água, fato desejável para obtenção de dispersões homogêneas em água, como o caso de aplicação aqui pretendida. Esta água absorvida provavelmente, ficava entre as micropartículas destes processos, formando pontes líquidas, na medida em que elas não apresentavam alterações na morfologia quando dispersas em água, como mostrado nas Figuras 11b e 12 c e nas Figuras 24 e 25.

Figura 23 – Quantidade de água absorvida em relação ao peso inicial de micropartículas obtidas por diferentes processos. P_0 : peso inicial do pó; P : peso inicial do pó + peso da água absorvida. As descrições dos processos indicados na legenda estão no item 3.3 e na tabela 1.

No entanto a amostra 2QUITacNa aumentou 100 vezes o seu peso quando adicionada em água, alterando sua forma, tamanho e morfologia como mostrado nas Figuras 23 e 26. As cápsulas de alginato-quitosana destas micropartículas foram formadas na presença de Na^+ e na ausência de Ca^{2+} . Nestas condições, os íons Na^+ , sequestrador de Ca^{++} , provocaram uma diminuição do conteúdo de Ca^{2+} nas micropartículas resultantes (item 4.5), uma morfologia de superfície característica (Fig.18: 2QUITacNa) e um grande intumescimento em água, como mostrado na Figura 26. Este intumescimento ocorreu, provavelmente, devido à dissolução parcial do alginato de cálcio causado pelos íons Na^+ , resultando em deformações ou falhas nos sítios de reticulação destas partículas de alginato durante o recobrimento com quitosana (Tabela 1),.

Como o objetivo deste trabalho foi obter micropartículas que não se dissolvessem e não intumecessem em água, as micropartículas resultantes do processo 2QUITacNa não são adequadas para o fim aqui pretendido.

Um método de dissolução destas micropartículas foi também investigado utilizando-se citrato de sódio 0,05M, como indicado na literatura por vários trabalhos (GÅSERØD et al., 1999; QUONG et al., 1999). Micropartículas que sejam formadas somente com alginato de cálcio, depois de meia hora, em agitação nesta solução de citrato foram dissolvidas, aumentando a viscosidade da solução. Entretanto, micropartículas que foram recobertas por uma membrana de alginato-quitosana (ALG-QUI) mantiveram uma membrana bem visível por microscopia óptica, no formato original da partícula, depois da dissolução do alginato de cálcio, indicando a presença da cápsula formada pela complexação entre o alginato e a quitosana, como mostrado nas figuras 24, 25, 26. A presença desta membrana de ALG-QUI depois de 6 horas em uma solução de citrato de sódio pH 8,4, demonstra a estabilidade deste complexo formado.

Figura 24 – Comportamento das partículas obtidas pelo processo $2\text{QUIHCl} + \text{CaCl}_2$ (a;c) e 2QUIHCl (b;d) em água (a;b) e em citrato de sódio 0,05M (c;d), depois de dispersas por 6 horas. O aumento foi de 400x. Os processos estão descritos no item 3.3 e Tabela 1.

Figura 25 – Comportamento das partículas obtidas pelo processo $1\text{QUIHCl} + \text{CaCl}_2$ (a;c) e $1\text{QUIHCl} + 2\text{QUIHCl} + \text{CaCl}_2$ (b;d) em água (a;b) e em citrato de sódio 0,05M (c;d), depois de dispersas por 6 horas. O aumento foi de 400x. Os processos estão descritos no item 3.3 e Tabela 1.

a) **b)**

Figura 26 – Comportamento das partículas obtidas pelo processo 2QUITacNa em água (a) e em citrato de sódio 0,05M (b) depois de dispersas por 6 horas. O aumento foi de 400x. Os processos estão descritos no item 3.3 e Tabela 1.

4.13 INFLUÊNCIA DO PESO MOLECULAR (PM) DA QUITOSANA NAS CARACTERÍSTICAS DAS MICROPARTÍCULAS

McKNIGHT et al. (1988) estudaram partículas de alginato de cálcio recobertas com quitosana de PM diferentes. Eles observaram que soluções de quitosana de alto PM formavam uma membrana ALG-QUI fina e fraca. Quando o PM da quitosana foi reduzido, a membrana formada apresentou grande resistência mecânica e boa flexibilidade. Segundo estes autores isso aconteceu, provavelmente, porque a difusão da quitosana de menor peso molecular ocorre mais facilmente dentro da matriz de gel de alginato do que a quitosana de maior PM.

POLK et al. (1994) estudaram a liberação de albumina de micropartículas de alginato de cálcio e quitosana, utilizando quitosanas de diferentes PM. Eles verificaram que cápsulas formadas por quitosana de alto PM reduziam de maneira mais eficiente a liberação da albumina nas primeiras 4 horas e aumentavam a quantidade liberada depois de 20 horas, devido provavelmente, à formação de uma maior quantidade de poros menores, capazes de controlar melhor a liberação desta substância.

Neste trabalho, estudou-se a influência da quitosana de baixo e médio PM nas características das partículas obtidas. A solução acidificada com HCl de 0,5% da quitosana de PM médio apresentou uma viscosidade sete vezes maior que a mesma solução de quitosana de PM baixo. Este aumento de viscosidade dificultou a etapa de filtração no final da preparação da solução de quitosana, assim como a recuperação das micropartículas no final do processo.

Na medida em que através do processo 2QUIHCl foram obtidas as micropartículas de menores tamanhos, este processo foi empregado para a avaliação da influência do PM da quitosana nas propriedades das micropartículas resultantes.

a)

b)

c)

Figura 27 - Caracterização de micropartículas obtidas com quitosanas de diferentes pesos moleculares. O processo utilizado foi o 2QUIHCl descrito no item 3.3 e na tabela 1; (a) distribuição granulométrica; (b) fotomicrografias de MEV mostrando a superfície de micropartículas com quitosana de baixo e (c) médio peso molecular.

A Figura 27a mostra a variação na curva de distribuição granulométrica de micropartículas obtidas com quitosana de diferentes PM. Observa-se que os perfis das curvas das partículas obtidas com soluções de quitosana de baixo e médio PM são bastante semelhantes.

Na tentativa de diminuir a viscosidade da solução de quitosana de PM médio, novo ensaio foi realizado reduzindo-se a concentração desta quitosana de 0,5 para 0,2%. Verifica-se, neste caso, que o diâmetro médio de micropartículas obtidas com solução de quitosana 0,2% aumentou significativamente, de 97 para 166 μm , e o perfil de distribuição foi bem diferente (Fig. 28a).

As Figuras 27b e 27c mostram a morfologia da superfície de micropartículas obtidas com quitosana de baixo (Fig.27b) e médio (Fig.27c) PM. Pode-se observar que elas apresentam morfologias bastante semelhantes, sendo rugosas e caracterizadas por uma microporosidade bastante acentuada.

4.14 ESTUDO DE MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO CONTENDO LEITE DESNATADO (LD)

Existem vários trabalhos na literatura que estudam o efeito de várias substâncias, na proteção dos microrganismos adicionados ao solo ou encapsulados com alginato durante o processo de secagem, na exposição a irradiações UV ou como fonte de nutriente (CASSIDY et al., 1996).

A adição de LD em formulações contendo bactérias encapsuladas com alginato aumenta o número de bactérias que se mantêm vivas em partículas gelificadas ou secas, tanto à temperatura ambiente como pelo processo de liofilização (BASHAN, 1986; KEARNEY, 1990; FAGES, 1990; TREVORS et al., 1993).

Por ser o LD um produto barato, não tóxico e que pode favorecer a viabilidade de microrganismos, investigou-se também a formação de micropartículas com a adição de LD na solução de alginato de sódio antes da

atomização em CaCl_2 0,1M. O objetivo foi verificar as características das micropartículas obtidas para que, numa etapa posterior, se possa avaliar o efeito e proteger desta substância para os microrganismos utilizados como bioinseticidas (durante a secagem, o armazenamento e depois destes serem introduzidos no meio ambiente).

Tabela 8 - Influência da adição do leite desnatado (LD) na distribuição granulométrica das micropartículas obtidas

FORMULAÇÃO	D[4,3]	d(0,1)	d(0,9)
2% LD	323	105	637
0,5% LD	229	54	539
Sem LD	290	42	711

Os diâmetros são dados em μm . O meio de dispersão utilizado nestas análises foi o álcool. O processo utilizado foi o 1CaCl_2 0,1M sem e com adição de LD na porcentagem indicada (p/V), na solução de alginato de sódio 2% antes do início da atomização.

A Tabela 8 mostra o diâmetro médio de micropartículas contendo diferentes quantidades de LD. Pode ser observado que o aumento de concentração de LD de 0,5% para 2%, resultou em um aumento do diâmetro médio das micropartículas de 229 para 323 μm , respectivamente. O mesmo comportamento também pode ser observado na Figura 28. Enquanto a adição de 0,5% de LD resultou em um grande número de partículas menores que 100 μm (fig.28b), a adição de 2% de LD apresentou poucas partículas menores que este diâmetro (fig.28a). Nas Figuras 28c e 29b, observa-se que as partículas com 2% de LD são menos definidas e apresentam uma superfície mais lisa, indicando que esta quantidade de LD alterou certas características morfológicas das partículas de alginato de cálcio (Fig.29a), como sua rugosidade.

a)

b)

c)

d)

Figura 28 - Fotomicrografias de MEV mostrando uma vista geral (a; b) e de aglomerados (c; d) de micropartículas formadas com alginato de cálcio com 2% (a; c) e 0,5% (b; d) de leite desnatado. O processo utilizado foi 1 CaCl₂ 0,1M (tabela 1 e item 3.3).

a) **b)** **c)**

Figura 29- Fotomicrografias de MEV mostrando a superfície de micropartículas de alginato sem (a) e com adição de 2% (b) e 0,5% de LD (c).O processo utilizado foi 1 CaCl_2 0,1M.

Por outro lado, partículas com 0,5% de LD (fig.28d e 29c) apresentam uma morfologia mais próxima àquela das partículas de alginato de cálcio sem adição do LD (fig.29a).

4.15 ESTUDO DE MICROPARTÍCULAS CONTENDO O BIOINSETICIDA BTK MICROENCAPSULADO

4.15.1 Caracterização do bioinseticida Btk antes de ser microencapsulado

Antes de dar início ao estudo dos processos de microencapsulação foi realizada uma caracterização do **Btk** no caldo fermentado e na suspensão concentrada deste microrganismo, obtida depois da lavagem com salina da massa microbiana do final de fermentação (item 3.4.1).

As figuras 30 e 31 mostram algumas fotomicrografias feitas em microscópio óptico para visualização dos esporos e toxinas produzidos. Para isto, foram empregados 2 tipos de coloração: a primeira foi feita com o corante verde malaquita, que cora especificamente os esporos de verde, mais fucsina, para coloração de células vegetativas de vermelho (Fig. 30); a segunda, com o corante amido black, que cora especificamente as δ -endotoxinas de azul, com adição de fucsina, que cora a parede dos esporos de vermelho (Fig. 31), na ausência de verde malaquita.

Pode ser observado nas Figuras 30a e 31a, feita com o caldo fermentado por 28h, a presença de esporos livres e um grande número de células vegetativas em adiantado estado de esporulação, contendo em seu interior esporos corados de verde (Fig.30a) e toxinas coradas de azul (Fig.31a). Pode-se notar que, apesar de um número razoável de esporos liberados no meio de cultura, as toxinas bipiramidais neste meio são raras (setas Fig.31) e as toxinas cubóides não puderam ser identificadas.

Figura 30 – Fotomicrografias ópticas do caldo fermentado por 28h (a) e da suspensão concentrada de Btk do final da fermentação, depois de 48h (b). A coloração foi feita com verde malaquita e fucsina e o aumento foi de 1000x.

Figura 31 – Fotomicrografias óticas do caldo fermentado por 28h (a) e da suspensão concentrada de Btk do final da fermentação, depois de 48h (b). A coloração foi feita com amido black e fucsina e o aumento foi de 1000x. As setas indicam a presença de δ -endotoxina colorida de azul, de forma bipiramidal.

Nas Figuras 30 e 31, observa-se uma quantidade grande de esporos e poucas toxina bipiramidal (setas Fig. 31). Este resultado foi diferente do esperado na medida em que o número de toxinas bipiramidais deveria ser comparado com o número de esporos como foi observado por WERNECK et al. (2000) nesta mesma cepa de **Btk** e por ARANTES et al., em outra cepa de **Btk**.

Para a confirmação destes resultados tentou-se observar as toxinas com formato cúbico, que esta cepa S93 também possui (Fig.8). Foram feitas observações no MEV e os resultados estão apresentados na Figura 32, onde pode-se ver, entre os esporos, somente cristais cubóides medindo em torno de 0,2µm. Não foi possível a observação da toxina bipiramidal vista em pouca quantidade na coloração com amido black (Fig.31) e em grande quantidade nesta cepa na época do seu isolamento (WERNECK, 1997).

As massas secas do caldo fermentado por 48h e da suspensão concentrada de **Btk** utilizados neste trabalho foram de 0,9 e 6,9% respectivamente.

Figura 32 - Fotomicrografias de MEV da suspensão concentrada de *Btk*. As setas indicam aglomerados de δ -endotoxinas de formato cuboidal e o aumento de 10.000x.

4.15.2 Caracterização dos sistemas multiparticulados obtidos com as formulações do bioinseticida Btk depois de microencapsulado.

Para a realização da microencapsulação deste microorganismo conforme foi descrito no item 3.6, foram escolhidos quatro processos, entre os nove estudados e descritos no item 3.3 e na tabela 1 . A massa de **Btk** utilizada foi de 5% do peso total do formulado.

A Figura 33 mostra as microgotículas de alginato gelificado obtidas depois da atomização em CaCl_2 (Fig 33a; 33b; 33c) e da complexação com quitosana (Fig.33d; 33e). Pode ser observado claramente a eficiência do aprisionamento dos esporos de **Btk** feito pelo alginato gelificado, isolando os microorganismos do meio circundante. A capacidade de retenção do **Btk** durante os processos de microencapsulação foi realizada pela relação da contagem dos esporos no meio de atomização depois de filtração mais a contagem dos esporos nas águas de lavagem com o número de esporos adicionados inicialmente na solução de alginato de sódio, multiplicado por 100. As contagens foram realizadas com uma câmara de Neubauer e os resultados mostraram que 97% dos esporos ficaram incorporados dentro das gotas.

Na Figura 34, pode ser visualizada a morfologia da superfície das micropartículas com os esporos de **Btk** envolvidos e protegidos pelos polímeros estruturais utilizados, formando uma camada ao redor destes. No processo 1 CaCl_2 0,1M, pode-se observar a mesma rugosidade das superfícies das partículas de alginato de cálcio (Fig. 34), rugosidade esta que é atenuada pela adição do LD (Fig. 34 1 CaCl_2 0,1M+0.5%LD).

Ainda nesta Figura 34, verifica-se que processos que utilizaram a quitosana (1QUIHCl+ CaCl_2 e 2QUIHCl) apresentam uma superfície mais rugosa e irregular, típica da complexação ALG-QUI conforme mostrado nas Figuras 18 e 19.

a)

b)

c)

d)

e)

Figura 33- Fotomicrografias ópticas (aumento 400x) de gotículas de alginato de cálcio sem (a) e com **Btk** (b,c,d,e) logo após a atomização. Os processos utilizados foram: 1CaCl₂ 0,1M (a, b); 1CaCl₂ 0,1M+0,5%LD (c); 1QUIHCl+CaCl₂ (d); 2QUIHCl (e). Eles estão descritos no item 3.3 e na tabela 1.

1 CaCl_2 0,1M 1 CaCl_2 0,1M+0,5%LD 1 QUIHCl+ CaCl_2

2 QUIHCl

Figura 34 - Fotomicrografias de MEV de micropartículas contendo 5% (p/p) de **Btk**. A descrição dos processos indicados estão na tabela 1 e item 3.3 e o aumento foi de 10.000x.

A Figura 35 mostra as variações na distribuição de tamanho das micropartículas contendo **Btk** (Fig.35a; 35b), assim como a comparação do formulado 2QUIHCl+**Btk**5% obtido neste trabalho com duas formulações comerciais (fig.35c).

Os resultados obtidos mostram que a adição de 5% (p/p) de **Btk** na formulação com 0,5% de LD não alterou de forma significativa o perfil da curva de distribuição de tamanho (Fig.35a), sendo o diâmetro médio de 228 e 238 um para as micropartículas sem e com 5% de **Btk**, respectivamente.

Por outro lado, a incorporação de 5% de **Btk** em micropartículas obtidas pelo processo 2QUIHCl (Fig.35b) praticamente não alterou o perfil da curva de distribuição de tamanho, sendo que a incorporação de 18% deste microorganismo aumentou o diâmetro médio de 60 para 103µm. Observa-se, ainda na Figura 35c, que formulações obtidas por este processo são comparáveis a duas outras formulações pulverizáveis disponíveis no mercado, que apresentam um diâmetro médio de 16 e 113µm.

A Figura 36 mostra como as micropartículas com Btk encapsulado se mantêm íntegras na água, com retenção dos microorganismos no seu interior (Fig. 36a e 36b) e quando adicionadas em citrato de sódio, liberam os microorganismos encapsulados (Fig. 36c e 36d). A Figura 36e mostra microfotografias de bioinseticida comercial disperso em água. Pode-se observar partículas irregulares e esporos (estrutura em forma de bastonetes) dispersos e sem nenhuma proteção.

Estes resultados comprovam a possibilidade de encapsulação e proteção destes microorganismos entomopatogênicos por dois dos procedimentos de preparação de micropartículas estudados neste trabalho. A umidade média das partículas contendo o Btk foi de 6,0% e a densidade aparente de 0,60g/ml, mantendo as características das mesmas partículas sem este material (Tabela 7).

a) **Legenda**

Vermelho: 1CaCl₂ 0,1M
+0,5%LD+5%Btk

Azul: 1CaCl₂ 0,1M
+0,5%LD

Verde: 1CaCl₂ 0,1M
+2%LD

b)

Vermelho: 2QUIHCl+
18%Btk

Azul: 2QUIHCl+5%Btk

Verde: 2QUIHCl

c)

Vermelho: Pó molhável
contendo conídios de
Metharizium

Azul: 2QUIHCl+5%Btk

Verde: Formulação
comercial com Bt

Figura 35 - Distribuição de tamanho de partículas utilizadas como bioinseticida. Os processos indicados estão descritos na tabela 1 e item 3.3; LD:leite desnatado.

Figura 36 – Fotomicrografias ópticas de partículas obtidas pelos processos $1\text{CaCl}_2\ 0,1\text{M} + \text{Btk}18\%$ (a;c) e $1\text{QUIHCl} + \text{Btk}18\%$ (b;d) logo depois de adicionadas em água (a;b) e depois de 2 horas em citrato de Na $0,05\text{M}$ (c;d); bioinseticida comercial para controlar cigarrinhas de pastagens disperso em água (e). O aumento foi de $400\times$ em (a), (b), (c), (d) e de $1000\times$ em (e).

4.15.3 Mortalidade de larvas do cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* com a ingestão do bioinseticida Btk antes e depois de terem sido microencapsulados

Nas Figuras 32 e 34 não foi possível observar as toxinas bipiramidais também responsáveis pela ação bioinseticida deste microrganismo. A presença destas δ -endotoxinas nas suspensões de **Btk** e nas micropartículas de alginato em quantidades suficientes para exercer uma boa ação bioinseticida, só poderia ser constatada com a realização de bioensaios, através dos quais avaliou-se a capacidade destas suspensões de **Btk**, de matarem lagartas de *Spodoptera frugiperda*, antes e depois de aprisionados pelo alginato.

A Tabela 9 mostra os resultados do número de esporos viáveis nas suspensões de **Btk**, antes e depois de serem formulados ou microencapsulados. Para os formulados BT7 e BT9, foram utilizados 3,1ml da suspensão concentrada e 4g de alginato de sódio, o que resultaria em um número estimado de $8,5 \times 10^9$ esp/g, se a retenção deste microorganismo fosse 100%.

No caso do BT8 foram utilizados 23,2ml e 4g de alginato de sódio, para o qual uma retenção de 100% representaria $2,0 \times 10^9$ esp/g. Pode-se notar por esta Tabela 9 que a retenção efetiva foi próxima de 100%. Outra leitura importante que pode ser feita nesta Tabela é a manutenção da viabilidade dos esporos depois do processo de formulação. Isto se verifica com o número de esporos viáveis por grama de pó sendo praticamente igual aquele esperado e adicionado no início do processo de microencapsulação.

Tabela 9- Mortalidade de lagartas de *S.frugiperda* provocada pela capacidade bioinseticida do Btk não formulado e formulado.

AMOSTRA	N.esp/ml ou N.esp/g	% de Mortalidade de <i>S.frugiperda</i> nas diluições indicadas						
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0
Caldo Fermentado 48h	7,6x10 ⁸	100	100	100	83	33	8	-
Suspensão concentrada (esporos+toxina)	1,1x10 ¹⁰	100	100	92	92	92	75	42
BT7	8,0x10 ⁹	100	75	58	8	0	17	-
BT8	1,9x10 ⁹	100	75	50	33	0	17	-
BT9	7,9x10 ⁹	92	67	58	17	17	8	-

O número de esporos por ml ou por g (N.esp/ml ou g) foi feito por semeadura conforme descrito no item 3.6. A solução-mãe do caldo fermentado e da suspensão concentrada foram de 0,1ml/ml ou 100mg/ml, ou ainda 100.000ppm, a partir da qual foram feitas as diluições seriadas. A solução-mãe dos formulados (BT7, BT8, BT9) foi de 1mg/ml ou 1000ppm. As formulações BT7 e BT9 foram feitas com a suspensão concentrada e a BT8 com o caldo fermentado. As formulações BT7 e BT8 foram feitas pelo processo 1 CaCl₂ 0,1M e a BT9 pelo processo 2QUIHCl (conforme descrito na tabela 1 e no item 3.3) e todas continham 5% de Btk(p/p).

A tabela 9 também apresenta os resultados de bioensaios feitos com o **Btk**, antes e depois deste ter sido incorporado nas formulações. Nota-se que mesmo com a presença de quantidades pequenas de toxinas bipiramidais, o **Btk** utilizado neste trabalho apresenta uma razoável atividade bioinseticida contra as lagartas testadas.

No caldo fermentado uma mortalidade mínima de 50% foi verificada até a diluição 10^{-4} ou na concentração de 10ppm. Na suspensão concentrada de **Btk** esta mortalidade mínima de 50% foi verificada até a diluição 10^{-6} , a qual corresponde a uma concentração de 0,1ppm. Baseando-se no fato que o caldo fermentado foi concentrado 20x para obtenção da suspensão concentrada (item 3.4.1), pode-se concluir que a centrifugação e a lavagem feita com a massa de **Btk** obtida no final de fermentação não alterou sua atividade bioinseticida.

Finalmente, uma discussão pode ser feita aqui sobre a atividade bioinseticida de três formulações do **Btk** obtidas neste trabalho. Primeiramente, verifica-se que os formulados são efetivos, conseguindo matar as lagartas alvo. A mortalidade mínima de 50% das lagartas de *S.frugiperda* utilizadas nos bioensaios foi verificada até a diluição 10^{-3} ou para uma concentração de 1ppm para todas formulações testadas.

Considerando que as dispersões-mãe das suspensões de **Btk** não formulado, onde as diluições decimais foram iniciadas, eram 100 vezes mais concentradas que as dispersões-mãe dos formulados, poderia-se esperar que a mortalidade de, no mínimo 50%, nos formulados fosse alcançada em diluições de até 10^{-4} , se todas as toxinas presentes no início do processo de formulação tivessem sido retidas nas micropartículas do formulado. Mas, levando-se em conta que somente 5% da massa dos formulados foi de **Btk**, enquanto as suspensões líquidas possuíam praticamente 100% da massa em **Btk**, ou seja, 20 vezes mais que os formulados, conclui-se que as formulações aqui desenvolvidas, além de reterem e manterem a viabilidade dos esporos, apresentam a capacidade de aprisionarem a maioria das δ -endotoxinas, mantendo a atividade bioinseticida dos agentes microbianos.

A capacidade das partículas de alginato e de alginato-quitosana de reter δ -endotoxinas de 65 a 135KDa, foi confirmada pela mortalidade das lagartas, depois da ingestão dos formulados feitos com estas partículas e está de acordo com os resultados de DOWET (1988), onde partículas de alginato só retinham proteínas maiores que 20KDa, como a albumina. LIU et al. (1997) obtiveram uma retenção de 95% de albumina em micropartículas de alginato-quitosana que apresentavam 20 a 100 μ m de diâmetro depois de secas por liofilização.

Conclui-se também que as três formulações testadas foram capazes de se dissolverem no intestino da lagarta *S. frugiperda*, liberando as δ -endotoxinas que foram transformadas em forma ativa e foram capazes de lisar as células do intestino da lagarta, causando assim a sua morte.

Com referência à membrana ALG-QUI nas micropartículas (BT9), nota-se que sua presença não aumentou e nem diminuiu a atividade bioinseticida do **Btk** formulado.

É importante realçar aqui a originalidade dos resultados destes bioensaios: dos vários estudos apresentados na literatura sobre a utilização do alginato como protetor da viabilidade de microorganismos, nenhum deles testou a eficiência do alginato como carreador de um agente microbiano com ação bioinseticida até o intestino da praga alvo.

4.16 ESTUDO DE MICROPARTÍCULAS CONTENDO O BIOINSETICIDA Bv MICROENCAPSULADO

A Figura 37a mostra o aprisionamento do **Bv** em uma gota de alginato de cálcio. Neste caso, para uma melhor visualização, a concentração de **Bv** foi aumentada 1000 vezes em relação à concentração utilizada nos formulados testados nos bioensaios,. Na figura 37b pode-se observar também a superfície de uma micropartícula seca englobando uma grande quantidade deste microorganismo.

A suspensão inicial do **Bv** antes de ser encapsulada continha $1,9 \times 10^9$ poliedros/ml. Como foram utilizados 20ul desta suspensão e 4g de alginato na obtenção das formulações com este microorganismo, pode-se estimar $9,5 \times 10^6$ poliedros/g, pressupondo uma porcentagem de retenção de 100%, como foi comprovado para o **Btk**.

A Tabela 10 mostra a porcentagem de mortalidade da lagarta *Anticarsia gemmatalis* depois de ingerir **Bv**, antes e depois deste ser formulado. Como pode-se constatar nesta Tabela, 74 poliedros/lagarta matam apenas 43% das lagartas testadas.

Como os formulados continham o mesmo número de poliedros por grama, teoricamente o mesmo número de poliedros foi ingerido pelas lagartas com a utilização de formulados diferentes, testados nos bioensaios. Apesar disso os resultados da Tabela 10 mostram diferentes desempenhos para as diferentes formulações. A formulação feita com o processo 1CaCl_2 0,1M (BV4) que continha somente o **Bv** e o alginato de cálcio matou somente 7% das lagartas, enquanto que formulações com quitosana, BV5 e BV6, e com 0,5%LD, BV7, mataram respectivamente 92, 57 e 77% das lagartas testadas. Como a mortalidade dos formulados BV5, BV6 E BV7 foi bem maior do que do BV4, mesmo contendo a mesma quantidade de material bioinseticida, poderia ser um indicativo de que a presença de quitosana e LD nos formulados estaria resultando em uma ação de sinergismo sobre a atividade bioinseticida dos poliedros.

Os resultados aqui apresentados são ainda preliminares, mas bastante animadores quanto ao desempenho favorável das formulações desenvolvidas com o **Bv**.

Tabela 10- Porcentagem de mortalidade de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* com a ingestão de **Bv** antes e depois de formulado.

AMOSTRA	Numero. de poliedros ingeridos pela lagarta	Mortalidade
Controle	0	0
Bv	74	43%
BV4	285	7%
BV5	285	92%
BV6	285	57%
BV7	285	77%

O processo de obtenção do formulado BV4 foi 1 CaCl_2 0,1M, do BV5, 2QUIHCl, do BV6 1QUIHCl+ CaCl_2 e do BV7 1 CaCl_2 0,1M+0,5%LD (descritos na tabela 1 e item 3.3).

a)

b)

Figura 38 - Visualização do aprisionamento do **Bv** em uma gota de alginato gelificado com Ca^{2+} antes(a) e depois (b) de seca.

5 CONCLUSÕES

Apartir dos resultados aqui obtidos, pode-se mencionar como principais conclusões:

- As micropartículas preparadas por *spray drying* com misturas poliméricas Caseína-HPMC e Caseína-HEC não se mostraram adequadas para a microencapsulação de microrganismos entomopatogênicos, pois são facilmente solubilizadas em água, ou seja, no meio de dispersão do produto, usada para sua aplicação em campo, limitando assim, a proteção do material encapsulado, somente durante o período de armazenamento.
- As micropartículas resultantes do segundo processo estudado, formadas por sistemas matriciais de alginato de cálcio ou alginato de cálcio envolto por uma membrana alginato-quitosana, têm as propriedades de englobar e reter os microrganismos entomopatogênicos, inclusive após redispersão em água.

Quanto às propriedades destas micropartículas de alginato, conclui-se que as variações de processo estudadas resultaram em partículas com diferentes características e que:

- O aumento do PM da quitosana dificultou o processo de separação do produto e não apresentou diferenças nas caracterizações das micropartículas obtidas.
- As partículas obtidas por atomização com reticulação e coacervação aquosa, pelo processo 2 QUIHCl, mostraram-se bastante homogêneas e bem distribuídas. Estes resultados são bem diferentes de dados de literatura que, na maioria das vezes, mencionam sérios problemas de aglomeração em processos de coacervação, principalmente em sistemas aquosos. As partículas obtidas por este processo 2 QUIHCl foram as mais promissoras para serem utilizadas como um produto bioinseticida.

- Os processos de microencapsulação de **Btk** e **Bv** desenvolvidos e avaliados demonstraram ser adequados para a manutenção da viabilidade de **Btk** e a integridade dos poliedros de **Bv**.

Comprovou-se também que as micropartículas de alginato de cálcio e de alginato de cálcio com quitosana, são capazes de se dissolverem no pH básico do intestino das lagartas *S. frugiperda* e *A.gemmatalis*. Em suma, as micropartículas aqui obtidas se mostraram eficientes em sua ação bioinseticida, abrindo caminho para uma tecnologia alternativa para novas formulações na produção de bioinseticidas, tão úteis e necessárias hoje em dia.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACARTÜRK, F.; TAKKA, S. Calcium alginate microparticles for oral administration: II effect of fomulation factors on drug release and drug entrapmente efficiency. *J. Microencapsul.*, v.16, p.291-301, 1999
- ALDEIA, W. *Estudo experimental da cinética da reação da ativação do carvão da casca de coco de babaçu*. São Paulo, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 1999.
- ALVES, S.B. Controle microbiano de insetos In: CROCOMO, W.B. *Manejo integrado de pragas*,.São Paulo, Editora UNESP, 1990. p. 147-176.
- ALVES, S.B. *Controle microbiano de insetos*. 2.ed., Piracicaba, FEALQ, 1998.
- AMIET-CHARPENTIER, C. ; GADILL, P. ; DIGAT, B. ; BENOIT, J. P. Microencapsulation of rhizobacteria by spray-drying: formulation and survival studies. *J. Microencapsulation.*, v. 15, p. 639-659, 1998.
- AXTELL, R.C. ; GUZMAN, D.R. Encapsulation of mosquito fungal pathogen *Lagenidium giganteum* in calcium alginate. *J.Am. Mosq. Control Assoc.*, v. 3, p. 450-459, 1987.
- BADWAN, A.A.; ABUMALOOH, A.; SALLAM, E.; ABUKALAF, A.; JAWAN, O. A sustained release drug delivery system using calcium alginate beads. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v.11, p. 239-256, 1985.
- BAKAN, J.A.; POWELL, T.C.; SZOTAK, P.S. Recent advances in microencapsulation of drugs to obtain reduced gastric irritation. In: DONBROW, M. (ed). *Microcapsules and nanoparticles in medicine and pharmacy*. United States of America, CRC PRESS, 1992. cap. 10.
- BANDHYOPADHYAY, K.; DAS, D.; MAITI, B.R. Solid matrix characterization of immobilized *Pseudomonas putida* MTCC 1194 used for phenol degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.51, p. 891-895, 1999.
- BASHAN, Y. Alginate beads as synthetic inoculant carriers for slow release of bacteria that affect plant growth. *Appl. Environm. Microbiol.*, v.51, p.1089-1098, 1986.
- BASHAN, Y.; GONZALEZ, L.E. Long-term survival of the plant-growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* in dry alginate inoculant. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 51, p.262-266, 1999.

- BATISTA FILHO, A.; CRUZ, B.P.B.; OLIVEIRA, D.A. Estudos preliminares relacionados ao emprego da liofilização como processo de preservação de *Baculovirus anticarsia*. *Biológico*, v. 51, p. 263-269, 1985.
- BATISTA FILHO, A.; ALVES, S.B.; ALVES, L.F.A.; PEREIRA, R.M.; AUGUSTO, N.T. In: ALVES, S.B., *Controle microbiano de insetos* 2.ed., Piracicaba, FEALQ, 199., cap. 31.
- BARTELT, R. J.; MCGUIRE, M. R.; BLACK, D. A. Feeding stimulants for the European corn borer (Lepidoptera:Pyralidae): additives to a starch-based formulation for *Bacillus thuringiensis*. *Environ. Entomol.*, v.19, p.182-189, 1990.
- BEEGLE, C.C.; ROSE, R.I.; ZINI, Y. Mass production of *Bacillus thuringiensis* and *B. sphaericus* for microbial control of insect pests. In: MARAMOROSCH, K. (ed). *Biotechnology for biological control of pests and vectors*. CRC Press, 1991, cap. 14.
- BERK, Z. *Introduction to the biochemistry of foods*. Amsterdam, Elsevier Scientific Publishing, 1976.
- BODMEIER, R.; CHEN, H. Preparation of biodegradable polylactide microparticles using a spray-drying technique. *J. Pharm. Pharmacol.*, 40, p. 754-757, 1988.
- BODMEIER, R. ; PAERATAKUL, O. A novel multiple-unit sustained release indomethacin-hydroxypropyl methylcellulose delivery system prepared by ionotropic gelation of sodium alginate at elevated temperatures. *Carbohydrate Polymers*, v.16, p. 399-408, 1991.
- BRAVO, A. Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin family proteins and their functional domains. *J. Bacteriol.* v. 179, p. 2793-2801, 1997.
- BROADHEAD, J. ; ROUAN, S. K. E. ; HAU, I. ; RHODES, C. T. The effect of process and formulation variables on the properties of spray-drier β -galactosidase. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 46, p. 458-467, 1994.
- BURGESS, H. D. *Formulation of microbial biopesticides*. Kluwer Academic Publishers, 1998.
- CASSIDY, M.B.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Environmental applications of immobilized microbial cells: a review. *J. Industrial Microbiol.*, v. 16, p. 79-101, 1996.
- CASSON, D.; EMERY, A. N. On the elimination of artefactual effects in assessing the structure of calcium alginate cell immobilization gels. *Enzyme Microbiol. Technol.* v. 9, p. 102-106, 1987.

- CHAMBERLAIN, P.; SYMES, K.C. Polymeric formulations of pest control agents. In: KARSA, D. R.; STEPHENSON, R. A. (ed). *Encapsulation and controlled release*. Royal Society Chemistry , 1993, p. 131-140.
- CHANDY, T.; MOORADIAN, D. L.; RAO, G.H.R. Chitosan/Polyethylene glucol-alginate microcapsules for oral delivery of hirudin. *J. Appl. Polymer Sci.*, v. 70, p. 2143-2153, 1998.
- CHIEN, J.W. Novel drug delivery systems. In: *Drug and Pharmaceutical Science*, v. 50, p.1, 1992.
- COKMUS, C.; ELÇİN, Y.M. Stability and controlled release properties of carboxymethylcellulose-encapsulated *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Pestic. Sci.*, v. 45, p. 351-355, 1995.
- COLOMBO, P.; CATELLANI, P.L.; PEPPAS, N. A. ; MAGGI E.; CONTE, U. Swelling characteristics of hydrophilic matrices for controlled release. New dimensionless number to describe the swelling and release behavior. *Int. J. Pharm.* , v. 88, p. 99-109, 1992.
- DAIGLE, D. J.; COTTY, P.J. Formulating atoxigenic *Aspergillus flavus* for field release. *Biocontrol Sci.Technol.*, v. 5, p. 175-184, 1995.
- DAINTY, A.L.; GOULDING, K.H.; ROBINSON, P.K.; SIMPKINS, I.; TREVAN, M.D. Stability of alginate-immobilized algal cells. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 28, 210-216, 1986.
- DELUCCA II, A. J.; CONNICK Jr W.J.; FRAVEL, D.R.; LEWIS, J. A.; BLAND, J. M. The use of bacterial alginates to prepare biocontrol formulations. *J. of Industrial Microbiology*. v. 6, p. 129-134, 1990.
- DE-SOUZA, M. T.; LIMA, M. I.; SILVA-WERNECK, J. D.; DIAS, J. M. C. S.; RIBEIRO, B. M. Ultrastructural and molecular characterization of the parasporal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* S93 active against *Spodoptera frugiperda*. *Biocell*. v. 23, p. 43-49, 1999.
- DIAS, J.M.C.S. Produção e utilização de bioinseticidas bacterianos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 27, p. 59-76, 1992.
- DIGAT, B. A new bioencapsulation technology for microbial inoculante. *Biomat. Art. Cells & Immob. Biotech.*. v. 21, p. 299-306, 1993.
- DU, C.; NICKERSON, K. W. *Bacillus thuringiensis* HD-73 spores have surface-localized cry 1Ac toxin: physiological and pathogenic consequences. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 62, p. 3722-3726, 1996.

- DUNCAN, J. D. ; WANG, P. X. ; HARRINGTON, C. M. ; SCHAFER, D. P. ; MATSUOKA, Y. ; MESTECKY, J. F. ; COMPANS, R. W. ; NOVAK, M. J. Comparative analysis of oral delivery systems for live rotavirus vaccines. *J. Controlled Release*, v. 41, p. 237-247, 1996.
- DUNKLE, K. L.; SHASHA, B. S. Encapsulated *Bacillus thuringiensis*: A potential new method for increasing environmental stability of entomopathogens. *Environ. Entomol.*, v. 17, p. 120-126, 1988.
- ELÇİN, M. E. *Bacillus sphaericus* 2362-calcium alginate microcapsules for mosquito control. *Enzyme and Microbial Technol.*, v. 17, p. 587-591, 1995.
- ELIZONDO, H. ; LABUZA, T.P. Death kinetics of yeast in spray drying. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 16, p. 1245-1259, 1974.
- FINCH, C. A. Industrial microencapsulation: polymers for microcapsule walls. In: KARSA, D.R.; STEPHENSON, R.A. (Eds). *Encapsulation and controlled release*. Cambridge, Thomas Graham House, Science Park, 1993. p. 1-12.
- FOSTER, T. P. ; LEATHERMAN, M. W. Powder characteristics of proteins spray-dried from different spray-dryers. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v. 21, n.15, p. 1705-1723, 1995.
- FRAVEL, D. R.; MAROIS, J. J.; LUMSDEN, R. D.; CONNICK Jr., W. J. Encapsulation of potential biocontrol agents in a alginate-clay matrix. *Phytopathology*, v. 75, p. 774-777, 1985.
- GARNER, C.R. Drug delivery now? In: Novel drug delivery systems. *Drug and Pharmaceutical Science*, v.50, 1992, cap. 1.
- GÅSERØD, O.; SMIDSRØD, O.; SKJÅK-BRÆK, G. Microcapsules of alginate-chitosan I. A quantitative study of the interaction between alginate and chitosan. *Biomaterials* , v. 19, p. 1815-1825, 1998
- GÅSERØD, O.; SANNES, A.; SKJÅK-BRÆK, G. Microcapsules of alginate-chitosan. II A study of capsule stability and permeability. *Biomaterials*, v. 20, p. 773-783, 1999.
- GILLESPIE, R. L.; McGUIRE, M. R.; SHASHA, B. S. Palatability of flour granular formulations to European corn borer larvae (Lepidoptera:Pyralidae). *J. Econ. Entomol.*, v. 87, p. 452-457, 1994.
- GRANADOS, R. R.; FEDERICI, B. A. *The biology of Baculovirus*. Boca Raton, CRC Press, 1986. 2 v.

- GRAY, C. J.; DOWSETT, J. Retention of insulin in alginate gel beads. *Biotechnol. Bioeng.* v. 31, p. 607-612, 1988.
- GÜRSOY, A.; KARAKUS, D.; OKAR, I. Polymers for sustained release formulations of dipyridamole-alginate microspheres and tabletted microspheres. *J. Microencapsulation*, v. 16, p. 439-452, 1999.
- HARI, P.R.; CHANDY, T.; SHARMA, C. P. Chitosan/calcium alginate microcapsules for intestinal delivery of nitrofurantoin. *J. Microencapsulation*, v. 13, p. 3319-329, 1996a.
- HARI, P.R.; CHANDY, T.; SHARMA, C. P. Chitosan/Calcium-alginate beads for oral delivery of insulin. *J. Appl. Pol. Sci.*, v. 59, p. 1795-1801, 1996b.
- HEELAN, B. A.; CORRIGAN, O. I. "In vitro" analysis of the release of incorporated agents from sodium caseinate microspheres. *J. Microencapsulation*, v. 14, p. 63-78, 1997.
- HIRANO, S.; NOISHIKI, Y. *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 19, p. 413, 1985.
- HUGUET, M. L.; DELLACHERIE, E. Calcium alginate beads coated with chitosan: effect of the structure of encapsulated materials on their release, *Process Biochem.*, v. 38, p. 745-751, 1996.
- JAYAKRISHNAN, A.; KNEPP, W.A.; GOLDBERG, E.P. Casein microspheres: preparation and evaluation as carrier for controlled drug delivery. *Int. J. Pharm.*, v. 106, n.6, p. 221-228, 1994.
- JOHNSON, D.E.; McGAUGHEY, W. H. Contribution of *Bacillus thuringiensis* spores to toxicity of purified Cry proteins towards indian meal moth larvae. *Current Microbiol.*, v. 33, p. 54-59, 1996.
- KESTER, J. J. ; FENNEMA, O. R. Edible films and coatings: A review. *Food Technol.*, v. 40, n.12, p. 47, 1986.
- KIM, C.-K.; LEE, E.-J. The controlled release of dextran from alginate beads. *Int. J. Pharm.*, v. 79, p. 11-19, 1992.
- KING, A. H. Brown seaweed extracts (alginates). In: GLICKSMAN, M. (Ed) *Food Hydrocolloids*, 1983. v.2, cap. 6.
- KITAMIKADO, M.; YAMAGUCHI, K.; TSENG, C.-H.; OKADE, B. Method designed to detect alginate-degrading bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 56, p. 2939-2940, 1990.

- KLEIN, J.; KRESSDORF, B. Polymers for the immobilization of whole cells and their application in biotechnology. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*, v. 166/167, p. 293-309, 1989.
- KRISTMUNDSDÓTTIR, T. ; GUDMUNDSSON, Ó. S. ; INGVARSDÓTTIR, K. Release of diltiazem from Eudragit microparticles prepared by spray-drying. *Int. J. Pharm.*, v. 137, p. 159-165, 1996.
- KUTS, P. S.; TUTOVA, E. G. Fundamentals of drying of microbiological materials. *Drying Technol.*, v. 2, p. 171-201, 1983-84.
- LAMBERT, B.; PEFFEROEN, M. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. *Bioscience*, v. 42, p. 112-122, 1992.
- LEE, K. Y.; PARK, W. H.; HA, W. S. Polyelectrolyte complexes of sodium alginate with chitosan or its derivatives for microcapsules. *J. Appl. Polym. Sci.*, v. 63, p. 425-432, 1997.
- LERECLUS, D.; DELÉCLUSE, A.; LECADET, M.-M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENTWISTLE, P.F.; CORY, J.S.; BAILEY, M.J.; HIGGS, S. *Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticides. Theory and practice.*, John Wiley, 1993. cap. 2.
- LI, X. The use of chitosan to increase the stability of calcium alginate beads with entrapped yeast cells. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, v. 23, p. 269-271, 1996.
- LIN, S.-Y.; LIN, P.-C. Effect of acid type, and sodium carboxymethyl cellulose concentration on the formation, micromerit, dissolution and floating properties of theophylline chitosan microcapsules. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 40, p. 2491-2497, 1992.
- LIU, L.-S.; LIU, S.-Q.; NG, S. Y.; FROIX, M.; OHNO, T.; HELLER, J. Controlled release of interleukin-2 for tumour immunotherapy using alginate/chitosan porous microspheres., v. 43, p. 65-74, 1997.
- MAA, Y.-F.; COSTANTINO, H.R.; NGUYEN, P.-A. The effect of operating and formulation variables on the morphology of spray-drier protein particles. *Pharm. Dev. Technol.*, v.2, 213-223, 1997.
- MANNING, M.C.; PATEL, K.; BORCHARDT, R.T. Stability of protein pharmaceuticals. *Pharmaceutical Res.*, v. 6, p. 903-918, 1989.
- MARTINSEN, A.; SKJÅK-BRÆK, G.; SMIDSRØD, O. Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. *Biotech. Bioeng.*, v. 33, p. 79-89, 1989.

- MASTER, K. Applications in the pharmaceutical-biochemical industry. In: MASTER, K. *Spray drying handbook*, 1991. cap. 16.
- MATSUO, M. ; NAKAMURA, C. ; ARIMORE, K. ; NAKAMURA, M. Evaluation of hydroxyethylcellulose as a hydrophilic swellable material for delayed-release tablets. *Chem.Pharm. Bull.* , v. 43, n.2, p. 311-314, 1995.
- McGUIRE, M. R.; SHASHA, B. S. Adherent starch granules for encapsulation of insect control agents. *J. Econ. Entomol.*, v. 85, p. 1425-1443, 1992.
- McGUIRE, M. R.; SHASHA, B. S.; EASTMAN, C. E.; OLOUMI-SADEGHI, H. Starch-and-flour-based sprayable formulations: Effect on rainfastness and solar stability of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.*, v. 89, p. 863-869, 1996.
- McKNIGHT, C. A.; KU, A.; GOOSEN, M. F. A.; SUN, D.; PENNEY, C. Synthesis of chitosan-alginate microcapsule membrane. *J. Bioactive and Compatible polymers*. V. 3p. 334-354, 1988.
- McLAUGHLIN, C. A.; GOLDBERG, E. P. Local chemo-and immunotherapy by intratumor drug injection: opportunities for polymer-drug compositions. In: GOLDBERG, E. P. (Ed). *Targeted drugs*. New York, John Wiley, 1983. p. 231-268.
- McLOUGHLIN, A. J. Controlled release of immobilizes cells as a strategy to regulate ecological competence of inocula. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, v. 51, p. 1-45, 1994.
- MELLO, I. S.; AZEVEDO, J. L. *Controle Biológico/Prefácio*. EMBRAPA, Meio Ambiente, 1999.
- MOE, S. T.; SKJÅK-BRÆK, G.; SMIDSROD, O. Covalently cross-linked sodium alginate beads. *Food Hydrocolloids*, v. 5, p. 119-123, 1991.
- MONNERAT, R.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELLO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds). *Controle Biológico*, Jaguariuna, EMBRAPA- Meio Ambiente, 1999. cap. 7.
- MOSCARDI, F. Utilização de *Baculovirus anticarsia* para o controle da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis*. *Comunicado Técnico*, Londrina, EMBRAPA, nº. 23, p. 1-21, 1983.
- MURATA,Y.; NAKADA, K.; MIYAMOTO, E.; KAWASHIMA, S.; SEO,S.-H. Influence of erosion of calcium induced alginate gel matrix on the release of brilliant blue. *J. Controlled Release*, v. 23, 21-26, 1993a.

- MURATA, Y.; MAEDA, T.; MIYAMOTO, E.; KAWASHIMA, S. Preparation of chitosan-reinforced alginate gel beads – effects of chitosan on gel matrix erosion. *Int.J. Pharm.*, v. 96, p. 139-145, 1993b.
- NARDO, E. A. B.; CAPALBO, D. M. F. Utilização de agentes microbianos de controle de pragas: mercado, riscos e regulamentações. In: MELLO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds), *Controle Biológico*, Jaguariuna, Embrapa, 1998.
- OKHAMAFE, A. O.; AMSDEN, B.; CHU, W.; GOOSEN, M. F. A. Modulation of protein release from chitosan-alginate microcapsules using the pH-sensitive polymer hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate. *J. Microencapsul.*, v. 13, p. 497-508, 1996.
- OPPENHEIN, R.C. ; MARTY, J. J. ; SPEISER, P. Injectable compositions, nanoparticles useful therein, and process of manufacturing same. *US Patent 4*, 107, 288, 1978.
- ØSTBERG, T.; GRAFFNER, C. Calcium alginate matrices for oral multiple unit administration. I. Pilot investigations of production method. *Acta Pharm. Nord.*, v. 4, p. 201-208, 1992.
- ØSTBERG, T.; CHRISTINA, G. Calcium alginate matrices for oral multiple unit administration: III. Influence of calcium concentration, amount of drug added and alginate characteristics on drug release. *Int. J. Pharm.*, v. 111, p. 271-282, 1994.
- PANDYA, Y.; KNORR, D. Diffusion characteristics and properties of chitosan coacervate capsules. *Proc. Biochem.*, v. 26, p. 75-81, 1991.
- PEIRONE, M.; ROSS, C. J. D.; HORTELANO, G.; BRASH, J. L.; CHANG, P. L. Encapsulation of various recombinant mammalian cell types in different alginate microcapsules. *Biomed. Mater. Res.*, v. 42, p. 587-596, 1998.
- PETER, M. G. Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. *J.M.S. – PURE APPL. CHEM.*, v. A32, p.629-640, 1995.
- PIETSCH, W. Fundamentals of agglomeration. In: *Size enlargement by agglomeration*, John Wiley, 1991. cap.2.
- PFISTER, G.; BAHADIR, M.; KORTE, F. Release characteristics of herbicides from Ca alginate gel formulations. *J. Controlled Release*, v. 3, p. 229-233, 1986.
- POLK, A.; AMSDEN, B.; YAO, K.; PENG, T.; GOOSEN, M.F.A. Controlled release of albumin from chitosan-alginate microcapsula. *J. Pharm. Sci.*, v. 83, p. 178-185, 1994.
- PONCELET, D.; PONCELET DE SMET, B.; BEAUULIEU, C.; HUGUET, M. L.; FOURNIER, A.; NEUFELD, R.J. Production of alginate beads by

- emulsification/internal gelation. II. Physicochemistry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 43, p. 644-650, 1995.
- PORTE, H.; COUARRAZE, G. Microencapsulation process for the manufacture of systems providing modified release of the active constituent. In: DELEVIL, D.; POURCELOT, Y. (Ed.). *Powder technology and pharmaceutical process*. Chulia, Elsevier Science, 1994. p. 513-538.
- POWELL, K. A. The commercial exploitation of microorganism in agriculture. In: JONES, G. (Ed). *Exploitation of microorgasnism*. Chapman & Hall, 1993. p. 441-460.
- RÉ, M. I. Microencapsulation by spray drying. *Drying Technol.*, v. 16, n.6, p. 1195-1236, 1998.
- ROSENBERG, M. ; KOPELMAN, I. J. ; TALMON, Y. A scanning electron microscopy study of microencapsulation. *J. Food Science*, v. 50, p. 139-144, 1985.
- SALEK, A. T. ; ARNOLD, M. Trealose-stabilisation of osmophilicity and viability of baker's and distiller's yeast: applications to storage and drying. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.*, v. 17, n.1/2, p. 14-21, 1995.
- SALIB, N. N.; EL-MENSHANY, M.; ISMAIL, A. A. Utilization of sodium alginate in drug microencapsulation. *Pharm. Ind.*, v. 40, p. 1230-1234, 1978.
- SANCHIS, V.; GOHAR, M.; CHAUFAX, J.; ARANTES, O.; MEIER, A.; AGAISSE, H.; CAYLEY, J.; LERECLUS, D. Development and field performance of a broad-spectrum nonviable asporogenic recombinant strain of *Bacillus thuringiensis* with greater potency and UV resistance. *App. Environ. Microbiol.*, v.65, p. 4032-4039, 1999.
- SEZER, A. D.; AKBÜGA, J. Release characteristics of chitosan treated alginate beads: I. Sustained release of a macromolecular drug from treated alginate beads. *J. Microencapsul.*, v. 16, p. 195-203, 1999a.
- SEZER, A. D.; AKBÜGA, J. Release characteristics of chitosan treated alginate beads: II. Sustained release of a low molecular drug from chitosan treated alginate beads. *J. Microencapsul.*, v. 16, p. 687-696, 1999b.
- SHAHIDI, F.; HAN, X.-Q. Encapsulation of food ingredients. *Critical Rev. Food Science and Nutrition*, v. 33, p. 501-547, 1993.
- SKAUGRUD, O. Drug delivery systems with alginate and chitosan. In: KARSA, D. R.; STEPHENSON, R.A.(Eds). *Excipients and delivery systems for pharmaceutical formulations.*, Cambridge, The Royal Society of Chemistry, 1995. p. 96-107.

- SKJÅK-BRÆK, G.; ZANETTI, F.; PAOLETTI, S. Effect of acetylation on some solution and gelling properties of alginate. *Carbohydrate Res.*, v. 185, p. 131-138, 1989.
- SKOVMAND, O.; SANOGO, E. Experimental formulations of *Bacillus shaericus* and *Bacillus thuringiensis* against *Culex quiquefasciatus* and *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in Burkina Faso. *J. Med. Entomol.*, v. 36, p. 62-67, 1999.
- SMIDSRØD, O.; SKJÅK-BRÆK, G. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol.*, v. 8, p. 71-78, 1990.
- STORMO, K.E.; CRAWFORD, R. L. Preparation of encapsulated microbial cells for environmental applications. *Appl. Env. Microbiol.*, v. 58, p. 727-730, 1992.
- STRUMILLO, C.; ADAMIEC, J. Advances in drying of biodynesis products. *Anais XIX Encontro sobre escoamento em meios porosos*, Campinas, UNICAMP, 1991.
- SUGAWARA, S.; IMAI, T.; OTAGIRI, M. The controlled release of prednisolone using alginate gel. *Pharm. Research.*, v. 11, p. 272-277, 1994.
- SUJJA-AREEVATH, J.; MUNDAY, D.L.; COX, P. J.; KHAN, K. A. Relationship between swelling, erosion and drug release in hydrophilic natural gum mini-matrix formulations. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v. 6, p. 207-217, 1998.
- TAKENAKA, H.; KAWASHIMA, Y.; LIN, S-Y. Preparation of enteric-coated microcapsules for tableting by spray-drying technique and "in vitro" simulation of drug release from the tablet in GI tract. *J. Pharm. Sci.*, v. 69, n.12, p. 1388-1392, 1980.
- TAKKA, S. ; ACARTÜRK, F. Calcium alginate microparticles for oral administration: I: effect, of sodium alginate type on drug release and drug entrapment efficiency. *J. Microencapsulation*, v. 16, p. 275-290, 1999.
- TAMEZ-GUERRA, P.; MCGUIRE, M. R.; MEDRANO-ROLDAN, H.; GALAN-WONG, L. J.; SHASHA, B. S.; VEGA, F. E. Sprayable granule formulations for *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.*, v. 89, p. 1424-1430, 1996.
- TANAKA, H.; MATSUMURA, M.; VELIKY, I. A. Diffusion characteristics of substrates in Ca-Alginate gel beads. *Biotech. Bioeng.*, v. 26, p. 53-58, 1984.
- THIES, C. A survey of microencapsulation process. In: BENETA, S.(Ed), *Drug and Pharmaceutical Science*, Marcel Dekker, 1996. v. 73, cap.1.

- TREVORS, J.T.; ELSAS, J.D.van; LEE, H.; WOLTERS, A.C. Survival of alginate-encapsulated *Pseudomonas fluorescens* cells in soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 39, p. 637-643, 1993.
- VAM KAMP, H. V.; BOLHUIS, G. K.; deBOER, A. H.; LERK, C. F.; HUEN, L. The role water uptake on tablet desintegration. *Pharm. Acta. Helv.*, v. 61, p. 22-29, 1986.
- VOIGT, R.; BORNSCHEIN, M. *Tratado de Tecnologia Farmacêutica*, 1979
- YOTSUYANAGI, T.; OHKUBO, T.; OHHASHI, T.; IKEDA, K. Calcium-induced gelation of alginic acid and pH-sensitive reswelling of dried gels. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 35, n. 4, p. 1555-1563, 1987.
- WAN, L.S.C. ; HENG, P.W.S. ; WONG L.F. The effect of hydroxypropylmethylcellulose on water penetration into a matrix system. *Int. J. Pharm.* , v. 73, p. 111-116, 1991.
- WAN, L.S.C. ; HENG, P.W.S. ; CHIA, C. G. H. Spray-drying as a process for microencapsulation and the effect of different coating polymers. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v. 18, p. 997-1011, 1992.
- WERNECK, J. O. S. Caracterização da estirpe S93 de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* efetiva contra a lagarta-do-cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda*). Dissertação de mestrado - Instituto de Biociências, Dep. Biologia Celular, Un. Brasília, 1997.
- WERNECK, J. O. S.; NETO, J. R. M. V. A.; FARIA, L. O.; TOSTES, A. N.; DIAS, J. M. C.S. Novo isolado de *Bacillus thuringiensis* efetivo contra a lagarta-do-cartucho. *Pesq. Agropec. Bras.*, v. 35, p. 221-227, 2000.
- WHEATLEY, T. A.; STEUERNAGEL, C. R. Latex emulsions for controlled drug delivery. In: MCGINITY, J. W. (Ed), *Aqueous polymeric coatings for pharmaceutical dosage forms*, Marcel Dekken, 2a ed., 1997. cap. 1.
- [WHO] World Health Organization. *Guideline specifications for bacterial larvicides for public health use*. Informal Consultation, 28-30 de abril, WHO, Geneva, 1999.
- WILLAERT, R. G.; BARON, G. V. Gel entrapment and microencapsulation: methods, applications and engineering principles. In: MARMUR, A. (Ed), *Reviews in chemical engineering*, v. 12, p. 23, 1996.