



Universidade Federal de Uberlândia  
Faculdade de Engenharia Química  
Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos



**MICROENCAPSULAÇÃO DE CONÍDIOS DE *Trichoderma asperellum* POR  
SPRAY DRYING PARA PRODUÇÃO DE FUNGICIDA MICROBIOLÓGICO**

**Alinne Brandão Andalécio Camargos Braga**

**Patos de Minas-MG**

**2019**



Universidade Federal de Uberlândia  
Faculdade de Engenharia Química  
Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos



**MICROENCAPSULAÇÃO DE CONÍDIOS DE *Trichoderma asperellum* POR  
SPRAY DRYING PARA PRODUÇÃO DE FUNGICIDA MICROBIOLÓGICO**

**Alinne Brandão Andalécio Camargos Braga**

Orientador: Dr. Eloízio Júlio Ribeiro (PPGEA-UFU)

Co-orientadora: Dra. Líbia Diniz Santos (PPGEA-UFU)

Co-orientadora: Dra. Marta Fernanda Zotarelli (PPGEA-UFU)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

**Patos de Minas-MG**

**2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

B813i  
2019 Braga, Alinne Brandão Andalécio Camargos, 1991-  
Microencapsulação de conídios de *Trichoderma asperellum* por  
spray drying para produção de fungicida microbiológico [recurso  
eletrônico] / Alinne Brandão Andalécio Camargos Braga. - 2019.

Orientador: Eloízio Júlio Ribeiro.

Coorientadoras: Líbia Diniz Santos e Marta Fernanda Zotarelli.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.306>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Engenharia de alimentos. 2. Microencapsulação. 3. *Trichoderma*.  
4. Fungos na agricultura. I. Ribeiro, Eloízio Júlio, 1952- (Orient.). II.  
Santos, Líbia Diniz (Coorient.). III. Zotarelli, Marta Fernanda  
(Coorient.). IV. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-  
Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

---

CDU: 664

Maria Salete de Freitas Pinheiro - CRB6/1262

ALINNE BRANDÃO ANDALÉCIO CAMARGOS BRAGA

**MICROENCAPSULAÇÃO DE CONÍDIOS DE *TRICHODERMA ASPERELLUM* POR  
*SPRAY DRYING* PARA PRODUÇÃO DE FUNGICIDA MICROBIOLÓGICO**

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Uberlândia *Campus* Patos de Minas, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Engenharia de Alimentos.

Patos de Minas, 18 / dezembro / 2018


**BANCA EXAMINADORA**



---

Prof. Dr.: Eloízio Júlio Ribeiro

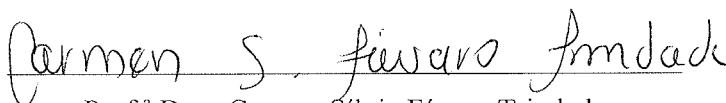
(Orientador – Universidade Federal de Uberlândia - UFU)



---

Prof. Dr.: Humberto Molinar Henrique

(Membro 1 - Universidade Federal de Uberlândia - UFU)



---

Prof.ª Dra.: Carmen Sílvia Fávaro Trindade

(Membro 2 – Universidade de São Paulo - USP)

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer com muito carinho todas as pessoas que fizeram parte dessa jornada. Por não ser possível citar todos os nomes, agradeço:

À Deus! Meu melhor amigo. Sinto muita gratidão por tudo que recebi ao longo da minha vida. Obrigada por todas as graças!

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Uberlândia-Campus Patos de Minas, pela oportunidade concedida.

Aos meus orientadores, Dr. Eloízio Julio Ribeiro, Dra. Líbia Diniz Santos e Dra. Marta Fernanda Zotarelli, agradeço pela confiança, pelos ensinamentos que me foram passados ao longo desses anos, e por todas as oportunidades que colocaram em meu caminho. Em especial, gostaria de agradecer as professoras Líbia e Marta, que firmaram em mim o amor pela pesquisa e que nunca mediram esforços para me ajudar. Serei eternamente grata a vocês!

Aos demais professores dos cursos de Engenharia de Alimentos e Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia, que em diversos momentos me motivaram para a realização deste projeto. Em especial gostaria de destacar as professoras Carla Zanella Guidini e Milla Gabriela dos Santos, por despertarem em mim o interesse pela engenharia bioquímica e pelos processos de microencapsulação.

A todos os funcionários do Laboratório de Engenharia de Alimentos e demais laboratórios da UFU, pelas contribuições experimentais e pela motivação. Em especial gostaria de destacar: Betânia, Stefânia, Laís, Dayene, Marcos, Carla, Douglas e Renan.

Ao Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica de Varredura da Faculdade Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia e ao técnico Rafael Heilbuth pelas análises de MEV.

Aos alunos de iniciação científica, Mariana e Cleiver, pela ajuda fornecida.

Aos membros das bancas de seminário e qualificação de mestrado, professores Dr. Ricardo Corrêa de Santana, Dra. Milla Gabriela dos Santos e Dra. Liliane Maciel de Oliveira pelas correções e contribuições ao trabalho.

Aos membros da banca de defesa da dissertação, pela atenção e por se disporem a avaliar este trabalho, em especial professora Dra. Carmen Sílvia Fávaro Trindade e Dr. Humberto Molinar Henrique.

Aos colegas da primeira turma de mestrado em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Uberlândia – *Campus* Patos de Minas.

A todos os colegas e funcionários do Laboratório Farroupilha-Lallemand: muito obrigada a todos pelo auxílio nas análises, companheirismo e amizade durante todos esses anos. Em especial, gostaria de agradecer ao Leonardo, Alan e Morganna, que foram os meus orientadores na empresa, à Joyce, Débora, Ronnie, Monique, Iara, Rejanne, Sabrina, Sarah, Cleiton, Diego, Vanderley, e tantos outros pelas diversas contribuições experimentais e teóricas.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Ao Rodrigo, meu amor, o anjo que Deus colocou em meu caminho, que esteve ao meu lado desde o início, que me apoiou durante todas as dificuldades e também comemorou comigo todas as conquistas ao longo dessa trajetória, obrigada pelo coração enorme e cheio de amor, obrigada por me apoiar e incentivar na busca desse objetivo.

A toda minha família, em especial meus amados pais Rosimeire e Geraldo, pelos ensinamentos e exemplos de vida tão valiosos, a disposição e esforço de vocês sempre foram minha motivação para fazer sempre o melhor de mim. Agradeço também por todas as orações da minha mãe, pedindo que o Espírito Santo guiasse o meu caminho e por ter me incentivado desde criança pela busca ao conhecimento. Mãe, obrigada por todos os exemplares da revista Ciência Hoje das Crianças que me deu, que despertaram o meu amor pela pesquisa quando eu ainda criança pude fazer as minhas primeiras “experiências”. Aos meus irmãos Marcos e Andressa pela admiração e incentivo, tão importantes para minha formação pessoal e profissional. Amo vocês!

Dedico este trabalho a vocês.

“A mais urgente pergunta a ser feita nesta vida é: - O que fiz hoje pelos outros?”

Martin Luther King Jr.

“O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano.”

Isaac Newton

## RESUMO

O uso excessivo de agrotóxicos na agricultura para o controle de doenças de plantas tem originado diversos problemas ambientais. Desta forma, métodos alternativos que visam sustentabilidade ambiental têm sido propostos, entre os quais o controle biológico tem apresentado destaque. Fungos do gênero *Trichoderma spp.* possuem as espécies mais utilizadas para controle de fitopatógenos no mundo, porém os produtos formulados apresentam reduzida vida de prateleira e viabilidade do agente biológico durante o armazenamento e aplicação no campo. Além disso, a integração de tratamentos químicos e biológicos em sementes pode acarretar danos aos microrganismos. Por isso, tem se buscado promover uma proteção destes agentes para aumentar sua viabilidade, por meio do uso de técnicas de microencapsulação. Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram: caracterizar diferentes tipos de materiais de parede (MP), tais como, sacarose, maltodextrina DE20, goma arábica, soro de leite e lactose, e aplicá-los no processo de microencapsulação mediante testes preliminares a fim de identificar um agente encapsulante com potencial; Por meio de um planejamento composto central (PCC) otimizar e validar o modelo estatístico obtido para representar o processo de microencapsulação dos conídios de *Trichoderma asperellum* por *spray drying* utilizando maltodextrina DE20 como agente encapsulante; Caracterizar as micropartículas produzidas por testes de umidade, atividade de água, solubilidade em água, higroscopicidade, conídios viáveis (CV), percentual de sobrevivência dos conídios (SP), microscopia ótica, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e distribuição do tamanho de partículas; Avaliar a vida de prateleira dos conídios microencapsulados por *spray drying* e aplicá-los em sementes de soja tratadas quimicamente, por fungicidas e inseticidas químicos, e sem tratamento, com o intuito de averiguar a resistência dos conídios aos produtos químicos e ao armazenamento ao longo do tempo; Estudar a estabilidade das micropartículas desidratadas através de isotermas de sorção de umidade e comparar os resultados com uma amostra controle e um produto comercial. Diante da avaliação dos resultados, percebeu-se que a adição dos materiais de parede propiciou aumento da germinação e viabilidade dos conídios de *Trichoderma asperellum* em comparação com os ensaios sem uso de material protetor, sendo que os melhores resultados de CV (%) e SP (%) foram encontrados utilizando-se maltodextrina DE20, seguidos do soro de leite. Os valores otimizados pelo PCC foram de 80°C para a temperatura de entrada do ar de secagem e 1:4,5 massa seca de conídios de *Trichoderma asperellum*/massa seca de maltodextrina DE20. Na condição de otimização obteve-se experimentalmente rendimento de secagem de 63,85 ± 0,86%, umidade de 4,92 ± 0,07%, conídios viáveis de 87,10 ± 1,16% e percentual de



sobrevivência de  $85,78 \pm 2,88\%$ . Os conídios apresentaram alta viabilidade após 150 dias de armazenamento à  $4^{\circ}\text{C}$ , exibindo aproximadamente  $2,17 \times 10^9$  CFU  $\text{g}^{-1}$ . A microencapsulação se mostrou eficiente para a integração do tratamento biológico com produtos químicos em sementes de soja. Os valores experimentais das isotermas dos conídios microencapsulados demonstraram que as propriedades adsorptivas do pó foram significativamente afetadas pela presença de maltodextrina DE20 na formulação do produto, uma vez que a amostra controle obteve índices menores de adsorção de umidade. As isotermas de sorção de umidade do pó dos conídios de *Trichoderma asperellum* microencapsulados por *spray drying* foram bem ajustadas pelo modelo de BET, enquanto o modelo de GAB ajustou-se melhor aos dados da amostra controle e PCT. Os resultados obtidos com este estudo apresentam-se promissores, demonstrando que os conídios microencapsulados podem ser uma alternativa para alcançar maior vida de prateleira e compatibilidade com fungicidas e inseticidas químicos durante o armazenamento de sementes, almejando assim obter metodologias para a agricultura sustentável.

**Palavras-chave:** Materiais de parede, maltodextrina, controle biológico, fungos, vida de prateleira.

## ABSTRACT

The excessive use of agrochemicals in agriculture to control plant diseases has given rise to several environmental problems. In this way, alternative methods that aim at environmental sustainability have been proposed, among which biological control has been highlighted. Fungi of the genus *Trichoderma spp.* have the most used species for phytopathogen control in the world, but the formulated products present reduced shelf life and biological agent viability during storage and field application. In addition, the integration of chemical and biological treatments into seeds can lead to damage to microorganisms. Therefore, it has been sought to promote a protection of these agents to increase their viability, through the use of microencapsulation techniques. The objective of this work was to characterize different types of wall materials, sucrose, maltodextrin DE20, Arabic gum, whey and lactose, and to apply them in the microencapsulation process by means of preliminary tests in order to identify an encapsulating agent with potential; By means of a central composite planning (PCC) to optimize and validate the statistical model obtained to represent the microencapsulation process of the conidia of *Trichoderma asperellum* by spray drying using maltodextrin DE20 as encapsulating agent; Characterization of the microparticles produced by tests of moisture, water activity, water solubility, hygroscopicity, viable conidia (CV), percentage of conidial survival (SP), optical microscopy, scanning electron microscopy (SEM) and particle size distribution; To evaluate the shelf life of microencapsulated conidia by spray drying and to apply them to chemically treated soybean seeds by chemical and untreated fungicides and insecticides in order to ascertain conidia resistance to chemicals and storage over time. In the evaluation of the results, it was noticed that the addition of the wall materials allowed an increase in the germination and viability of the conidia of *Trichoderma asperellum* in comparison with the tests without the use of protective wall material, being that the best results of CV (%) and SP (%) were found using maltodextrin DE20, followed by whey. To study the stability of dehydrated microparticles through moisture sorption isotherms. The values optimized by PCC were 80°C for the drying air intake temperature and 1:4.5 dry mass of *Trichoderma asperellum* conidia/dry mass of maltodextrin DE20. Under the optimized conditions it was obtained experimentally drying yield of  $63.85 \pm 0.86\%$ , moisture of  $4.92 \pm 0.07\%$ , viable conidia of  $87.10 \pm 1.16\%$  and survival percentage of  $85.78 \pm 2.88\%$ . The conidia showed high viability after 150 days of storage at 4 °C, exhibiting approximately  $2,17 \times 10^9$  CFUg<sup>-1</sup>. Microencapsulation proved to be efficient for the integration of biological treatment with chemical products in soybean seeds. The results obtained with this study are promising,

demonstrating that the conidia of *Trichoderma asperellum* microencapsulated can be an alternative to reach longer shelf life and chemical compatibility during the storage of seeds, aiming to obtain methodologies for sustainable agriculture. Experimental values of the isotherms microencapsulated conidia demonstrated that the adsorptive properties of the powder were significantly affected by the presence of maltodextrin DE20 in the product formulation, since the control sample obtained lower moisture adsorption indices. The moisture sorption isotherms of the conidia of *Trichoderma asperellum* microencapsulated by spray drying were well adjusted by the BET model ( $R^2$  of 0.989) and characterized as type III, while the control and PCT samples were better adjusted by the model of GAB ( $R^2$  of 0.927 and 0.947).

**Keywords:** Wall materials, maltodextrin, biological control, fungi, shelf life.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.1.</b> Agentes carreadores utilizados em secagem por <i>spray drying</i> .....	30
<b>Tabela 2.1.</b> Condições operacionais utilizadas para a microencapsulação dos conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> por <i>spray drying</i> utilizando sacarose (açúcar comercial) como agente encapsulante.....	53
<b>Tabela 2.2.</b> Resultados de caracterização da sacarose.....	56
<b>Tabela 2.3.</b> Umidade e rendimento de secagem das formulações utilizando sacarose como material de parede.....	58
<b>Tabela 2.4.</b> Porcentagem de germinação em diferentes tempos de incubação e conídios viáveis. ....	60
<b>Tabela 3.1.</b> Propriedades físico-químicas e microbiológicas da suspensão dos conídios de <i>Tichoderma asperellum</i> e das micropartículas obtidas após o processo de <i>spray drying</i> . ....	75
<b>Tabela 3.2.</b> Propriedades físico-químicas e microbiológicas obtidas antes e após o processo de <i>spray drying</i> . ....	77
<b>Tabela 4.1.</b> Planejamento composto central empregado nos ensaios de microencapsulação por <i>spray drying</i> utilizando maltodextrina DE20 como material de parede.....	102
<b>Tabela 4.2.</b> Resultados de rendimento de secagem, umidade, conídios viáveis e eficiência de microencapsulação em função das condições experimentais do Planejamento composto central realizado utilizando Maltodextrina DE20 como material de parede.....	104
<b>Tabela 4.3.</b> Resultado da regressão múltipla aplicada ao PCC sobre o resultado de rendimento de secagem. ....	106
<b>Tabela 4.4.</b> Análise de variância para a variável resposta Rendimento de secagem para o Planejamento Composto Central.....	107
<b>Tabela 4.5.</b> Resultado da regressão múltipla aplicada ao PCC sobre o resultado de umidade das micropartículas de conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> . ....	108
<b>Tabela 4.6.</b> Análise de variância para a variável resposta Umidade das micropartículas para o Planejamento Composto Central.....	109
<b>Tabela 4.7.</b> Resultado da regressão múltipla aplicada ao PCC sobre o resultado de conídios viáveis das micropartículas de conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> . ....	110
<b>Tabela 4.8.</b> Análise de variância para a variável resposta conídios viáveis para o planejamento composto central.....	111
<b>Tabela 4.9.</b> Resultado da regressão múltipla aplicada ao PCC sobre o resultado de percentual de sobrevivência dos conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> microencapsulados.....	113
<b>Tabela 4.10.</b> Análise de variância para a variável resposta percentual de sobrevivência para o planejamento composto central.....	114
<b>Tabela 4.11.</b> Distribuição do tamanho de partículas, <i>span</i> e uniformidade das micropartículas de conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> para o planejamento composto central. ....	122
<b>Tabela 4.12.</b> Rendimento de secagem, umidade, conídios viáveis e percentual de sobrevivência em função das condições da Validação do modelo utilizando Maltodextrina DE20 como material de parede no processo de microencapsulação. ....	131
<b>Tabela 4.13.</b> Comparação entre os valores teóricos e experimentais do ensaio de Validação do modelo. ....	132
<b>Tabela 4.14.</b> Distribuição do tamanho de partículas, <i>span</i> e uniformidade das micropartículas de conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> para a Validação do modelo estatístico. ....	135
<b>Tabela 5.1.</b> Umidades de equilíbrio dos pós dos conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> produzidos pelo processo de <i>spray drying</i> utilizando MD20 como material de parede. ....	153

<b>Tabela 5.2.</b> Parâmetros estimados pelos modelos de GAB e BET para os pós dos conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> microencapsulados por <i>spray drying</i> utilizando MD20 como material de parede.....	140
<b>Tabela 5.3.</b> Umidades de equilíbrio dos pós dos conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> produzidos pelo processo de <i>spray drying</i> utilizando MD20 como material de parede, da amostra controle e do PCT.....	146
<b>Tabela 5.4</b> Parâmetros estimados pelos modelos de BET, GAB, Halsey e Peleg para os pós dos conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> .....	147

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1. 1</b> Diagrama esquemático da configuração de um <i>spray dryer</i> .....	28
<b>Figura 1. 2.</b> Fatores que afetam a secagem por <i>spray drying</i> .....	29
<b>Figura 2.1.</b> Esquema do <i>spray dryer</i> (LM MSD 1.0, LabMaq) utilizado neste trabalho. ....	51
<b>Figura 2. 2.</b> Resíduo líquido coletado abaixo da câmara de atomização - Experimento 2.....	58
<b>Figura 2.3.</b> Germinação dos conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> microencapsulados – Experimento 5. ....	60
<b>Figura 2.4.</b> Microscopia óptica dos tratamentos secos em <i>spray dryer</i> sem adição de agente encapsulante. ....	63
Figura 2.5. Microscopia óptica dos tratamentos secos em <i>spray dryer</i> utilizando sacarose como agente encapsulante. ....	63
<b>Figura 3.1.</b> Conídios viáveis e percentual de sobrevivência dos conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> em função da temperatura de entrada do ar de secagem na câmara do <i>spray dryer</i> - Experimentos controle (sem adição de material de parede). ....	76
<b>Figura 3.2.</b> Conídios viáveis e percentual de sobrevivência dos conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> com diferentes materiais de parede (1:5 massa seca de conídios/massa seca de material de parede) após o processo de microencapsulação por <i>spray drying</i> com a temperatura de 90 °C. ....	81
<b>Figura 3.3.</b> Micrografias eletrônicas de varredura de micropartículas secas por <i>spray drying</i> (fotos tiradas a 9000 x): a) controle; b) <i>spray dryer</i> SU; c) <i>spray dryer</i> MD20; d) <i>spray dryer</i> GA; e) <i>spray dryer</i> WH; f) <i>spray dryer</i> LA.....	84
<b>Figura 4. 1</b> Valores preditos versus resíduos para a variável resposta rendimento de secagem. ....	107
Figura 4. 2. Valores preditos versus resíduos para a variável resposta umidade. ....	110
Figura 4. 3. Valores preditos versus resíduos para a variável resposta conídios viáveis. ....	112
<b>Figura 4.4.</b> Valores preditos versus resíduos para a variável resposta percentual de sobrevivência dos conídios microencapsulados.....	114
<b>Figura 4.5.</b> Germinação dos conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> microencapsulados por diferentes condições experimentais definidas pelo PCC utilizando maltodextrina DE20 como material de parede (Experimentos 1 a 11). ....	116
<b>Figura 4.6.</b> Unidades formadoras de colônia das suspensões de conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> utilizadas para preparação das formulações microencapsuladas no planejamento composto central. ....	117
<b>Figura 4.7.</b> Unidades formadoras de colônia das micropartículas de conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> obtidas por diferentes condições experimentais definidas pelo planejamento composto central utilizando maltodextrina DE20 como material de parede. ....	118
<b>Figura 4.8.</b> Microscopia eletrônica de varredura para as micropartículas de conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> microencapsuladas por <i>spray drying</i> utilizando maltodextrina DE20 como material de parede no planejamento composto central (Experimentos 1 ao 6).....	119
<b>Figura 4.9.</b> Microscopia eletrônica de varredura para as micropartículas de conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> microencapsuladas por <i>spray drying</i> utilizando maltodextrina DE20 como material de parede no planejamento composto central (Experimentos 7 ao 11).....	120
<b>Figura 4.10.</b> Distribuição do tamanho de partículas das micropartículas de conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> para o PCC.....	119
<b>Figura 4.11.</b> Superfície de resposta para o rendimento de secagem do processo de microencapsulação dos conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> por <i>spray drying</i> em função das variáveis temperatura de entrada do ar de secagem e concentração de maltodextrina DE20. ....	126

<b>Figura 4.12.</b> Superfície de resposta para a umidade das micropartículas de conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> microencapsulados por <i>spray drying</i> em função das variáveis temperatura de entrada do ar de secagem e concentração de maltodextrina DE20. ....	127
<b>Figura 4.13.</b> Superfície de resposta para o percentual de conídios viáveis após o processo de microencapsulação por <i>spray drying</i> em função das variáveis temperatura de entrada do ar de secagem e concentração de maltodextrina DE20. ....	128
<b>Figura 4.14.</b> Superfície de resposta para percentual de sobrevivência dos conídios após o processo de microencapsulação por <i>spray drying</i> em função das variáveis temperatura de entrada do ar de secagem e concentração de maltodextrina DE20. ....	129
<b>Figura 4.15.</b> Curvas de contorno para o percentual de umidade, conídios viáveis e percentual de sobrevivência para o planejamento composto central. ....	129
<b>Figura 4.16.</b> Região selecionada por meio das curvas de contorno para os melhores valores de umidade, conídios viáveis e percentual de sobrevivência dos resultados do planejamento composto central utilizando MD20 como material de parede. ....	130
<b>Figura 4.17.</b> Germinação dos conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> microencapsulados por <i>spray drying</i> utilizando maltodextrina DE20 como material de parede para o ensaio de Validação. ....	132
<b>Figura 4.18.</b> Unidades formadoras de colônia dos conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> microencapsulados por <i>spray drying</i> utilizando maltodextrina DE20 como material de parede para o ensaio de validação. ....	133
<b>Figura 4.19.</b> Microscopia eletrônica de varredura para as micropartículas de conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> microencapsuladas por <i>spray drying</i> utilizando maltodextrina DE20 como material de parede na validação do modelo estatístico. Aproximação de 3.00 KX e 9.00 K. ....	134
<b>Figura 4.20.</b> Microscopia eletrônica de varredura para as micropartículas de conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> microencapsuladas por <i>spray drying</i> utilizando Maltodextrina DE20 como material de parede na validação do modelo estatístico. Aproximação de 20.00 KX. ....	134
<b>Figura 4.21.</b> Distribuição do tamanho de partícula das micropartículas de conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> para o ensaio de Validação do modelo estatístico. Validação - $T_e = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $[\text{MS Ta/MS MD20}] = 1: 4,5$ . ....	136
<b>Figura 5. 1</b> Acondicionamento das sementes de soja em embalagens de plástico. ....	146
<b>Figura 5.2.</b> Germinação dos conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> ao longo do tempo: a) $4^{\circ}\text{C}$ b) $25^{\circ}\text{C}$ . ....	141
<b>Figura 5.3.</b> UFC dos conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> ao longo do tempo. a) $4^{\circ}\text{C}$ b) $25^{\circ}\text{C}$ . ....	142
<b>Figura 5.4.</b> UFC dos conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> dos tratamentos ao longo do tempo após o tratamento das sementes de soja. ....	145
<b>Figura 5.5.</b> Modelo de BET para as isotermas de adsorção à $25^{\circ}\text{C}$ para o pó dos conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> microencapsulados por <i>spray drying</i> utilizando MD20 como material de parede. ....	150
<b>Figura 5.6.</b> Modelo de GAB para as isotermas de adsorção à $25^{\circ}\text{C}$ para a amostra controle. ....	150
<b>Figura 5.7.</b> Modelo de GAB para as isotermas de adsorção à $25^{\circ}\text{C}$ para o PCT. ....	151

## SUMÁRIO

<b>DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO.....</b>	<b>i</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>20</b>
1.1    Produção de alimentos e uso de agrotóxicos na agricultura.....	20
1.2    Controle biológico de doenças de plantas .....	21
1.3 <i>Trichoderma asperellum</i> .....	22
1.3.1    Formulação de produtos à base <i>Trichoderma</i> para Biocontrole.....	24
1.4    Microencapsulação.....	25
1.4.1    Microencapsulação de agentes biológicos .....	26
1.4.2    Tratamento de sementes (TS).....	27
1.4.3    Microencapsulação por spray drying .....	27
1.5    Materiais de parede .....	29
1.5.1    Sacarose.....	31
1.5.2    Maltodextrina .....	31
1.5.3    Goma arábica.....	32
1.5.4    Soro de leite.....	32
1.5.5    Lactose .....	33
1.6    Referências.....	34
<b>CAPÍTULO 2 - MICROENCAPSULAÇÃO DOS CONÍDIOS DE <i>TRICHODERMA ASPERELLUM</i> POR <i>SPRAY DRYING</i> UTILIZANDO SACAROSE COMO MATERIAL DE PAREDE .....</b>	<b>49</b>
2.1    Introdução .....	49
2.2    Material e Métodos.....	50
2.2.1    Suspensão de conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> .....	50
2.2.2    Material de parede.....	50
2.2.3    Microencapsulação por <i>spray drying</i> .....	50
2.2.4    Análises físico-químicas, microbiológicas e rendimento de secagem .....	53
2.3    Resultados e discussão .....	56
2.3.1    Análises físico-químicas, microbiológicas e rendimento de secagem .....	56
2.4    Considerações finais.....	65
2.5    Referências.....	66
<b>CAPÍTULO 3 - AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA DE LETALIDADE E USO DE DIFERENTES MATERIAIS DE PAREDE NO PROCESSO DE</b>	



**MICROENCAPSULAÇÃO DE CONÍDIOS DE *TRICHODERMA ASPERELLUM* POR *SPRAY DRYING* ..... 70**

3.1	Introdução .....	70
3.2	Material e Métodos.....	71
3.2.1	Suspensão de conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> e materiais de parede.....	71
3.2.2	Estudo da temperatura de letalidade.....	72
3.2.3	Ensaio de caracterização dos materiais de parede, suspensão dos conídios e micropartículas de conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> obtidas pelo processo de <i>spray drying</i> .....	73
3.3.1	Estudo da temperatura de letalidade dos conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> secos em <i>spray drying</i> sem materiais de parede .....	75
3.3.2	Caracterização dos materiais de parede utilizados no processo de microencapsulação e das micropartículas de conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> obtidas por <i>spray drying</i> .....	76
3.4	Considerações finais.....	86
3.5	Referências.....	87

**CAPÍTULO 4: OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE MICROENCAPSULAÇÃO DOS CONÍDIOS DE *TRICHODERMA ASPERELLUM* POR *SPRAY DRYING*..... 100**

4.1	Introdução .....	100
4.2	Material e Métodos.....	101
4.2.1	Suspensão de conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> e material de parede .....	101
4.2.2	Microencapsulação por <i>spray drying</i> .....	101
4.2.3	Otimização do processo e validação experimental.....	102
4.2.4	Ensaio de caracterização da suspensão dos conídios e das micropartículas .....	103
4.3	Resultados .....	104
4.3.1	Planejamento composto central.....	104
4.3.2	Análises microbiológicas .....	115
4.3.3	Otimização do processo .....	125
4.3.4	Validação do modelo estatístico.....	130
4.4	Considerações finais.....	137
4.5	Rerefências.....	139

**CAPÍTULO 5: AVALIAÇÃO DO EFEITO DE ARMAZENAMENTO DE PÓS DE CONÍDIOS DE *Trichoderma asperellum* PRODUZIDOS POR *SPRAY DRYING*..... 142**

5.1	Introdução .....	142
5.2	Material e métodos.....	144
5.2.1	Suspensão de conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> e material de parede .....	144
5.2.2	Produção das micropartículas e material controle em pó.....	144
5.2.3	Análises físico-químicas e microbiológicas .....	144

5.2.5 Tratamento de sementes de soja: efeitos do armazenamento na viabilidade dos conídios microencapsulados .....	145
5.2.6 Isotermas de adsorção .....	147
5.3 Resultados e discussão .....	148
5.3.1 Viabilidade dos conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> após secagem por <i>spray drying</i> e durante o período de armazenamento.....	148
5.3.2 Tratamento de sementes de soja: efeitos do armazenamento na viabilidade dos conídios microencapsulados .....	151
5.3.3 Isotermas de adsorção do pó dos conídios microencapsulados por <i>spray drying</i> .....	153
5.4 Considerações finais.....	160
5.5 Referências .....	161
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>172</b>
<b>PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>174</b>

## DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

### MICROENCAPSULAÇÃO DE CONÍDIOS DE *Trichoderma asperellum* POR *SPRAY DRYING* PARA A PRODUÇÃO DE FUNGICIDA MICROBIOLÓGICO

#### Por quê?

- Estratégia para a formulação de fungicidas para controle biológico, com o objetivo de gerar sustentabilidade pela redução do uso de inseticidas e fungicidas químicos na agricultura.
- Aumentar a estabilidade dos fungicidas microbiológicos durante o processo de secagem e ao longo do tempo e protegê-los das condições do ambiente.

#### Quem já fez?

- Há poucos trabalhos na literatura sobre a microencapsulação dos conídios do gênero *Trichoderma spp.* por *spray drying*, não havendo publicação de artigo científico sobre a microencapsulação dos conídios da espécie *Trichoderma asperellum*.
- Há trabalhos com outros microrganismos (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Bifidocacterium lactis*, etc.).

#### Hipóteses

- É possível desidratar as suspensões de conídios de *Trichoderma asperellum* de forma eficiente e superior a outros métodos industriais de secagem.
- A adição de materiais de parede na suspensão de conídios de *Trichoderma asperellum* fornece uma barreira física ao calor durante o processo de secagem, possibilitando maior sobrevivência dos conídios.
- É possível aumentar a vida de prateleira e proteger os conídios de agentes do ambiente, como luz, umidade, oxigênio e produtos químicos, utilizando a técnica de microencapsulação por *spray drying*.

#### Metodologia experimental

- Microencapsulação dos conídios de *Trichoderma asperellum* por *spray drying*.

- Estudo e determinação das variáveis operacionais significativas no processo.
- Uso de diferentes materiais de parede e concentrações.
- Avaliação das características físico-químicas e microbiológicas dos conídios antes e após o processo de microencapsulação por *spray drying*.
- Avaliação da vida de prateleira das micropartículas produzidas.

### **Respostas**

- Quantidade de conídios viáveis;
- Percentual de sobrevivência dos conídios;
- Umidade, higroscopicidade, atividade de água e solubilidade em água das micropartículas;
- Variáveis significativas;
- Condições viáveis de estudo;
- Equação do modelo;
- Otimização do processo;
- Validação do modelo estatístico;
- Microscopia eletrônica de varredura;
- Distribuição do tamanho de partículas;
- Vida de prateleira;
- Viabilidade dos conídios após tratamento de sementes;
- Isotermas de sorção de umidade.

## INTRODUÇÃO

A proteção de plantas contra doenças por meio da aplicação de inseticidas e fungicidas químicos apresenta vantagens, como simplicidade de aplicação, necessidade de pouco entendimento dos processos do agrossistema e longa vida de prateleira dos produtos. Devido a tais conveniências a comercialização dos produtos químicos é facilitada, estes que quando não utilizados de forma correta agem interferindo no desequilíbrio do ecossistema (CARVALHO, 2006; AKTAR et al., 2009; POPP et al., 2013).

Entretanto, atualmente a população mundial está cada vez mais preocupada com o meio ambiente e com a pureza dos alimentos. Desta forma, métodos alternativos que visam sustentabilidade ambiental têm sido propostos na agricultura em substituição ou associação ao emprego de produtos químicos para o controle de doenças em plantações de alimentos, entre os quais o controle biológico tem apresentado destaque (HAWKINS et al., 1993; GURR, WRATTEN, 2000; CARVALHO, 2006).

*Trichoderma spp.* compreende fungos de reprodução assexuada e que apresentam potencial para promoção de crescimento vegetal (JALALI et al., 2017). Possuem as espécies mais utilizadas para controle de fitopatógenos (MONTE, 2001). O potencial das espécies como agentes de controle biológico de doenças em plantas foi reconhecido em meados de 1930 (WEINDLING, 1932), sendo que diversos autores relataram nos anos subsequentes sua utilização, fato que propiciou o início da produção comercial de várias espécies de *Trichoderma*.

Como desvantagem, os produtos formulados com *Trichoderma* apresentam reduzida vida de prateleira e baixa viabilidade do agente biológico durante o armazenamento e aplicação no campo. Devido a este fato, a microencapsulação torna-se uma ferramenta importante de estudo para prolongar a vida útil do produto, controlando sua liberação e protegendo-o de agentes externos.

A microencapsulação consiste em um processo no qual se pode fornecer uma barreira física entre os conídios do *Trichoderma asperellum* e os outros componentes do produto ou do meio externo, tais como umidade, oxigênio e calor. A microencapsulação de agentes biológicos tem sido apontada como uma alternativa valiosa para produzir bioformulações eficazes na agricultura, que garantam principalmente maior vida de prateleira e estabilidade dos produtos. Segundo Dziezak (1988) a técnica de microencapsulação por atomização vem sendo utilizada desde 1860. E além de ser a mais comum é também a de menor custo e a mais consolidada.

Apesar do seu uso consolidado, estudos da microencapsulação de *Trichoderma spp.* por *spray drying* são escassos, nenhum artigo científico a respeito da espécie do fungo *Trichoderma asperellum* está disponível, sendo portanto importante e necessário conhecer a viabilidade do fungo durante o processo.

Sendo assim, o objetivo geral deste trabalho foi estudar o processo de microencapsulação de conídios de *Trichoderma asperellum* por *spray drying*.

Para um melhor entendimento deste estudo os resultados foram divididos em quatro capítulos de resultados. Sendo os objetivos específicos do Capítulo 2:

- Estudar as condições operacionais do *spray dryer* utilizando sacarose como material de parede, e também avaliar variações na concentração do mesmo, com o objetivo de identificar as variáveis e regiões viáveis para a realização dos próximos ensaios.

Os objetivos específicos do Capítulo 3 foram:

- Estudar a temperatura de letalidade dos conídios de *Trichoderma asperellum* durante o processo de *spray drying* sem adição de material de parede;
- Caracterizar diferentes materiais de parede e avaliar o potencial de aplicação desses agentes na microencapsulação dos conídios de *Trichoderma asperellum* por *spray drying*.

Os objetivos específicos do Capítulo 4 foram:

- Utilizando o Planejamento Composto Central otimizar e validar o modelo estatístico obtido para representar o processo de microencapsulação dos conídios de *Trichoderma asperellum* por *spray drying* utilizando maltodextrina DE20 como agente encapsulante;
- Caracterizar as micropartículas produzidas por testes de umidade, atividade de água, solubilidade em água, higroscopicidade, conídios viáveis, percentual de sobrevivência, microscopia ótica, microscopia eletrônica de varredura e distribuição do tamanho de partículas.

Os objetivos específicos do Capítulo 5 foram:

- Avaliar a vida de prateleira dos conídios microencapsulados por *spray drying*, utilizando a amostra do teste de validação (Capítulo 4);
- Avaliar o comportamento das isoterms de sorção de umidade dos conídios de *Trichoderma asperellum* microencapsulados, utilizando a amostra do teste de validação (Capítulo 4) e comparar os resultados com uma amostra controle e um produto comercial;

- Avaliar o uso dos conídios microencapsulados no tratamento de sementes de soja tratadas quimicamente e sem tratamento, com o intuito de averiguar a resistência dos conídios aos produtos químicos e ao armazenamento ao longo do tempo, utilizando a amostra do teste de validação (Capítulo 4).

## CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 Produção de alimentos e uso de agrotóxicos na agricultura

A população mundial cresceu de 2,5 bilhões em 1950 (Carvalho, 2006) para 7,6 bilhões no ano de 2017 (ONU, 2017). E de acordo com estimativas da Organização das Nações Unidas (ONU) em 2050 a população será de 9,1 bilhões (ONU, 2017).

O aumento acelerado da população pode causar problemas como a fome e a falta de alimentos saudáveis para o consumo. Nas últimas décadas foram feitos diversos estudos para melhorar as condições nutricionais e de segurança alimentar das populações (OERKE et al., 1994), no entanto dados da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) (FAO, 2005) mostram que tal progresso varia de acordo com o desenvolvimento do país, e as causas podem ser explicadas devido a conflitos regionais, problemas políticos, escassez de água, dentre outros. O potencial de produção das culturas é frequentemente associado também a fatores como manejo melhorado de água e solo, fertilização e controle de pragas e doenças nas plantas (ORKE et al., 1994; POPP et al., 2013).

O uso excessivo de agrotóxicos na agricultura para o controle de doenças de plantas tem originado diversos problemas, tanto para o meio ambiente como para os seres humanos. A contaminação de alimentos, solo e água são um dos principais motivos que podem ser destacados (CARVALHO, 2006; POPP et al., 2013). A grande utilização destes materiais está associada à sua simplicidade de aplicação, vida de prateleira prolongada e alta eficiência no combate de agentes causadores de doenças em plantas (CARVALHO, 2006; AKTAR et al., 2009; POPP et al., 2013).

Nas últimas décadas a sociedade mundial passou a ter grande preocupação com os impactos causados pelo uso dos agrotóxicos no meio ambiente e pela contaminação de alimentos. Tal fato fez com que no cenário agrônomo se desenvolvesse novos mecanismos de ação e se iniciasse novos mercados. Assim, o plantio de alimentos sem agrotóxicos, e o conceito dos alimentos orgânicos começaram a ser mais difundidos, bem como a implantação de selos de garantia, indicando que o uso do agrotóxico tinha sido feito, porém de forma adequada. Dentre esses métodos, o controle biológico tem sido muito discutido atualmente como medida para reduzir o uso de agrotóxicos (POPP et al., 2013).



## 1.2 Controle biológico de doenças de plantas

Métodos alternativos têm sido propostos na agricultura em substituição ou associação ao emprego de produtos químicos para o controle de pragas em plantações de alimentos, entre os quais o controle biológico tem apresentado proeminência (BARKER, 2003; WARD et al., 2012).

O controle biológico é uma necessidade urgente. A utilização de biopesticidas causa importantes benefícios à sociedade comparados com pesticidas químicos (WAAGE, 1997; POPP et al, 2013).

Muitos estudos já foram apresentados sobre os princípios, vantagens e desvantagens do controle biológico (HOKKANE, 1985; WAAGE, 1997; GURR & WRATTEN, 2000; POPP et al., 2013; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2013; CARVALHO et al, 2014; MA et al., 2015; BAE et al., 2016; SAWANT et al., 2017). Segundo Gurr e Wratten (2000) o controle biológico de ervas daninhas e doenças em plantas é não poluente e economicamente viável quando executado de forma correta.

Monteiro (2013) e Pearson & Callaway (2003) destacam que o fato do controle biológico poder ser associado a outros métodos de controle e não deixar resíduos nos alimentos é sem dúvidas uma das maiores vantagens do método, constituindo-se assim uma importante alternativa para atender o mercado de produtos e alimentos livres de resíduos de produtos químicos.

Uma das principais limitações do uso do controle biológico é a demora para suprimir as pragas presentes nas lavouras em comparação com os fungicidas e inseticidas químicos, sendo que os organismos parasitados podem sobreviver por vários dias, enquanto que os fungicidas e inseticidas químicos têm uma ação rápida, e apresentam um nível confiável e alto de mortalidade quando não há resistência dos microrganismos (BALE et al., 2008). Além disso, a vida de prateleira dos produtos biológicos é inferior aos químicos, fato que pode dificultar a comercialização destes (SRIRAM et al., 2011; JIN, CUSTIS, 2011; MUÑOZ-CELAYA et al., 2012; LOCATELLI et al., 2018).

Segundo Benítezet et al. (2004) a combinação de controle biológico com níveis reduzidos de fungicida, também conhecido como controle integrado, promove maior redução das doenças, em comparação com o controle feito apenas com fungicida. Os biopesticidas têm como vantagem também um menor tempo para desenvolvimento e registro em órgãos específicos, como o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Instituto

Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em média de 3 a 6 anos, enquanto que o período para desenvolver e registrar um pesticida sintético é em média de 10 anos (REBECA, 2007).

Atualmente, alguns dos principais fabricantes de pesticidas do mundo estão investindo em produção de biopesticidas. Esta popularização e reconhecimento é em grande parte devido à exigência de grandes compradores de alimentos que solicitam que os fornecedores façam uso de práticas sustentáveis de produção (POPP et al., 2013).

Dentre as principais espécies de microrganismos que se destacam como biofungicidas têm-se: *Bacillus spp.* (CHEN et al., 2016; CHINHEYA, YOBO, LAING, 2017; MALAIKOZHUNDAN, VINODHINI, 2018), *Trichoderma spp.* (BAEK, HOWELL, KENERLEY, 1999; CARVALHO et al., 2014; BAE et al., 2016), *Azospirillum spp.* (GUERRERO-MOLINA, WINIK, PEDRAZA, 2012; HUNGRIA, NOGUEIRA, ARAUJO, 2016; SANTOS et al., 2017), *Metarhizium spp.* (WASSERMANN et al., 2016; ALKHAIBARI et al., 2018 ; VIVIEN KRELL et al., 2018), *Beauveria spp.* (POIDATZ, PLANTEY, THIÉRY, 2018; BARTA, 2018; YUAN et al., 2018) e *Lecanicillium* (GHAFARI et al., 2017 ; KUMAR et al., 2018 ; KEPPANAN et al., 2018).

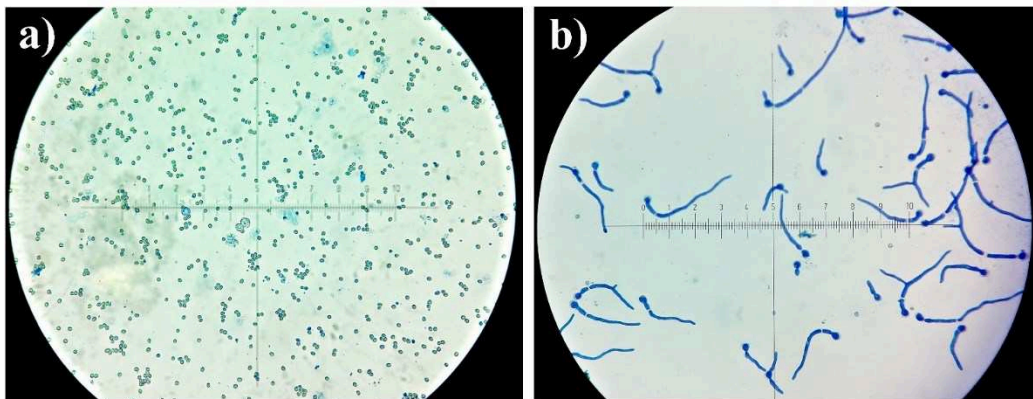
### **1.3 *Trichoderma asperellum***

*Trichoderma spp.*, compreende fungos de reprodução assexuada. São encontrados normalmente em solos de regiões de clima tropical e temperado (MACHADO et al., 2012). Apresentam potencial para promoção de crescimento vegetal (ORTEGA-GARCÍA et al., 2015; JALALI et al., 2017; ZHAO et al., 2017) e possuem as espécies mais utilizadas para controle de fitopatógenos (GAJERA et al., 2016; EL-DEBAIKY et al., 2017; SHARMA et al., 2017; HIRPARA et al., 2017), fato que pode ser explicado por serem encontrados em uma grande variedade de ambientes, apresentarem facilidade de cultivo e rápido desenvolvimento em diversos substratos (PAPAVIZAS et al., 1982; MENDOZA-MENDOZA et al., 2018). Segundo Monte (2001) o bom desempenho das espécies de *Trichoderma* no controle biológico também está ligado à sua capacidade reprodutiva, possibilidade de modificar a rizosfera e poder se adaptar em ambientes com condições variadas.

As colônias de *Trichoderma spp.* costumam crescer rapidamente em meio de cultura, apresentando inicialmente coloração bege clara, com o passar dos dias são formados flocos e a cor verde, a qual é característica das colônias, torna-se predominante. Os vários tons de verde normalmente variam de acordo com a pigmentação e a quantidade de conídios produzidos. O

micélio é formado por hifas hialinas com ramificações e parede lisa. A maioria das espécies apresentam clamidósporos em meio às hifas ou em posição terminal. O lado reverso das colônias é muitas vezes incolor ou amarelado (HOWELL, 2003). Na Figura 1.1 a) são apresentados os conídios de *Trichoderma asperellum* e em b) as hifas hialinas após a germinação dos conídios.

**Figura 1.1.** Microscopia óptica dos conídios de *Trichoderma asperellum* antes (a) e após germinação (b).



Fonte: Autoria própria.

O potencial das espécies de *Trichoderma* como agentes de controle biológico de doenças em plantas foi reconhecido em meados de 1930 (WEINDLING, 1932), diversos autores relataram nos anos subsequentes sua utilização (CHET, 1987; BAEK, HOWELL, KENERLEY, 1999; JIN, HARMAN, TAYLOR, 1991; HOWELL, 2003 CARVALHO et al., 2014; BAE et al., 2016, SAWANT, 2017 ; Cologna et al., 2018.). *Trichoderma asperellum* é uma espécie de fungo do gênero *Trichoderma*. Esta espécie possui como alvos biológicos principais o *Fusarium spp.* (LI et al., 2017), *Rhizoctonia solani* (TRILLAS et al., 2006; FRANÇA et al., 2015), *Sclerotinia sclerotiorum* (MORANDI et al., 2009; VINODKUMAR et al., 2017) e *Phytophthora ramorum* (WIDMER et al., 2018).

De acordo com Machado et al. (2012) algumas linhagens de *Trichoderma spp.* apresentam diferentes ações, como parasitismo, antibiose e competição, agindo também como indutores de resistência das plantas contra doenças. Segundo Chet e Hadar (1997) a vantagem de utilizar *Trichoderma* para controlar microrganismos é a coordenação de vários mecanismos ao mesmo tempo, sendo a competição de nutrientes um dos mais importantes, uma vez que a maior parte dos microrganismos são sensíveis à falta de nutrição e fungos do gênero *Trichoderma* têm grande facilidade para mobilizar e absorver nutrientes do solo em comparação com outros microrganismos. Os mecanismos de antagonismo mais utilizados pelos

*Trichoderma spp.* são produção de antibióticos difusíveis e/ou voláteis, micoparasitismo, enzimas hidrolíticas como a quitinase e competição por espaços e nutrientes (SCHIRMBOCK et al., 1994; KUBICEK et al., 2001). Registros toxicológicos demonstram que o fungo *Trichoderma asperellum* não é tóxico, infeccioso ou patogênico aos mamíferos (BARSOUM et al., 2010). Um importante produto do metabolismo secundário deste fungo são os peptaibóis, que representam um grupo de peptídeos antibióticos caracterizado pela presença de aminoácidos não-proteinogênicos tais como a  $\alpha$ -aminoisobutirato (Aib), bem como por modificações N-terminais e aminoácidos na região C-terminal (BRITO et al., 2014). Alguns estudos têm indicado a melhoria da saúde e crescimento das plantas com a presença de peptaibóis (HOITINK et al., 2006).

### 1.3.1 Formulação de produtos à base *Trichoderma* para Biocontrole

Os *Trichodermas spp.* produzem três tipos de propágulos que podem ser utilizados nas formulações de biofungicidas: hifas, clamidósporos e conídios. Os conídios e clamidósporos podem suportar condições ambientais variáveis, por isso são os mais utilizados (PAPAVIZAS, 1985). Além disso, as hifas apresentam baixa resistência à desidratação, processo importante para prolongar a vida de prateleira dos produtos (JIN, HAYES & TAYLOR, 1991).

O uso do fungo *Trichoderma* para o controle de doenças de plantas proporciona sustentabilidade ambiental e da agricultura (CUMAGUN, 2012). Segundo Harman et al. (1991) o desenvolvimento de produtos para o controle biológico depende da identificação de um agente promissor de biocontrole e da produção de propágulos com alta viabilidade de ação. Além disso, a produção deve ser econômica, ser preservada contra contaminação, ter baixa disponibilidade de água e longa vida de prateleira. Portanto, a produção e formulação do produto à base de *Trichoderma* devem ser feitas de forma a garantir a estabilidade do produto ao longo do tempo, desde a produção até a sua aplicação (HARMAN, 1991; HOWELL, 2003). É sabido que nem sempre é possível que um produto apresente todas essas características desejáveis, todavia se este fosse alcançado seria considerado um produto ideal (HARMAN, 1991).

Existem dois tipos de formulação para os bioprodutos à base de *Trichoderma*, em forma sólida e em forma líquida (WHIPPS, 1997) e ambas precisam adquirir maior estabilidade ao longo do tempo (JIN et al., 1991). Dentre as técnicas de secagem de microrganismos a atomização é uma das mais utilizadas, por apresentar desidratação eficiente e baixo custo comparado a outros métodos (MORGAN et al., 2006; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, 2013).

Um dos problemas associados aos produtos formulados com *Trichoderma*, líquidos e sólidos, é a baixa viabilidade do agente biológico durante o armazenamento e aplicação no campo, uma vez que são microrganismos vivos e fatores climáticos afetam sua sobrevivência. Devido a este fato, a microencapsulação vem sendo estudada para prolongar a vida útil, controlar a liberação do microrganismo e protegê-lo de agentes do ambiente, e dessa forma melhorar seu desempenho (JOHN et al., 2011; JIN, CUSTIS, 2011).

#### 1.4 Microencapsulação

A microencapsulação consiste em um processo que pode fornecer uma barreira física entre o composto do núcleo e os outros componentes do produto ou do meio externo. É uma técnica em que gotículas líquidas, partículas sólidas ou compostos de gás são presos em filmes finos, que podem apresentar uma matriz homogênea ou heterogênea (GHARSALLAOUI et al., 2007). O núcleo e o material de parede podem ser compostos de apenas um ou vários ingredientes e a retenção desses núcleos é determinada por sua funcionalidade química, solubilidade, polaridade e volatilidade (SHAHIDI, HAN, 1993; ; FAVARO-TRINDADE, 2008). Ixtaina et al. (2015) destacam que um dos objetivos da microencapsulação é isolar a substância de interesse, protegendo-a de certas condições do ambiente, dessa forma adquirindo o aumento de vida útil do produto.

Compostos aromáticos (MATOS et al., 2018; ARSHAD, ALI, HASNAIN, 2018), pigmentos (COMUNIAN, 2011; JANISZEWSKA-TURAK, 2017), óleos (SANTOS et al., 2015; BRAGA, 2015), enzimas (ANJANI, KAILASAPATHY, PHILLIPS, 2007), microrganismos probióticos (ARSLAN-TONTUL, ERBAS, 2017; SHORI, 2017), dentre outros, são exemplos de alguns produtos em que a microencapsulação foi empregada com o objetivo principal de preservação.

Dentre os objetivos e benefícios da microencapsulação de microrganismos pode-se destacar: barreira contra umidade e oxigênio; redução da higroscopicidade do material do núcleo; em condições determinadas tem-se liberação controlada e gradativa dos produtos de recheio; facilidade de manuseio e estocagem dos produtos; transformação de um composto líquido em pó; proteção das células durante o processo de secagem; proteção contra agentes químicos (DESAI, PARK, 2005).

Os métodos utilizados para microencapsulação podem ser divididos em métodos físicos, métodos físico-químicos e métodos químicos (JACKSON & LEE, 1991; Desai & Park, 2005), sendo a microencapsulação por *spray drying* um método físico, assim como *spray*

*chilling*, leite fluidizado, dentre outros (JACKSON, LEE, 1991; DESAI, PARK, 2005; FAVARO-TRINDADE et al., 2008).

O uso da microencapsulação tem sido reportado para materiais em geral. Porém, a microencapsulação de células microbianas é uma técnica recente, que visa proteger microorganismos que serão submetidos a um processo subsequente, cujas condições operacionais podem causar sua morte, como a secagem, por exemplo. Por isso, é um método que tem atraído a atenção de muitos pesquisadores e empresas.

Mortazavian et al. (2007) revisaram, por meio de um estudo bibliográfico, princípios e métodos de microencapsulação para células, em especial células probióticas, e os autores destacaram que este método é altamente eficiente para aumentar a vida de prateleira dos produtos e ajudar que os microrganismos probióticos cheguem viáveis ao intestino. Chang (1992) estudou e aplicou conceitos da engenharia genética para produzir células artificiais para microencapsular *Pseudomonas* (ATCC 23328). Para aplicação em biocontrole Hernández-Rodríguez et al. (2013) microencapsulou *Bacillus thuringiensis*, e MA et al. (2015) microencapsulou *Bacillus subtilis* (B99-2). O gênero *Trichoderma spp* foi investigado por Jin & Custis (2011) e Muñoz-Celaya et al. (2012). Todos estes autores citaram diversos benefícios da aplicação da microencapsulação nos processos investigados, com destaque especial para a vida de prateleira dos produtos.

#### **1.4.1 Microencapsulação de agentes biológicos**

Segundo Muñoz-Celaya et al. (2012) a microencapsulação de agentes biológicos é uma alternativa valiosa para produzir formulações eficazes no tratamento de sementes. De acordo com Pedreschi e Aguilera (1997) formulações fúngicas desidratadas são muito vantajosas, pois além de sua longa estabilidade, podem facilitar o manuseio e armazenamento à temperatura ambiente. O processo de secagem evita a deterioração por contaminação microbiana e induz a dormência dos conídios, fato que favorece o desenvolvimento da formulação dos produtos, além de prolongar a vida de prateleira destes.

Cypriano (2015) realizou o encapsulamento de conídios de *Metarhizium anisopliae* (*Metschnikoff*) *sorokin* formulado com óleo de Nim, visando o controle larval de *Aedes aegypti*. Larvas de *A. aegypti* foram expostas às cápsulas e após as avaliações, foi concluído que o fungo encapsulado com óleo de Nim a 10% reduziu significativamente as taxas de sobrevivência de larvas de *A. aegypti* em condições de semicampo, apresentando apenas 8,33% de sobrevivência após sete dias de avaliação.

Ching-Piao e Shan-Da (2009) microencapsularam conídios de *Beauveria bassiana* por *spray drying* utilizando diferentes polímeros, incluindo hidroxipropilmetilcelulose, quitosana, dextrina, leite desnatado e polivinilpirrolidona. Após 6 meses de armazenamento a 4°C os conídios exibiram 80% de viabilidade, utilizando uma matriz de revestimento composta por 10% de dextrina, 10% de leite desnatado e 5% de polivinilpirrolidona.

Jin e Custis (2011) utilizaram sacarose, melão e glicerol como agentes de encapsulamento de *Trichoderma harzianum*, enquanto Muñoz-Celaya et al. (2012) utilizaram maltodextrina e goma arábica. Ambos os estudos revelaram que a microencapsulação por *spray drying* foi eficiente para garantir uma melhor viabilidade dos conídios comparando-se com os conídios não encapsulados, sendo encontrados percentuais de sobrevivência acima de 80%.

#### **1.4.2 Tratamento de sementes (TS)**

O tratamento de sementes (TS) é utilizado principalmente para proteção da semente no campo, podendo ser utilizado também para favorecer seu armazenamento e transporte. Muitas tecnologias vêm sendo investigadas a fim de melhorar os processos existentes e criar novos ingredientes que melhorem a proteção das sementes. A escolha do produto é muitas vezes baseada na segurança ambiental e toxicológica do mesmo, assim como no seu custo e eficácia contra pragas e vetores que possam interferir no processo (JULIATTI, 2010).

#### **1.4.3 Microencapsulação por spray drying**

A secagem por *spray drying* ou atomização é uma operação unitária pela qual um produto líquido, solução, emulsão ou suspensão é atomizado em uma corrente de gás quente e instantaneamente se obtém um pó do material alimentado ao secador, com cerca de 2% a 5% de umidade em base úmida (MASTERS, 1997; GHARSALLAOUI, 2007). O gás mais utilizado neste processo de secagem é o ar. O pó obtido pela atomização é geralmente muito fino (10-50 µm), mas também pode apresentar partículas de tamanhos maiores (2-3 mm), dependendo das condições operacionais do equipamento e do material alimentado ao secador (GHARSALLAOUI, 2007).

O processo de *spray drying* pode ser resumido em quatro etapas, sendo elas: preparação e homogeneização da solução de alimentação, atomização do líquido na câmara do secador, desidratação da amostra por meio do contato com o ar de secagem, separação e coleta das partículas sólidas (DZIEZAK, 1988; CAL, SOLLOHUB, 2010).

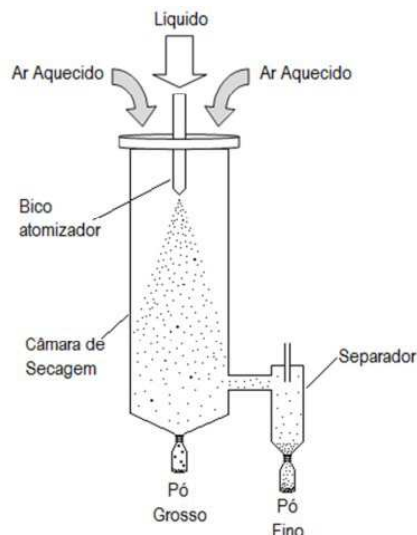
A retirada da água das soluções, também conhecido como processo de desidratação é realizado normalmente de forma contínua no *spray dryer*, ou seja, o líquido é bombeado até o bico atomizador que fica inserido dentro da câmara de secagem. Na câmara de secagem o líquido entra em contato com o ar aquecido, o fluxo de ar pode ser contracorrente, concorrente ou misto, em relação ao fluxo do líquido, isto depende da marca e modelo do equipamento (DZIEZAK, 1988; FAVARO-TRINDADE, 2008; CAL, SOLLOHUB, 2010).

A evaporação de água da gotícula inicia-se devido ao gradiente de temperatura existente dentro da câmara de secagem, onde o ar quente transfere calor para as gotículas do líquido. Esta transferência de calor causa o aumento de temperatura das gotículas, e inicia-se o processo de evaporação de água. O processo de secagem é dito finalizado quando a temperatura da gotícula se iguala à temperatura do ar de secagem (GHARSALLAOUI, 2007).

O material seco no *spray dryer* é separado do ar por um ciclone. O material resultante é um pó fino e desidratado, normalmente com baixa umidade e atividade de água (DZIEZAK, 1988; FAVARO-TRINDADE, 2008; CAL, SOLLOHUB, 2010). Com a redução de umidade e atividade de água, consegue-se maior estabilidade do produto ao longo do tempo, diminui-se o volume de material, facilitando o armazenamento, e reduz-se o risco de contaminação microbiológica e degradações químicas (GHARSALLAOUI, 2007).

A Figura 1.2 apresenta um diagrama esquemático da configuração de um *spray dryer*.

**Figura 1. 2** Diagrama esquemático da configuração de um *spray dryer*.



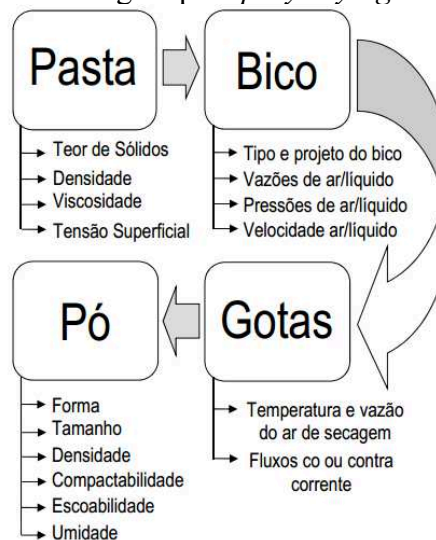
Fonte: Labmaq do Brasil Ltda (2003).



Segundo Furuta (1994) a qualidade do material resultante após a atomização depende de variáveis do atomizador, tais como temperatura de entrada e saída do ar de secagem, velocidade e vazão do ar de secagem e da alimentação da amostra ao secador.

Segundo Dziezak (1988) a técnica de microencapsulação por atomização em *spray dryer* vem sendo utilizada desde 1860. Além de ser a técnica mais comum é também a de menor custo (GHARSALLAOUI, 2007) e tem a vantagem de poder associar diferentes materiais de parede no processo (IXTAINA et al., 2015). Na Figura 1.3 estão apresentados os fatores que podem influenciar nas características do pó e na produtividade da secagem por *spray drying*.

**Figura 1. 3.** Fatores que afetam a secagem por *spray drying*.



Fonte: Labmaq do Brasil Ltda (2003).

Quando se trabalha com o processo de microencapsulação por *spray drying* a escolha do material de parede e as condições operacionais do *spray dryer* devem ser bem avaliadas, visto que tais fatores afetam a eficiência do processo (LIU et al., 2001). Das condições operacionais, o principal fator a ser investigado é a temperatura, tanto da alimentação do ar de secagem, quanto da amostra alimentada ao secador e da temperatura de saída do ar (LIU et al., 2001; ZBICINSKI et al., 2002), sendo a temperatura do ar de secagem a mais estudada, uma vez que esta pode degradar o material a ser encapsulado (GHARSALLAOUI, 2007).

### 1.5 Materiais de parede

O material de parede, agente encapsulante, ou agente carreador, como também pode ser chamado, é o composto responsável por realizar a retenção do material do núcleo no processo de microencapsulação (SHAHIDI & HAN, 1993; FAVARO-TRINDADE, 2008).

A escolha do material de parede deve ser feita baseada nas propriedades físicas e químicas do material, de seu custo, e de acordo com o processo de obtenção das micropartículas e de aplicação do produto futuramente (SUAVE et al., 2006). Para Porte et al. (2011) a escolha do material de parede é crítica, pois influenciará na estabilidade da solução/emulsão antes do processo de secagem e depois do processo, no material em pó. Além disto, as propriedades físicas e químicas do mesmo podem produzir materiais de diferentes características, como: tamanhos de partícula, morfologia, estrutura, permeabilidade, solubilidade em água, higroscopicidade, atividade de água, umidade, cor, entre outros (SUAVE et al., 2006).

De acordo com alguns autores (SUAVE et al., 2006; GHARSALLAOUI, 2007; FAVARO-TRINDADE, 2008) um material de parede ideal deve apresentar atributos como: baixa viscosidade em altas concentrações, fácil manipulação, baixa higroscopicidade, proporcionar máxima proteção ao material do núcleo durante a secagem, solubilidade em soluções utilizadas no processo, manter a estabilidade do meio ativo durante o armazenamento, liberar o material microencapsulado sob condições favoráveis, baixo custo e facilidade de obtenção. Outra característica importante dos materiais de parede, principalmente para o uso em produtos biológicos, é que sejam atóxicos e que não possibilitem reatividade com o material a ser encapsulado.

Diversos materiais têm sido reportados como materiais de parede no processo de microencapsulação, podendo destacar: carboidratos, celulosas, gomas, proteínas (SHAHIDI, HAN, 1993) e lipídios (SUAVE et al., 2006). Além do material de parede, outros materiais podem também ser utilizados como aditivos para melhorar o rendimento na secagem pela diminuição da aderência do material na parede do equipamento e também para melhorar a estabilidade do produto ou ainda controlar a liberação do núcleo. Na Tabela 1.1 estão descritos alguns dos principais materiais de parede aplicados em processo de secagem por *spray drying* e suas funcionalidades.

**Tabela 1. 1.** Materiais de parede utilizados em secagem por *spray drying*.

<b>Aditivos</b>	
Amidos modificados	Goma arábica
Maltodextrinas	Gelatinas
Glicose	Pectinas
Derivados de celulose	

Fonte: Adaptado de Masters (1997) e Favaro-Trindade (2008).

Nos próximos tópicos será apresentada uma revisão sobre os materiais de parede utilizados neste estudo.

### **1.5.1 Sacarose**

A sacarose é empregada como agente encapsulante, principalmente de aromas, devido à sua capacidade de absorver voláteis do ambiente ou retê-los fortemente durante o processo de secagem (ASTOLFI-FILHO et al., 2005). Materiais encapsulados em sacarose podem ser obtidos por diferentes métodos de microencapsulação, como *spray drying* e co-cristalização (ASTOLFI-FILHO et al., 2005; MUÑOZ-CELAYA et al., 2012).

Jin e Custis (2011) utilizaram diferentes concentrações de sacarose na microencapsulação de esporos de *Trichoderma harzianum* por *spray drying*. Seus resultados mostraram que a utilização de uma pequena quantidade de açúcar desempenharia o papel de estabilização durante a secagem por atomização em comparação com uma amostra controle (seca sem material de parede).

### **1.5.2 Maltodextrina**

A maltodextrina é um dos carboidratos mais utilizados como material de parede na formação de micropartículas. Suas principais vantagens para o processo de encapsulamento são: baixo custo, facilidade de obtenção, baixa higroscopicidade e umidade, e alta solubilidade em água (SHAHIDI, HAN, 1993; KARACA, NICKERSON, LOW, 2013).

Ma et al. (2015) estudaram maltodextrina e goma arábica como materiais de parede com o objetivo de otimizar condições para um processo de microencapsulação de *Bacillus subtilis* por *spray drying*. Foi observado pelos autores que a maltodextrina foi eficiente, principalmente em concentrações superiores a 80%, enquanto a goma arábica não afetou a taxa de sobrevivência dos microrganismos. A taxa de sobrevivência média de *B. subtilis* foi superior a 90%, realizando-se a secagem com temperatura do ar de entrada de 145°C, com um fluxo de alimentação de 550 mL/h e uma pressão de pulverização de 0,15 MPa. A taxa de sobrevivência de *B. subtilis* microencapsulado foi de 87,53% após 540 dias de armazenamento. Dessa forma supõe-se que as micropartículas de *B. subtilis* têm o potencial de se tornar um produto de biocontrole bem sucedido.

### 1.5.3 Goma arábica

A goma arábica é o material de parede mais antigo utilizado na técnica de microencapsulação, sendo considerado um dos mais importantes, cuja aplicação se estende por muitas áreas (VERBEKEN; DIERCKX; DEWETTINCK, 2003; COMUNIAN et al., 2011; SANTOS et al., 2015; BATTISTA et al., 2015). É considerada historicamente como material encapsulante por excelência, graças à sua solubilidade, baixa viscosidade, propriedades emulsificantes, sabor suave e alta estabilidade oxidativa conferida a óleos (VERBEKEN; DIERCKX; DEWETTINCK, 2003).

Muñoz-Celaya et al. (2012) estudaram a microencapsulação de conídios de *Trichoderma harzianum* em matrizes de maltodextrina DE10, maltodextrina DE20, goma arábica e uma mistura em massa de 1:1 de maltodextrina DE10 (MD10) e goma arábica (GA). O maior percentual de sobrevivência dos conídios após a etapa de microencapsulação por *spray drying* foi observado para a mistura dos polímeros MD10-GA.

### 1.5.4 Soro de leite

Nas indústrias de laticínios, muitos subprodutos são gerados. Como muitas delas não se ocupam com o seu tratamento ou redirecionamento dos resíduos, o descarte é muitas vezes a alternativa empregada. Na produção do queijo, por exemplo, obtém-se o soro de leite, sendo seus principais constituintes a lactose e proteínas solúveis. Propostas para o aproveitamento do soro de leite são de fundamental importância, pois é um subproduto que possui boa qualidade nutricional, é obtido em grande volume, e apresenta um elevado poder poluente (GIROTO & PAWLOWSKY, 2001).

O soro do leite é uma opção que tem sido avaliada como material de parede, principalmente por ser um resíduo industrial. Em estudos recentes as proteínas do leite e soro de leite tem apresentado promissora atividade para produção de micropartículas (FRASCARELI et al., 2012; BRAGA, 2015).

No trabalho de Castro-Cislaghil et al. (2012) foi observado o potencial de aplicação de soro de leite líquido em comparação com a goma arábica como material de parede de *Bifidobacterium* Bd-12 por *spray drying*. Segundo os autores o soro de leite se mostrou eficaz no processo comparando-se com a goma arábica em relação ao rendimento da microencapsulação e viabilidade das células, que se manteve elevada e constante durante doze semanas de avaliação.

### 1.5.5 Lactose

A lactose é o principal carboidrato do leite e encontra-se presente também no soro de leite, em torno de 70%. No leite integral a quantidade é menor, cerca de 5% (MORIWAC, MATIOLI, 2000).

Ixtaina et al. (2015) estudaram a microencapsulação por *spray drying* do óleo de chia utilizando lactose e caseinato de sódio como materiais de parede, sendo o objetivo do trabalho evitar a oxidação do óleo durante a estocagem, uma vez que este tipo de material é altamente suscetível à oxidação devido ao alto conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados. Os resultados mostraram que o processo de microencapsulação foi eficiente, permitindo obter alta retenção do núcleo (>90%). Além disso, em relação à estabilidade oxidativa, foi possível obter aos 400 bar, óleo de chia microencapsulado com PV b10 meq/kg de óleo após 100 dias de armazenamento a  $20 \pm 2$  °C.

## 1.6 Referências

- AKTAR, W.; SENGUPTA, D.; CHOWDHURY, A. **Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards**. *Interdisciplinary toxicology*. v. 2, p. 1–12, 2009.
- ALKHAIBARI, A.M.; MAFFEIS, T.; BULL, J.C.; BUTT, T.M. **Combined use of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium brunneum*, and the mosquito predator, *Toxorhynchites brevipalpis*, for control of mosquito larvae: Is this a risky biocontrol strategy?** *Journal of Invertebrate Pathology*, v.153, p.38-50, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.02.003>.
- ANJANI, K.; KAILASAPATHY, K.; PHILLIPS, M. **Microencapsulation of enzymes for potential application in acceleration of cheese ripening**. *International Dairy Journal*, v. 17, p.79-86, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.01.005>.
- ARSHAD, H.; ALI, T.M.; HASNAIN, A. **Native and modified Sorghum starches as wall materials in microencapsulation of nutmeg oleoresin**. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 114, p.700-709, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.082>.
- ARSLAN-TONTUL, S.; ERBAS, M. **Single and double layered microencapsulation of probiotics by spray drying and spray chilling**. *LWT - Food Science and Technology*, v. 81, p. 160-169, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.060>.
- ASTOLFI-FILHO, Z.; SOUZA, A. C.; REIPER, E. C. D.; TELIS, V. R. N. **Encapsulação de suco de maracujá por co-cristalização com sacarose: cinética de cristalização e propriedades físicas**. *Ciência e tecnologia de alimentos*. v. 25. p. 795-801, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612005000400027>.
- BAE, S.J.; MOHANTA, T.K.; CHUNG, J.Y.; RYA, M.; PARK, G.; SHIM, S.; HONG, S.B.; SEO, H.; BAE, D.W.; BAE, I.; KIM, J.J.; BAE, H. ***Trichoderma* metabolites as biological control agents against *Phytophthora* pathogens**. *Biological Control*, v. 92, January 2016, p. 128-138, 2016.

BAEK, J. M.; HOWELL, C. R.; KENERLEY, C. M. **The role of extracellular chitinase from *Trichoderma virens* Gv29-8 in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*.** *Curr. Genet.* 35: p. 41-50, 1999. <https://doi.org/10.1007/s002940050431>.

BALE, J.S.; VAN LENTEREN, J.C.; BIGLER, F. **Biological control and sustainable food production.** *Philosophical transactions of the royal society B*, v. 363, 761–776, 2008. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2182>.

BARKER, K. R. **Perspectives on plant and soil nematology.** *Annual Review of Phytopathology*, v. 41, p.1-15, 2003. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095647>.

BARSOUM, I.; KOUGH, J.; BORGES, S.; VAITUZIS, Z. **Biopesticides Registration Action Document Team.** Environmental Protection Agency, mar., 2010.

BARTA, M. **In planta bioassay on the effects of endophytic *Beauveria* strains against larvae of horse-chestnut leaf miner (*Cameraria ohridella*).** *Biological Control*, v.121, p. 88-98, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.02.013>.

BATTISTA, C.A.D.; CONSTENLA, D.; RAMÍREZ-RIGO, M.V.; PIÑA, J. **The use of arabic gum, maltodextrin and surfactants in the microencapsulation of phytosterols by spray drying.** *Powder Technology*, v. 286, p. 193-201, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2015.08.016>.

BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A.M.; LIMÓN, M.C. E CODÓN, A.C. **Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains.** *International Microbiology*, v. 7, p. 249-257, 2004.

BRAGA, A. B. A. C. **Estudo de constituintes do leite e soro de leite como materiais de parede no processo de microencapsulação por coacervação complexa.** Trabalho de conclusão de curso (Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia Química. Universidade Federal de Uberlândia, 2015.

BRITO, J. P. C.; RAMADA, M. H. S.; MAGALHÃES, M. T. Q.; SILVA, L. P.; ULHOA, C. **J. Peptaibols from *Trichoderma asperellum* TR356 Strain isolated from Brazilian soil.** SpringerOpen Journal, 2014.

CAL, K.; SOLLOHUB, K. **Spray drying technique I: Hardware and Process Parameter.** Journal of Pharmaceutical Sciences. v. 99, 2, p. 575-586, 2010. CARVALHO, A.S. et al. **Effects of various sugars added to growth and drying media upon thermotolerance and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii spp bulgaricus*.** Biotechnology Progress, v.20, p.248-254, 2004.

CARVALHO, F. P. **Agriculture, pesticides, food security and food safety.** Environmental Science & Policy, v. 9, p. 685-290, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.envsci.2006.08.002>.

CARVALHO, D. D. C.; JUNIOR, M. L.; MARTINS, I.; INGLIS, P.W.; MELLO, S.C.M. **Biological control of *Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli* by *Trichoderma harzianum* and its use for common bean seed treatment.** Tropical Plant Pathology, v. 39(5), p. 384-391, 2014. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762014000500005>.

CASTRO-CISLAGHIL, F. P.; FRITZEN-FREIRE, C, B.; SANT'ANNA, E. S. **Potencial do soro de leite líquido como agente encapsulante de *Bifidobacterium* Bb-12 por spray drying: comparação com goma arábica.** Ciência rural, p. 1-7, 2012.

CHANG, M.C.; CHANG C.C.; CHANG J.C. **Cloning of a creatinase gene from *Pseudomonas putida* in *Escherichia coli* by using an indicator plate.** Appl Environ Microbiol, v. 58(10), p. 3437-40, 1992. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.12.021>.

CHEN, X.; ZHANG, Y.; FU, X.; LI, Y.; WANG, Q. **Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* PG12 for the biological control of apple ring rot.** Postharvest Biology and Technology, v. 115, p. 113-121, 2016.

CHET, I; INBAR, J; HADAR, I. **Fungal antagonists and mycoparasites.** In: Wicklow DT, Söderström B (eds) The Mycota IV: Environmental and microbial relationships. Springer-Verlag, Berlin, p.165-175, 1997.



CHET, I. ***Trichoderma* - Application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne pathogenic fungi.** p. 140-160 in: Innovative Approaches to Plant Disease Control. I. Chet, ed. John Wiley & Sons, New York, 1987.

CHING-PIAO, L., SHAN-DA, L. **Low-temperature spray drying for the microencapsulation of the fungus *Beauveria bassiana*.** *Drying Technology*, 27:6, p. 747-753, 2009. DOI: 10.1080/07373930902828005. <https://doi.org/10.1080/07373930902828005>.

CHINHEYA, C.C.; YOBO, K.S.; LAING, M.D. **Biological control of the rootknot nematode, *Meloidogyne javanica* (Chitwood) using *Bacillus isolates*, on soybean.** *Biological Control*, v. 109, p.37-41, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.03.009>.

COLOGNA, N.M.D ; GÓMEZ-MENDOZA, D.P.; ZANOELO, F.F.; GIANNESI, G.C.; GUIMARÃES, N.C.A.; MOREIRA, L.R.S.; FERREIRA FILHO, E.X.; RICART, C.A.O. **Exploring *Trichoderma* and *Aspergillus secretomes*:** Proteomics approaches for the identification of enzymes of biotechnological interest. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 109, p. 1-10, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.08.007>.

COMUNIAN, T. A. et al. **Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried chlorophyllide, a natural food colourant, using gum arabic, maltodextrin and soy protein isolate-based carrier systems.** *International Journal of Food Science and Technology*, v. 46, p. 1259-1265, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02617.x>.

CUMAGUN, C. J. R. **Managing plant diseases and promoting sustainability and productivity with *Trichoderma*.** *Journal of Agricultural Science and Technology*. v. 14, p. 699-714, 2012.

CYPRIANO, M. B. C. **Encapsulamento de conídios de *Metarhiziumanisopliae* (Metschnikoff) Sorokin formulado com óleo de Nim visando o controle larval de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762).** Dissertação de mestrado apresentada ao Centro de Ciências e

Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campo dos Goytacazes, 2015.

DESAI, K.G.H.; LIU, C.; PARK, H.J. **Characteristics of vitamin C immobilized particles and sodium alginate beads containing immobilized particles**. Journal of microencapsulation. v.22, n.4, p.363-376, 2005. <https://doi.org/10.1080/02652040500098861>.

DZIEZAK, J.D. **Microencapsulation and encapsulated ingredients**. Food Technology, p. 136-151, 1988.

EL-DEBAIKY, S.A. **Antagonistic studies and hyphal interactions of the new antagonist *Aspergillus piperis* against some phytopathogenic fungi in vitro in comparison with *Trichoderma harzianum***. Microbial Pathogenesis, v. 113, p. 135-143, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.10.041>.

FAO, 2005. **The State of Food Insecurity in the World 2005**. Economic and Social Department, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

FAVARO-TRINDADE, C.S.; PINHO, S.C.; ROCHA, G.A. **Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios**. Braz. J. Food Technol., v. 11, n. 2, p. 103-112, 2008.

FRANÇA, S.K.S.D.; CARDOSO, A.F.; LUSTOSA, D.C.; RAMOS, E.M.L.S.; FILIPPI, M.C.C.D.; et al. **Biocontrol of sheath blight by *Trichoderma asperellum* in tropical lowland rice**. Agronomy for Sustainable Development, Springer Verlag/EDP Sciences/INRA, v. 35 (1), p.317-324, 2015.

FRASCARELI, E. C. et al. **Effect of process conditions on the microencapsulation of coffee oil by spray drying**. Food and Bioproducts Processing, v. 90, n. 3, p. 414-416, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.12.002>.

FURUTA, T.; HAYASHI, H.; OHASHI, T. **Some criteria of spray dryer design for food liquid**. Drying Technology, v.12, n.1-2, p.151-177, 1994. <https://doi.org/10.1080/07373939408959952>.

GAJERA, H.P.; HIRPARA, D.G.; KATAKPARA,Z.A.; PATEL, S.V.; GOLAKIYA, B.A. **Molecular evolution and phylogenetic analysis of biocontrol genes acquired from SCoT polymorphism of mycoparasitic *Trichoderma koningii* inhibiting phytopathogen *Rhizoctonia solani* Kuhn.** Infection, Genetics and Evolution, v. 45, p. 383-392, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.09.026>.

GHAFFARI, S. ; KARIMI, J. ; KAMALI, S. ; MOGHADAM, E.M. **Biocontrol of *Planococcus citri* (Hemiptera: Pseudococcidae) by *Lecanicillium longisporum* and *Lecanicillium lecanii* under laboratory and greenhouse conditions.** Journal of Asia-Pacific Entomology, v.20(2), p.605-612, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2017.03.019>.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. **Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview.** Food Research International, 40, p. 1107–1121, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004>.

GIROTO, J. M; PAWLOWSKY, U. **O soro de leite e as alternativas para o seu beneficiamento.** Brasil Alimentos, p. 43-46, 2001.

GUERRERO-MOLINA, M.F.; WINIK, B.C.; PEDRAZA, R.O. **More than rhizosphere colonization of strawberry plants by *Azospirillum brasilense*.** Applied Soil Ecology, v.61, p. 205-212, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.10.011>.

GURR, G., WRATTEN, S. **Biological Control: Measures of Success.** Kluwer Academic Press, Dordrecht, 2000. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-4014-0>.

HARMAN, G. E.; JIN, X.; STASZ, T. E.; PERUZZOTTI, G.; LEOPOLD, A. C.; TAYLOR, A.G. **Production of conidial biomass of *Trichoderma harzianum* for biological control.** Biological Control, v. 1, p. 23-28, 1991. [https://doi.org/10.1016/1049-9644\(91\)90097-J](https://doi.org/10.1016/1049-9644(91)90097-J).

HAWKINS, B.A., THOMAS, M.B., HOCHBERG, M.E. **Refuge theory and biological control.** Science 262, 1429–1432, 1993. <https://doi.org/10.1126/science.262.5138.1429>.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. S.; ESCUDERO, I. R.; ASENSIO A. C.; FERRÉ, J.; CABALLERO, P. **Encapsulation of the *Bacillus thuringiensis* secreted toxins Vip3Aa and CryIIa in *Pseudomonas fluorescens***. *Biological Control*, v. 66, p. 159-165, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.05.002>.

HIRPARA, D.G.; GAJERA, H.P.; HIRAPARA, J.G.; GOLAKIYA, B.A. **Inhibition coefficient and molecular diversity of multi stress tolerant *Trichoderma* as potential biocontrol agent against *Sclerotium rolfsii* Sacc.** *Infection, Genetics and Evolution*, v. 55, p. 75-92, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.08.029>.

HOITINK, H. A. J.; MADDEN, L.V.; DORRANCE, A.E. **Systemic resistance induced by *Trichoderma* spp : Interactions Between the host, the pathogen, the biocontrol agent, and soil organic matter quality.** *Phytopathology*, v.96, p. 186-189, 2006. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0186>.

HOKKANEN, H.M.T. **Success in classical biological control.** *Crit. Rev. Plant Sci.* 3, 35–73, 1985. <https://doi.org/10.1080/07352688509382203>.

HOWELL, C. R. **Effect of *Gliocladium virens* on *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, and damping-off of cotton seedlings.** *Phytopathology*, v. 72, p. 496-498, 1982. <https://doi.org/10.1094/Phyto-72-496>.

HOWELL, C. R. **Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts.** *Plant Disease*, v. 87, p. 4-10, 2003. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.1.4>.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M.A.; ARAUJO, R.S. **Inoculation of *Brachiaria* spp. with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*: An environment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics.** *Agriculture, Ecosystems & Environment*, v.221, 1 April 2016, p. 125-131, 2016.

IXTAINA, V.Y.; JULIO, L.M.; WAGNER, J.R.; NOLASCO, S.M.; TOMÁS, M.C. **Physicochemical characterization and stability of chia oil microencapsulated with sodium caseinate and lactose by spray-drying.** Powder Technology, v. 271, p. 26-34, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2014.11.006>.

JACKSON, L. S.; LEE, K. **Microencapsulation and food industry.** Lebensmittel-Wissenschaftat Technologie, v. 24, n.4, p. 289-291, 1991.

JALALI, F.; ZAFARI, D.; SALARI, H. **Volatile organic compounds of some *Trichoderma spp.* increase growth and induce salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*.** Fungal Ecology, v. 29, p. 67-75, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2017.06.007>.

JANISZEWSKA-TURAK, E. **Carotenoids microencapsulation by spray drying method and supercritical micronization.** Food Research International, v. 99, p. 891-901, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.02.001>.

JIN, X., HARMAN, G. E., & TAYLOR, A. G. **Conidial biomass and desiccation tolerance of *Trichoderma harzianum* produced at different medium water potentials.** Biological Control, 1, 237–243, 1991. [https://doi.org/10.1016/1049-9644\(91\)90072-8](https://doi.org/10.1016/1049-9644(91)90072-8).

JIN, X.; CUSTIS, D. **Microencapsulating aerial conidia of *Trichoderma harzianum* through spray drying at elevated temperatures.** Biological control, v. 56, p. 202-208, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.11.008>.

JOHN, R. P.; TYAGI, R. D.; BRAR, S. K.; SURAMPALLI, R. Y.; PRÉVOST, D. **Bio-encapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery.** Critical Reviews in Biotechnology, v. 31, p. 211-226, 2011. <https://doi.org/10.3109/07388551.2010.513327>.

JULIATTI, F. C. **Avanços no tratamento químico de sementes.** Informativo ABRATES. v. 20, n.º.3, p. 54, 2010.

KARACA, A. C.; NICKERSON, M.; LOW, N. **Microcapsule production employing chickpea or lentil protein isolates and maltodextrin: Physicochemical properties and**

oxidative protection of encapsulated flaxseed oil. *Food Chemistry*, v. 139, p. 448–457, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.040>.

KEPPANAN, R.; SIVAPERUMAL, S.; HUSSAIN, M.; DASH, C.K.; BAMISILE, B.S.; QASIM, M.; WANG, L. **Investigation and molecular docking studies of Bassianolide from *Lecanicillium lecanii* against *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae)**. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v.206–207, p.65-72, 2018.

KUBICEK, C.; MACH, R. L.; PETERBAUER, C. K.; LORITO, M. ***Trichoderma*: from genes to biocontrol**. *J Plant Path*, v. 83, p. 11-23, 2001.

KUMAR, C.M.S.; JACOB, T.K.; DEVASAHAYAM, S.; THOMAS, S.; GEETHU, C. **Multifarious plant growth promotion by an entomopathogenic fungus *Lecanicillium psalliotae***. *Microbiological Research*, v.207, p.153-160, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.11.017>.

LABMAQ do Brasil Ltda. **Manual de Operações do Mini-Spray Dryer MSD 0.5**. Departamento de Engenharia. Disponível em <[www.engenharia@labmaqdobrasil.com.br](http://www.engenharia@labmaqdobrasil.com.br)>. 2003.

LI, Y-T.; HWANG, S-G.; HUANG, Y-M.; HUANG, C-H. **Effects of *Trichoderma asperellum* on nutrient uptake and *Fusarium* wilt of tomato**. *Crop Protection*, In press, corrected proof. Available online 27 March 2017.

LIU, X.D.; ATARASHI, T.; FURURA, T.; YOSHII, H.; AISHIMA, S.; OHKAWARA, M.; LINKO, P. **Microencapsulation of emulsified hydrophobic flavours by spray drying**. *Drying Technology*, v. 19, p. 1361-1374, 2001. <https://doi.org/10.1081/DRT-100105293>.

LOCATELLI, F.O.; SANTOS, G.F.; BOTELHO, P.S.; FINKLER, C.L.L.; BUENO, L.A. **Development of *Trichoderma* sp. formulations in encapsulated granules (CG) and evaluation of conidia shelf-life**. *Biological Control*, v. 117, p. 21-29, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.08.020>.

MA, X.; XIAOBING, W.; CHENG, J.; NIE, X.; YU, X.; ZHAO, Y.; WANG, W. **Microencapsulation of *Bacillus subtilis* B99-2 and its biocontrol efficiency against *Rhizoctonia solani* in tomato.** *Biological Control*, v. 90, p. 34-41, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.05.013>.

MACHADO, D. F. M .; PARZIANELLO, F.R.; SILVA, A.C.F.; ANTONIOLLI, Z.I. ***Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente.** *Revista de Ciências Agrárias – Vol. 35, 1, 2012*, p. 283-285.

MALAIKOZHUNDAN, B.; VINODHINI, J. **Biological control of the Pulse beetle, *Callosobruchus maculatus* in stored grains using the entomopathogenic bacteria, *Bacillus thuringiensis*.** *Microbial Pathogenesis*, v. 114, p. 139-146, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.046>.

MASTERS, K. **Spray Drying Handbook.** 5. ed. Nova York: Longman, 1991.

MATOS, E.F.; SCOPEL, B.S.; DETTMER, A. **Citronella essential oil microencapsulation by complex coacervation with leather waste gelatin and sodium alginate.** *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v.6, p. 1989-1994, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.03.002>.

MENDOZA-MENDOZA, A.; ZAID, R.; LAWRY,R.; HERMOSA, R.; MONTE, E.; HORWITZ, B.A.; MUKHERJEE, P.K. **Molecular dialogues between *Trichoderma* and roots: Role of the fungal secretome.** *Fungal Biology Reviews*, v. 32, p. 62-85, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2017.12.001>.

MONTE, E. **Understanding *Trichoderma*:** between biotechnology and microbial ecology. *Int Microbiol.* v. 4: p. 1-4, 2001.

MONTEIRO, T. S. A. **Controle biológico do nematoide das galhas, *Meloidogyne javanica*, e promoção de crescimento vegetal com os fungos *Pochonia chlamydosporia* e *Duddingtonia flagrans*.** Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, para obtenção do título de Magister Scientiae. p. 21, 2013.

MORANDI, M.A.B.; COSTA, L.B. **Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* on beans in field by *Trichoderma asperellum* and *Clonostachys rosea***. Biological control of fungal and bacterial plant pathogens, v. 43, p.243-246, 2009.

MORGAN, C. A.; HERMAN, N.; WHITE, P. A.; VESEY, G. **Preservation of microorganisms by drying: a review**. Journal of Microbiological Methods, v. 66, p. 188-193, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.017>.

MORIWAC, C.; MATIOLI, G. **Influência da  $\beta$ -galactosidase na tecnologia do leite e na má digestão da lactose**. Ciências da Saúde, Umuarama, v. 4, n. 3, p. 285-289, 2000.

MORTAZAVIAN, A.; RAZAVI, S.H.; EHSANI, M.R.; SOHRABVANDI, S. **Principles and Methods of Microencapsulation of Probiotic Microorganisms**. Iranian Journal of Biotechnology, v. 5, p. 1-18, 2007.

MUÑOZ-CELAYA, A. L.; et al. **Spray-drying microencapsulation of *Trichoderma harzianum* conidia in carbohydrate polymers matrices**. Carbohydrate polymers, v. 88, p. 1141-1148, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.12.030>.

OERKE E. C.; DEHNE, H. W.; SCHONBECK, F.; WEBER, A. **Crop production and crop protection-estimated losses in major food and cash crops**. Elsevier Science, Amsterdam, p. 808, 1994.

ORTEGA-GARCÍA, J.G.; MONTES-BELMONT, R.M.; RODRÍGUEZ-MONROY, M.R.; RAMÍREZ-TRUJILLO, J.A.; SUÁREZ-RODRÍGUEZ, R.; SEPÚLVEDA-JIMÉNEZ, G. **Effect of *Trichoderma asperellum* applications and mineral fertilization on growth promotion and the content of phenolic compounds and flavonoids in onions**. Scientia Horticulturae, v. 195, p. 8-16, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.027>.

ONU. **A ONU e a população mundial**. Disponível em <<https://nacoesunidas.org/acao/populacao-mundial/>>. Acesso em 13/10/2017.



PAPAVIZAS, G. C.; LEWIS, J. A.; ABD-ELMOITY, T. H. **Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to Benomyl and enhanced biocontrol capabilities.** *Phytopathology*, v. 72, p. 127-129, 1982. <https://doi.org/10.1094/Phyto-72-126>.

PEARSON, D. E.; CALLAWAY, R.M. **Indirect effects of host-specific biological control agents.** *Trends in Ecology and Evolution*, v.18 (9), p. 456-460. 2003. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00188-5](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00188-5).

PEDRESCHI, F.; AGUILERA, J.M. **Viability of *Trichoderma harzianum* spores under storage.** *Bioprocess Engineering*, 17, 177–183, 1997. <https://doi.org/10.1007/PL00008963>.

POIDATZ, J.; PLANTEY, R.L.; THIÉRY, D. **Indigenous strains of *Beauveria* and *Metharizium* as potential biological control agents against the invasive hornet *Vespa velutina*.** *Journal of Invertebrate Pathology*, v.153, p.180-185, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.02.021>.

POPP, J.; PETŐ, K.; NAGY, J. **Pesticide productivity and food security.** A review. *Agronomy for Sustainable Development*. v. 33, p. 243-255, 2013. <https://doi.org/10.1007/s13593-012-0105-x>.

PORTE, L. H. M.; LEÃO, M. H. M. R.; PORTE, A. **Avaliação da porosidade de micropartículas contendo proteína bioativa por porosimetria de mercúrio e adsorção de nitrogênio.** *Revista Química Nova*, vol. 34. n.9, p.1582. 2011. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000900018>.

REBECA. **Balancing the benefits and costs of regulating biological plant protection products**, WS 6 Synthesis, Deliverable. n. 25, Regulation of Biological Control Agents, 2007.  
SANTOS, M. G. et al. **Microencapsulation of xylitol by double emulsion followed by complex coacervation.** *Food Chemistry*, v. 171, p. 32-29, 2015.

SANTOS, A.R.S.; ETTO, R.M.; FURMAM, R.W.; FREITAS, D.L.; SANTOS, K.F.D.N.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F. O.; AYUB, R.A.; STEFFENS, M.B.R.; GALVÃO, C.W. **Labeled *Azospirillum brasilense* wild type and excretion-ammonium strains in association**

**with barley roots.** Plant Physiology and Biochemistry, v.118, p. 422-426, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.093>.

SCHIRMBOCK, M. et al. **Parallel Formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi.** American Society for Microbiology, Vol. 60, No. 12, p. 4364-4370, 1994.

SHARMA, R.; MAGOTRA, A.; MANHAS, R.S.; CHAUBEY, A. **Antagonistic potential of a psychrotrophic fungus: *Trichoderma velutinum* ACR-P1.** Biological Control, v. 115, p. 12-17, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.08.024>.

SAWANT, I.S.; WADKAR, P.N.; GHULE, S.B.; RAJGURU, Y.R.; SALUNKHE, V.P.; SAWANT, S.D. **Enhanced biological control of powdery mildew in vineyards by integrating a strain of *Trichoderma harzianum* with Sulphur.** Biological Control, v. 114, p.133-143, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.08.011>.

SILVA, R. R.; COELHO, D. C. **Fungos: Principais Grupos e Aplicações Biotecnológicas.** Instituto de Botânica, São Paulo, 2006.

SRIRAM, S.; ROOPA, K.P.; SAVITHA, M.J. **Extended shelf-life of liquid fermentation derived talc formulations of *Trichoderma harzianum* with the addition of glycerol in the production medium.** Crop Protection, v. 30, 10, October 2011, p. 1334-1339, 2011.

SUAVE, J.; DALLAGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V. **Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas.** Revista Saúde e Ambiente, v. 7, n. 2, p. 12-20, 2006.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Q. 1993. Encapsulation of food ingredients. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 33, 501–547. <https://doi.org/10.1080/10408399309527645>.

SHORI, A.B. **Microencapsulation improved probiotics survival during gastric Transit.** HAYATI Journal of Biosciences, v. 24, p. 1-5, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.hjb.2016.12.008>.

TRILLAS, M.I.; CASANOVA, E.; COTXARRERA, L.; ORDOVÁS, J.; BORRERO, C.; AVILÉS, M. **Composts from agricultural waste and the *Trichoderma asperellum* strain T-34 suppress *Rhizoctonia solani* in cucumber seedlings.** *Biological Control*, v.39, p.32-38, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2006.05.007>.

VERBEKEN, D.; DIERCKX, S.; DEWETTINCK, K. **Exudate gums: occurrence, production, and applications.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 63, p.3-9, 2003. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1354-z>.

VINODKUMAR, S.; INDUMATHI, T.; NAKKEERAN, S. ***Trichoderma asperellum* (NVTa2) as a potential antagonist for the management of stem rot in carnation under protected cultivation.** *Biological Control*, v. 113, p. 58-64, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.07.001>.

VIVIEN KRELL, V.; JAKOBS-SCHOENWANDT, D.; STEFAN VIDAL, S.; PATEL, A.V. **Cellulase enhances endophytism of encapsulated *Metarhizium brunneum* in potato plants.** *Fungal Biology*, v. 122(5), p.373-378, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.03.002>.

WAAGE, J. **Global developments in biological control and the implications for Europe.** *EPPO Bull.* v. 27, p. 5-13, 1997. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.1997.tb00610.x>.

WARD, E.; KERRY, B. R.; MANZANILLA-LÓPEZ, R. H.; MUTUA, G.; DEVONSHIRE, J.; KIMENJU, J. HIRSCH, P. R. **The pochoonia clamydosporia serine protease gene vcp1 is subject to regulation by carbon, nitrogen and pH: implications for nematode biocontrol.** *PloS ONE*, v. 7(4), p. 12, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035657>.

WASSERMANN, M.; SELZER, P.; STEIDLE, J.L.M.; MACKENSTEDT, U. **Biological control of *Ixodes ricinus* larvae and nymphs with *Metarhizium anisopliae* blastospores.** *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 7(5), p.768-771, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.03.010>.

WEINDLING, R. ***Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi.** *Phytopathology*, v. 22, p. 837-845, 1932.

WIDMER, T.L.; JOHNSON-BROUSSEAU, S.; KOSTA, K.; GHOSH, S.; SCHWEIGKOFER, W.; SHARMA, S.; SUSLOW, K. **Remediation of Phytophthora ramorum-infested soil with *Trichoderma asperellum* isolate 04-22 under ornamental nursery conditions.** Biological Control, v. 118, p. 67-73, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.12.007>.

WHIPPS, J. M. **Developments in the biological control of soilborne plant pathogens.** In: Callow, J. A. (Ed.), Advances in Botanical Research Incorporating Advances in Plant Pathology, v. 26, p. 5-120, 1997.

YUAN, H-G.; WU, S-Y.; LEI, Z-R.; RONDON, S. I.; GAO, Y-L. **Sub-lethal effects of *Beauveria bassiana* (Balsamo) on field populations of the potato tuberworm *Phthorimaea operculella* Zeller in China.** Journal of Integrative Agriculture, v.17(4), p.911-918, 2018. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61898-7](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61898-7).

ZBICINSKI, I.; DELAG, A.; STRUMILLO, C.; ADAMIEC, J. **Advanced experimental analysis of drying kinetics in spray drying.** Chemical Engineering Journal, v. 86, p. 207-216, 2002. [https://doi.org/10.1016/S1385-8947\(01\)00291-1](https://doi.org/10.1016/S1385-8947(01)00291-1).

ZHAO, L.; LIU, Q.; ZHANG, Y.Q.; CUI, Q.Y.; LIANG, Y.C. **Effect of acid phosphatase produced by *Trichoderma asperellum* Q1 on growth of Arabidopsis under salt stress.** Journal of Integrative Agriculture, v. 16, p. 1341-1346, 2017. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(16\)61490-9](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61490-9).

## **CAPÍTULO 2 - MICROENCAPSULAÇÃO DOS CONÍDIOS DE *TRICHODERMA ASPERELLUM* POR *SPRAY DRYING* UTILIZANDO SACAROSE COMO MATERIAL DE PAREDE**

### **2.1 Introdução**

O método de *spray drying* se destaca pela secagem de produtos e pela microencapsulação de alimentos, microrganismos, compostos voláteis, entre outros.

As variáveis operacionais do *spray dryer* definem parte das características dos produtos obtidos após a atomização. Segundo a literatura, essas características dependem principalmente de: temperatura de entrada e saída do ar de secagem (JIN & CUSTIS, 2011; MASTERS, 1991; MUÑOZ-CELAYA, 2012), vazão de alimentação da amostra ao secador, tamanho do bico atomizador, vazão volumétrica do ar de secagem e do ar de atomização, umidade do ar ambiente e teor de sólidos da solução de alimentação (ROSENBER et al., 1990; MASTERS, 1991; LIU et al., 2001; LABMAQ DO BRASIL LTDA, 2003).

Um dos principais problemas relatados quando se trabalha com o método de *spray drying* é a adesividade da solução de alimentação na parede do equipamento, fato que prejudica o rendimento do processo. Materiais ricos em açúcares têm sido reportados na literatura por apresentarem alta adesividade (GHARSALLAOUI, 2007), principalmente açúcares de baixo peso molecular. Outro problema comum quando se trabalha com microencapsulação de microrganismos é a mortalidade das células em razão de altas temperatura do ar de secagem.

Neste capítulo será investigada a utilização de sacarose como material de parede, tal escolha se justifica pelos resultados promissores encontrados na literatura utilizando açúcares como materiais de parede de microrganismos e outros materiais em geral (JIN, CUSTIS, 2011; MUÑOZ-CELAYA et al., 2012; MA, et al., 2015).

Diante do que foi exposto, os ensaios exploratórios tornam-se imprescindíveis para a determinação das variáveis mais importantes no processo de microencapsulação por *spray drying* dos conídios de *Trichoderma asperellum* e a averiguação de como estas podem influenciar nas respostas a serem avaliadas.

## **2.2 Material e Métodos**

### **2.2.1 Suspensão de conídios de *Trichoderma asperellum***

As suspensões dos conídios de *Trichoderma asperellum* utilizadas durante esse estudo foram gentilmente fornecidas pelo Laboratório de Biocontrole Farroupilha-Lallemand, localizado na cidade de Patos de Minas-MG-Brasil, às quais foram obtidas por fermentação em estado sólido, utilizando como substrato sementes de milho, que posteriormente foram lavadas em água para remoção dos conídios. Após o processo de lavagem das sementes, o material foi coletado e misturado ao agente encapsulante para obtenção da solução de alimentação do *spray dryer*.

As suspensões dos conídios de *Trichoderma asperellum* foram caracterizadas antes de cada experimento em relação à: umidade, concentração de conídios e germinação.

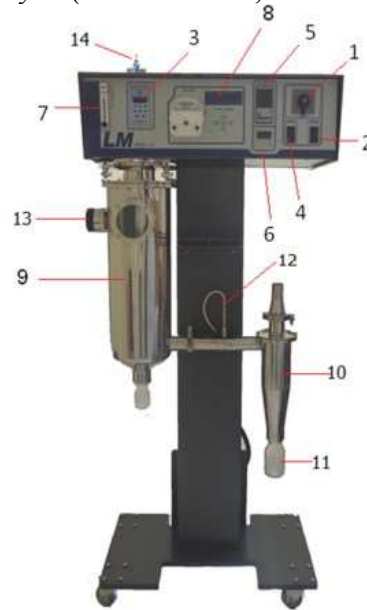
### **2.2.2 Material de parede**

Amostras de sacarose (açúcar cristal comercial - Brasil) foram caracterizadas quanto à umidade, atividade de água, higroscopicidade e solubilidade em água e aplicadas como material de parede no processo de microencapsulação de conídios de *Trichoderma asperellum* por *spray drying*.

### **2.2.3 Microencapsulação por *spray drying***

O processo de atomização foi realizado no laboratório da Universidade Federal de Uberlândia, Campus Patos de Minas, utilizando-se um *spray dryer* com bico atomizador de 1,2 mm (LM MSD 1.0, LABMAQ, Brasil) com capacidade de secagem de 1 L h<sup>-1</sup>. Na Figura 2.1 está apresentado uma fotografia do *spray dryer* utilizado e a descrição das principais partes do equipamento.

**Figura 2.1.** Esquema do *spray dryer* (LM MSD 1.0, LabMq) utilizado neste trabalho.



A numeração indica os seus componentes principais: 1) Chave geral 2) Interruptor soprador; 3) Controlador da vazão do soprador líquido; 4) Interruptor aquecimento; 5) Controlador de temperatura de entrada; 6) Indicador de temperatura (saída); 7) Rotâmetro; 8) Controle do bombeamento 9) Câmara de secagem; 10) Ciclone; 11) Frasco coletor; 12) Sensor de temperatura (PT 100); 13) Lanterna; 14) Conjunto do bico atomizador.

Fonte: Labmaq do Brasil Ltda (2003).

A partir da suspensão inicial de conídios de *Trichoderma asperellum* foram preparadas soluções com duas concentrações de sacarose, uma com 2% e outra com 8% (massa/volume). Esta solução foi misturada para se obter a solução de alimentação do *spray dryer*. A homogeneização dos materiais foi realizada em placa de agitação durante todo o processo de secagem. A alimentação da amostra foi realizada com auxílio da bomba peristáltica do equipamento (item 8 - Figura 2.1). O material coletado da base do ciclone (item 11 – Figura 2.1) foi armazenado refrigerado e em recipientes estéreis e hermeticamente fechados até o momento de caracterização do produto.

Para determinação das condições viáveis de microencapsulação foram realizados 10 experimentos variando a concentração do agente encapsulante e as condições operacionais do *spray dryer*, temperatura de entrada do ar de secagem, vazão do ar de secagem e vazão volumétrica de alimentação da amostra. Na Tabela 2.1 estão apresentadas as condições operacionais do *spray dryer* e as concentrações do material de parede utilizadas neste estudo. Quatro experimentos foram feitos como controle (sem adição de agente encapsulante) para comparação dos resultados.

**Tabela 2.1.** Condições operacionais utilizadas para a microencapsulação dos conídios de *Trichoderma asperellum* por *spray drying* utilizando sacarose (açúcar comercial) como agente encapsulante.

<b>Experimento</b>	<b>Te (°C)</b>	<b>[MP] <math>\text{mv}^{-1}</math></b>	<b>Vaz. alim. (<math>\text{L h}^{-1}</math>)</b>	<b>Vazão <math>\text{Ar}_{\text{sec.}}</math> (<math>\text{L h}^{-1}</math>)</b>
T1 (Controle)	60	0	0,6	$9,90 \times 10^4$
T2 (Controle)	80	0	0,6	$9,90 \times 10^4$
T3 (Controle)	80	0	0,9	$9,90 \times 10^4$
T4 (Controle)	60	0	0,9	$9,90 \times 10^4$
1	80	2	0,6	$9,90 \times 10^4$
2	80	2	0,9	$9,90 \times 10^4$
3	80	2	0,6	$1,17 \times 10^5$
4	80	2	0,9	$1,17 \times 10^5$
5	60	8	0,6	$1,17 \times 10^5$
6	80	8	0,6	$1,17 \times 10^5$
7	80	8	0,9	$1,17 \times 10^5$
8	60	8	0,6	$9,90 \times 10^4$
9	80	8	0,9	$9,90 \times 10^4$
10	80	8	0,6	$9,90 \times 10^4$

Sendo: Te – Temperatura de entrada do ar de secagem; [MP] – Concentração do Material de Parede em massa/volume; Vaz. alim. – Vazão volumétrica de alimentação da amostra; Vazão do  $\text{ar}_{\text{sec.}}$  – Vazão volumétrica do ar de secagem; T1, T2, T3 e T4 são os ensaios controle (sem adição de sacarose como material de parede).

Como pode ser visto na Tabela 2.1, foram avaliadas duas temperaturas de entrada do ar de secagem, 60 e 80°C, duas concentrações do agente encapsulante, 2 e 8% ( $\text{m v}^{-1}$ ), duas vazões de alimentação da amostra, 0,6 e 0,9  $\text{L h}^{-1}$  e duas vazões do ar de atomização,  $9,90 \times 10^4$   $\text{L h}^{-1}$  e  $1,17 \times 10^5$   $\text{L h}^{-1}$ . A vazão do ar de atomização foi fixada conforme recomendação do fabricante do equipamento e com base em observações dos ensaios exploratórios, como 2.400  $\text{L h}^{-1}$ . Os ensaios T1, T2, T3 e T4 foram experimentos controle, pois não apresentam adição de sacarose como agente encapsulante, foram realizados com o intuito de comparar os resultados com e sem agente protetor.

As micropartículas produzidas foram caracterizadas por testes de umidade e germinação, e foram visualizadas por meio de microscopia óptica. Por meio dos resultados de umidade e germinação calcularam-se os percentuais de rendimento de secagem (RS) e conídios viáveis (CV).



## 2.2.4 Análises físico-químicas, microbiológicas e rendimento de secagem

Os ensaios físico-químicos e microbiológicos realizados neste estudo estão descritos a seguir.

### 2.2.4.1 Umidade

A umidade das soluções de *Trichoderma asperellum*, do material de parede e das micropartículas foi determinada por método gravimétrico. Foram pesados aproximadamente 3 g da amostra em cápsulas de porcelana de massa conhecida. As cápsulas foram levadas a estufa a 105°C, onde se mantiveram até a massa das mesmas ficar constante, de acordo com metodologia da A.O.A.C. (2005).

A umidade das amostras, em base úmida (b.u.), foi calculada de acordo com a Equação 2.1:

$$Umidade = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \quad (2.1)$$

sendo  $m_i$  e  $m_f$  a massa da amostra antes e após a secagem em estufa, respectivamente.

### 2.2.4.2 Atividade de água

A atividade de água ( $a_w$ ) foi realizada nas micropartículas secas e no material de parede. Foi determinada utilizando-se equipamento analisador de atividade de água de bancada, AQUALAB (Marca: Decagon, Modelo: Aqualab Lite), com leitura digital.

### 2.2.4.3 Higroscopicidade

A sacarose e as micropartículas produzidas foram caracterizadas quanto a higroscopicidade. Foi utilizada a metodologia de Cai e Corke (2000) com algumas modificações. Foram colocadas 0,3 gramas das amostras em cápsulas de porcelana, as quais foram armazenadas em dessecador contendo solução saturada de cloreto de sódio, com umidade relativa de 70%, durante sete dias à temperatura ambiente. O resultado foi expresso em gramas de água absorvida pela amostra 100 gramas<sup>-1</sup> de matéria seca.

#### 2.2.4.4 Solubilidade em água

A solubilidade foi realizada segundo descrição de Cano-Chauca (2005), em que 0,5 g das amostras foram colocadas em béqueres contendo 50 mL de água destilada e homogeneizados em uma placa de agitação durante trinta minutos a 100 rpm, à temperatura ambiente. Posteriormente a solução foi centrifugada, utilizando uma centrífuga de bancada digital microprocessada (Marca: QUIMIS; Modelo: Q222TM208) durante 5 min. a 3.500 rpm. O sobrenadante foi transferido para uma cápsula de porcelana de peso conhecido e levado à estufa (Marca: QUIMIS, Modelo: Q314M252) à 105°C até a massa se manter constante. O resultado foi expresso em porcentagem e calculado pela Equação 2.2:

$$\text{Solubilidade em água (\%)} = \frac{\text{Massa de pó no sobrenadante}}{\text{Massa de pó total}} \times 100 \quad (2.2)$$

#### 2.2.4.5 Conídios Viáveis (CV)

Para avaliar a porcentagem de CV, após o processo de *spray drying* realizou-se o teste de germinação, seguindo as metodologias de Danielson & Davey (1973) e Milner et al. (1991) com algumas modificações. Aproximadamente 50 µL das suspensões de conídios de *Trichoderma asperellum* foram gotejadas em placas contendo meio de cultura BDA 15, que posteriormente foram armazenadas em câmara B.O.D. à 25°C. Após o período de incubação de 16 horas os esporos que apresentaram tubo germinativo maior que o próprio esporo foram considerados germinados. Para cessar a germinação corante azul de metileno foi adicionado às placas. Foram contados, aleatoriamente, 100 conídios por placa, sendo o procedimento realizado em triplicata. A porcentagem de CV dos conídios de *Trichoderma asperellum* foi avaliada relacionando a germinação da solução de alimentação do *spray dryer* com a germinação do pó obtido após o processo de secagem. A Equação 2.3 apresenta o resultado expresso em porcentagem:

$$\text{Conídios viáveis (\%)} = \frac{\text{Germinação final}}{\text{Germinação inicial}} \times 100 \quad (2.3)$$

sendo a germinação inicial calculada antes do processo de microencapsulação por *spray drying* e a germinação final após o processo.

#### 2.2.4.6 Contagem do número de conídios

A contagem do número de conídios por mL foi realizada com auxílio da câmara de Neubauer. O preparo das suspensões para leitura em microscópio ótico foi realizado por diluição seriada. As contagens foram feitas em triplicata.

#### 2.2.4.7 Rendimento do processo de secagem

O rendimento do processo de secagem foi calculado pela razão entre a massa de sólidos do produto em pó coletado e a massa de sólidos alimentados ao secador (suspensão de *Trichoderma asperellum* com ou sem adição de material de parede), de acordo com a Equação 2.4:

$$RS (\%) = \frac{M_{pó}(1-X_{w,pó})}{M_{suspensão}(1-X_{w,suspensão})} \times 100 \quad (2.4)$$

Em que  $M_{pó}$  é a massa de pó coletada na base do ciclone após o processo de microencapsulação,  $M_{suspensão}$  a massa alimentada no *spray dryer*,  $X_{w,pó}$  e  $X_{w,suspensão}$  são as frações de água presentes no pó obtido e na suspensão de *Trichoderma asperellum* alimentadas no *spray dryer*, respectivamente.

#### 2.2.4.8 Morfologia

As suspensões e micropartículas de conídios de *Trichoderma asperellum* foram avaliadas quanto à morfologia por meio de microscopia ótica. Após o processo de microencapsulação, amostras das micropartículas foram misturadas em álcool isopropílico e colocadas em lâminas de vidro para visualização em microscópio. As fotografias foram tiradas com câmera digital acoplada ao microscópio ótico (Nikon: Eclipse E100, China) com aumento de imagem de 400 vezes.

#### 2.2.4.9 Análise estatística

Os resultados obtidos nos ensaios foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias por Tukey ( $p < 0,05$ ) utilizando recursos do *software* Assistat (*Statistical Assistance*), a fim de verificar a existência de diferença estatística entre os parâmetros avaliados devido ao processo de microencapsulação dos conídios de *Trichoderma asperellum* por *spray drying*.

## 2.3 Resultados e discussão

### 2.3.1 Análises físico-químicas, microbiológicas e rendimento de secagem

#### 2.3.1.1– Caracterização do material de parede (sacarose)

Na Tabela 2.2 estão apresentados os resultados de caracterização da sacarose utilizada no processo de microencapsulação dos conídios de *Trichoderma asperellum*, para umidade, em base úmida, atividade de água ( $a_w$ ), higroscopicidade e solubilidade em água.

**Tabela 2. 2.** Resultados de caracterização da sacarose.

Amostra	Umidade (%)	( $a_w$ )	Higroscopicidade (g de água 100g <sup>-1</sup> )	Solubilidade (%)
Sacarose	3,06 ± 0,03	0,63 ± 0,03	1,80 ± 0,72	99,68 ± 0,18

A sacarose apresentou valores baixos de umidade (3,06 ± 0,03%), como observado na Tabela 2.2. Sabe-se que atividade de água e a umidade influenciam nas alterações físicas, químicas e microbiológicas, interferindo assim, na qualidade e estabilidade dos materiais de parede e das micropartículas produzidas por eles. A maioria dos microrganismos se desenvolve em níveis de  $a_w$  acima de 0,90 (ROCKLAND, BEUCHAT, 1987). Os valores de  $a_w$  para a sacarose (0,63 ± 0,03) obtidos neste trabalho foram iguais ao estabelecido como seguros na literatura (0,60 o valor mínimo), sendo assim, considerados estáveis para armazenamento. Pode-se concluir também que quanto menor for o valor da umidade, possivelmente, menor será o da  $a_w$ , impedindo, portanto, o desenvolvimento de outros microrganismos e a alteração de características do produto pelo desenvolvimento dos mesmos (ROCKLAND; BEUCHAT, 1987; CHIRIGE; BUERA, 1996; FELLOWS, 2006).

A higroscopicidade de um produto está ligada à sua estabilidade física, química e microbiológica. O estudo do comportamento higroscópico é importante na predição da vida útil do produto e determinação do tipo de embalagem a ser usada (ALEXANDRE et al., 2007). A sacarose apresentou baixa higroscopicidade (1,80 ± 0,72 g 100g<sup>-1</sup>) durante a avaliação, indicando características favoráveis para o armazenamento.

A solubilidade do material de parede é uma das características mais importantes do processo, pois pode interferir no processo de atomização, gerando gotículas muito grandes ou pequenas que podem prejudicar a taxa de transferência de calor e, conseqüentemente, a secagem (ROSENBERG, KOPELMAN, TALMON, 1990). A adição de um material de parede gera aumento de sólidos na solução de alimentação do *spray dryer* e, conseqüentemente, pode

aumentar a eficiência da operação (GHARSALLAOUI et al., 2007). A solubilidade da sacarose foi considerada adequada para utilização em microencapsulação por *spray drying*, pois tal método necessita de materiais, pelo menos, parcialmente solúveis em água (DESAI, PARK, 2005), sendo a solubilidade da sacarose de  $99,68 \pm 0,18\%$ .

### 2.3.1.2 Caracterização das micropartículas produzidas com sacarose

Na Tabela 2.3 são apresentados os resultados de umidade, em base úmida, das micropartículas e rendimento de secagem das formulações avaliadas neste estudo, ambos expressos em porcentagem.

**Tabela 2.3.** Umidade e rendimento de secagem das formulações utilizando sacarose como material de parede.

Experimento	Te (°C)	[MP] mv <sup>-1</sup>	Vaz. alim. (Lh <sup>-1</sup> )	Umidade (%)	Rendimento de secagem (%)
T1 (Controle)	60	0	0,6	8,19 ± 0,09	23,98
T2 (Controle)	80	0	0,6	5,82 ± 0,15	49,01
T3 (Controle)	80	0	0,9	5,38 ± 0,11	51,09
T4 (Controle)	60	0	0,9	5,24 ± 0,11	31,71
1	80	2	0,6	5,04 ± 0,21	63,88
2	80	2	0,9	5,04 ± 0,17	33,12
3	80	2	0,6	3,78 ± 0,19	53,42
4	80	2	0,9	4,44 ± 0,11	61,24
5	60	8	0,6	3,83 ± 0,17	65,50
6	80	8	0,6	5,62 ± 0,13	39,44
7	80	8	0,9	5,66 ± 0,11	47,99
8	60	8	0,6	6,70 ± 0,15	37,09
9	80	8	0,9	6,43 ± 0,09	37,22
10	80	8	0,6	4,29 ± 0,09	66,64

Observação: Os dados de umidade foram obtidos no tempo zero, ou seja, após a secagem dos tratamentos.

Pode-se observar que mesmo sendo utilizadas baixas temperaturas de entrada para o ar de secagem (60 e 80 °C) os valores obtidos de umidade para os tratamentos foram baixos. E são considerados satisfatórios para produtos em pó obtidos por esta técnica, uma vez que estão todos abaixo de 7% de umidade (MASTER, 1991). Acredita-se que a umidade obtida para os tratamentos é indicadora de uma boa condição de armazenamento, pois produtos com baixos valores de umidade podem obter melhor estabilidade ao longo do tempo (MASTER, 1991; FILKOVÁ, HUANG, MUJUNDAR, 2006). Acredita-se que o valor de umidade mais alto observado para T1 pode ter sido ocasionado por influência da umidade relativa do ambiente, de

49%, sendo que os demais experimentos apresentaram umidade relativa em torno de 45%, ou ainda por efeito de interação das variáveis.

Neste estudo verificou-se em todos os experimentos que quando utilizada a vazão de alimentação da amostra de  $0,9 \text{ L h}^{-1}$  parte do material de alimentação do *spray dryer* não era seco, gerando resíduo líquido no frasco coletor abaixo da câmara de atomização, conforme pode ser observado na Figura 2.2. Além disso, os menores rendimentos de secagem encontrados foram na maior parte para os ensaios com  $0,9 \text{ L h}^{-1}$  na vazão de alimentação da amostra (T4 – 31,71%; Experimento 2 – 33,12%; Experimento 7 – 47,99% e Ensaio 9 – 37,22%). As altas vazões de alimentação da amostra, como  $0,9 \text{ L h}^{-1}$ , interferem no tamanho da gota formada durante a atomização. Gotas maiores apresentam área superficial de contato menor, conseqüentemente, dificultaram o processo de desidratação da amostra específica por *spray drying*, diminuindo o rendimento do método. A Figura 2.3 apresenta o pó de conídios de *Trichoderma asperellum* obtido após o processo de *spray drying* (Experimento 2).

**Figura 2. 2.** Resíduo líquido coletado abaixo da câmara de atomização - Experimento 2.



Fonte: Autoria própria.

**Figura 2. 3.** *Trichoderma asperellum* microencapsulado em forma de pó.



Fonte: Autoria própria.

### ***2.3.1.3 Análises da germinação e dos conídios viáveis de Trichoderma asperellum***

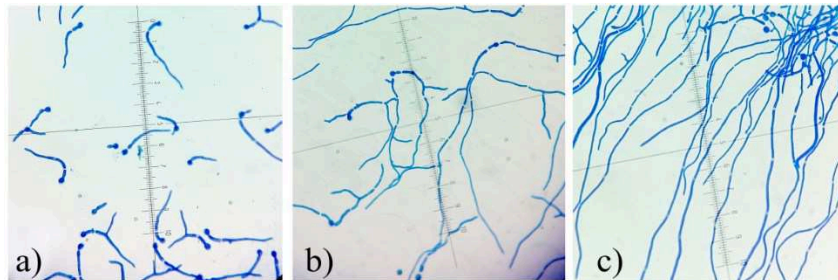
Para verificação do melhor tempo para contagem de germinação dos conídios, foram realizadas contagens em diferentes tempos de incubação, 16, 20 e 22 h, tanto para os conídios em solução, quanto dos conídios microencapsulados. Na Tabela 2.4 são apresentados os dados de germinação dos conídios da solução de alimentação do *spray dryer* com 16 horas (tempo verificado como máximo necessário para a germinação total dos conídios das suspensões iniciais) de incubação em câmara B.O.D. (25°C) e das micropartículas em diferentes tempos, 16 e 20 horas. O cálculo de conídios viáveis também é apresentado.

**Tabela 2.4.** Porcentagem de germinação em diferentes tempos de incubação e conídios viáveis.

<b>Experimento</b>	<b>GS 16 h (%)</b>	<b>GM 16 h (%)</b>	<b>GM 20 h (%)</b>	<b>Conídios viáveis (%)</b>
T1(Controle)	97,33 ± 0,58 <sup>a</sup>	66,00 ± 2,65 <sup>cde</sup>	67,00 ± 2,00 <sup>cd</sup>	68,84 ± 2,05 <sup>f</sup>
T2 (Controle)	97,33 ± 0,58 <sup>a</sup>	56,67 ± 6,03 <sup>e</sup>	58,00 ± 6,00 <sup>e</sup>	58,56 ± 6,16 <sup>g</sup>
T3 (Controle)	94,67 ± 1,53 <sup>a</sup>	62,33 ± 3,21 <sup>de</sup>	63,67 ± 2,08 <sup>de</sup>	67,25 ± 2,20 <sup>fg</sup>
T4 (Controle)	97,67 ± 0,58 <sup>a</sup>	67,33 ± 1,53 <sup>cd</sup>	70 ± 1,00 <sup>cd</sup>	71,67 ± 1,02 <sup>ef</sup>
1	93,33 ± 2,08 <sup>a</sup>	72,67 ± 5,13 <sup>bc</sup>	74,33 ± 4,73 <sup>bc</sup>	79,64 ± 5,06 <sup>cde</sup>
2	93,33 ± 2,08 <sup>a</sup>	80,67 ± 3,79 <sup>ab</sup>	83,67 ± 3,79 <sup>ab</sup>	89,64 ± 4,06 <sup>abc</sup>
3	95,67 ± 2,52 <sup>a</sup>	82,33 ± 4,04 <sup>ab</sup>	84,67 ± 4,51 <sup>a</sup>	88,50 ± 4,71 <sup>abcd</sup>
4	97,67 ± 0,58 <sup>a</sup>	81,67 ± 1,53 <sup>ab</sup>	84,00 ± 1,00 <sup>a</sup>	86,01 ± 1,02 <sup>abcd</sup>
5	97,00 ± 1,00 <sup>a</sup>	84,67 ± 3,5 <sup>a</sup>	89,00 ± 3,61 <sup>a</sup>	91,75 ± 3,72 <sup>ab</sup>
6	97,00 ± 1,00 <sup>a</sup>	83,33 ± 4,73 <sup>a</sup>	86,67 ± 4,16 <sup>a</sup>	89,35 ± 4,29 <sup>abcd</sup>
7	97,00 ± 1,00 <sup>a</sup>	87,67 ± 2,08 <sup>a</sup>	90,33 ± 1,53 <sup>a</sup>	93,13 ± 1,57 <sup>a</sup>
8	82,33 ± 4,16 <sup>b</sup>	61,33 ± 1,53 <sup>de</sup>	65,33 ± 1,53 <sup>cde</sup>	79,35 ± 1,86 <sup>de</sup>
9	82,33 ± 4,16 <sup>b</sup>	67,00 ± 3,61 <sup>cd</sup>	68,33 ± 3,51 <sup>cd</sup>	83,00 ± 4,27 <sup>bcd</sup>
10	97,67 ± 0,58 <sup>a</sup>	87,67 ± 1,53 <sup>a</sup>	90,67 ± 1,53 <sup>a</sup>	92,83 ± 1,56 <sup>ab</sup>

Sendo: GS 16 h – Germinação da solução de alimentação do *spray dryer* em 16 horas de incubação; GM 16 h – Germinação das micropartículas em 16 horas de incubação; GM 20 h – Germinação das micropartículas em 20 horas de incubação. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A germinação dos conídios microencapsulados foi analisada em diferentes tempos para avaliar se existia um aumento de germinação ao longo do tempo. Observa-se pelos dados apresentados na Tabela 2.4 que a porcentagem de germinação aumentou com o aumento do tempo de incubação, porém não de forma significativa. Não foi possível fazer a avaliação em períodos maiores que 20 h, pois as hifas dos conídios cresciam muito, dificultando a leitura em microscópio óptico, conforme pode ser observado na Figura 2.3 (c).

**Figura 2.4.** Germinação dos conídios de *Trichoderma asperellum* microencapsulados – Experimento 5.

Sendo: a) 16 h de incubação; b) 20 h de incubação; c) 22 h de incubação. Experimento 5: Temperatura do ar de entrada de 60 °C; Concentração do material de parede (sacarose) de 8% massa/volume; Vazão de alimentação da amostra ao secador de 0,6 L h<sup>-1</sup> e vazão do ar de atomização de 7,02×10<sup>7</sup> L h<sup>-1</sup>.



Pelos dados apresentados na Tabela 2.4 pode-se verificar que todos os experimentos sofreram redução de germinação após o processo de secagem em comparação com a solução inicial alimentada ao secador. Esse fato é consequência da temperatura de secagem que, mesmo com agente protetor ainda pode acarretar em morte do microrganismo. O mesmo resultado também foi observado e descrito por Jin e Custis (2011) no processo de microencapsulação de conídios de *Trichoderma harzianum* por *spray drying*, em que os autores estudaram diferentes temperaturas do ar de secagem, desde 40 à 140 °C.

Além da temperatura do ar, Simonin et al. (2007) relatam que conídios secos por atomização normalmente apresentam germinação mais baixa do que a solução inicial porque processos de desidratação e reidratação podem causar mudanças de permeabilidade da membrana citoplasmática, causando danos celulares e possível morte celular.

Pelos dados da Tabela 2.4 pode-se observar que as menores porcentagens de conídios viáveis após o processo de secagem são dos experimentos controle, T1, T2, T3 e T4, que não tiveram adição de material de parede no processo. O mesmo foi verificado por Jin e Custis (2011) ao testar sacarose, melão e glicerol como materiais de parede na microencapsulação de conídios de *Trichoderma harzianum*. Os autores observaram que as formulações que continham material de parede resultaram em porcentagens de sobrevivência significativamente maiores em comparação com o controle.

Segundo Jin e Custis (2011) a utilização de sacarose como material de parede criou um nicho osmótico formando um revestimento de proteção aos conídios, protegendo-os tanto do processo de desidratação, quanto de reidratação.

Com exceção dos experimentos controle, os ensaios com menores valores de conídios viáveis foram o experimento 1 e experimento 8, ambos têm em comum vazão de alimentação da amostra ao secador de 0,6 L h<sup>-1</sup> e vazão do ar de atomização de 5,94×10<sup>6</sup> L h<sup>-1</sup>. A diferença entre eles está na temperatura de entrada do ar de secagem (experimento 1: 80°C; experimento 8: 60°C) e na concentração do material de parede (experimento 1: 2% massa/volume e 80°C; experimento 8: 8% massa volume<sup>-1</sup> e 60°C). Sendo assim, verifica-se neste caso em questão, que uma maior concentração de material de parede nem sempre faz com que a porcentagem de germinação seja maior.

Jin e Custis (2011) avaliaram a microencapsulação de conídios de *Trichoderma harzianum* com soluções de sacarose variando as concentrações de 0,5 a 8% massa/volume, e verificaram que a adição de material de parede proporcionava maior sobrevivência dos conídios em relação à amostra controle (sem material de parede). Entretanto esta sobrevivência não

dependia apenas do aumento da concentração de sacarose, sendo que com uma solução de sacarose a 2% (massa volume<sup>-1</sup>) obteve a maior taxa de sobrevivência.

Apesar de ser sabido que a temperatura pode influenciar na viabilidade dos conídios, essa variável pareceu não ser o fator decisivo nos resultados obtidos nos experimentos 1 e 8, provavelmente pela proximidade das temperaturas, de 60 para 80°C. Entretanto, seria interessante que essa questão fosse avaliada com um planejamento estatístico com mais níveis de variação para confirmar que de fato o aumento de temperatura de 60 para 80°C não influencia na viabilidade dos conídios de *Trichoderma asperellum*.

Os experimentos 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 10 apresentaram as maiores porcentagens de conídios viáveis, sendo seus valores considerados iguais estatisticamente ao nível de 5% de significância, de acordo com o teste de Tukey. Os experimentos 2, 3 e 4 têm em comum temperatura do ar de entrada de 80°C e concentração de material de parede de 2% massa/volume, os experimentos 5 e 6 tem em comum concentração de material de parede de 8% massa/volume e vazão de alimentação da amostra de 0,6 L h<sup>-1</sup>, e os experimentos 7 e 10 tem em comum temperatura do ar de entrada de 80°C e concentração do material de parede (sacarose) de 8% massa/volume.

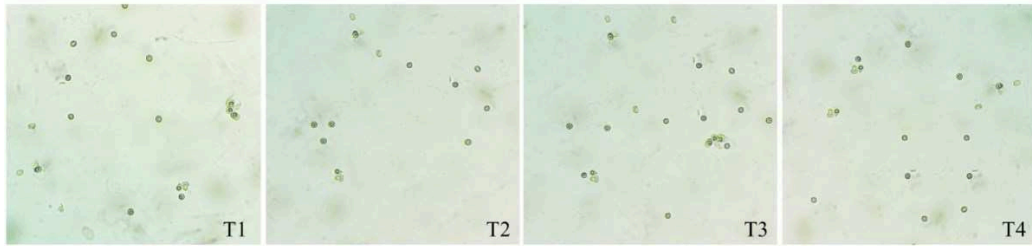
Percebe-se que a variável vazão de alimentação da amostra ao secador influenciou diretamente no rendimento de secagem, que é função da quantidade de pó coletado no processo. Neste estudo preliminar observou-se que as vazões de 0,9 L h<sup>-1</sup> diminuíram o rendimento do processo, enquanto que vazões mais lentas, como 0,6 L h<sup>-1</sup> principalmente, aumentaram a coleta de pó. No Capítulo 3 foi feito um estudo do efeito das variáveis operacionais do *spray dryer* e de suas interações, assim, foi possível entender melhor como o processo se comporta.

Nos testes preliminares foi observado que a vazão de alimentação do produto influencia na temperatura de saída do ar da câmara de secagem. Vazões mais altas reduzem a temperatura de saída. Em contrapartida, vazões mais altas geravam baixos rendimentos e em alguns casos não secavam o produto completamente, como ilustrado na Figura 2. 2, ao se trabalhar com vazão de alimentação da amostra de 0,9 L h<sup>-1</sup> e 80°C.

#### **2.3.1.4 Morfologia dos conídios obtidos após o processo de *spray drying***

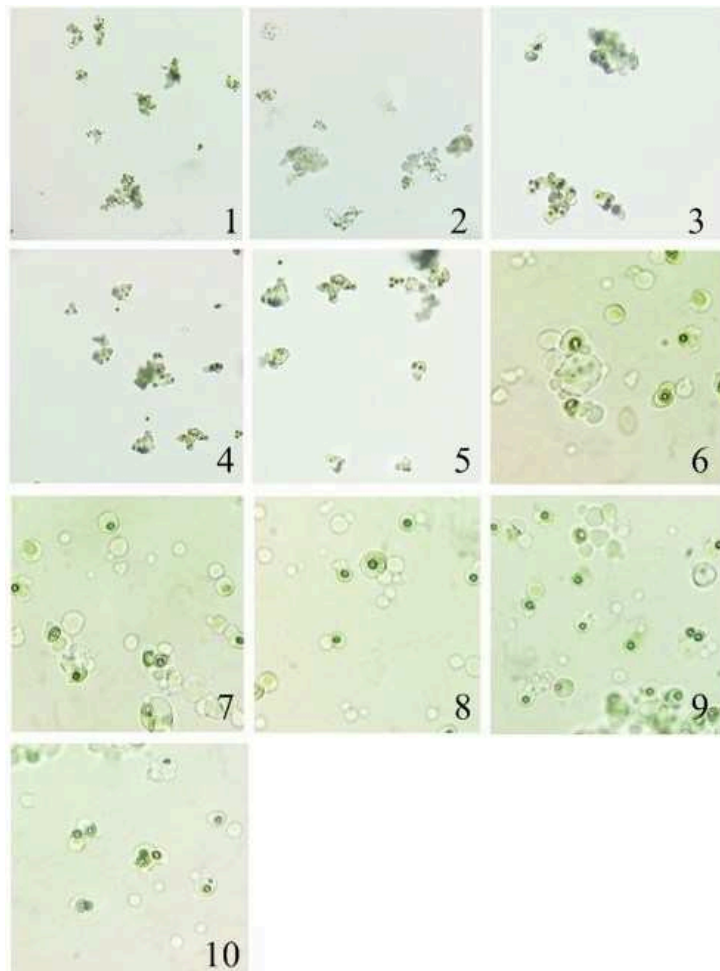
Nas Figuras 2.6 e 2.7 estão apresentadas as imagens de microscopia óptica dos tratamentos secos por *spray dryer* com e sem adição de sacarose como agente encapsulante.

**Figura 2.5.** Microscopia óptica dos tratamentos secos em *spray dryer* sem adição de agente encapsulante.



Observação: Os números nas imagens correspondem aos experimentos da Tabela 2.4.

**Figura 2.6.** Microscopia óptica dos tratamentos secos em *spray dryer* utilizando sacarose como agente encapsulante.



Observação: Os números nas imagens correspondem aos experimentos da Tabela 2.4.

Pelas microscopias (Figura 2.5) verifica-se que nos experimentos controle, (sem adição de agente encapsulante) T1, T2, T3 e T4, os conídios de *Trichoderma asperellum* estão livres, sem aglomeração e sem formação de cobertura ao redor dos mesmos.

Nos experimentos com adição de sacarose na formulação verificou-se formação de micropartículas em todos os casos (Figura 2.6). Os experimentos 1, 2, 3, 4 e 5 apresentaram formação de partículas ou complexos de formato não definido e multinucleado. Observou-se, entretanto, a predominância de formato esférico. Nos experimentos 6, 7, 8, 9 e 10. Entretanto, formato arredondado e oval também foi encontrado, sendo que todos estes experimentos tem em comum a concentração de sacarose de 8% massa volume<sup>-1</sup>.

Em termos de morfologia é possível notar que ambas as concentrações de sacarose aplicadas (2% e 8% massa/volume) possibilitaram a formação de camada protetora ao redor dos conídios, entretanto, aparentemente as formulações com 8% de sacarose formaram uma camada mais espessa ao redor do núcleo. Jin e Custis (2011) fizeram a mesma observação ao trabalhar com concentrações de 2 e 8% na microencapsulação de conídios de *Trichoderma harzianum* por *spray drying* utilizando sacarose como material de parede.

Um problema observado ao se utilizar sacarose ocorreu durante a coleta do pó. O material embora seco e com baixa umidade estava pegajoso, muito duro e fortemente aderido à parede do frasco de coleta, sendo sua remoção muito difícil. Acredita-se que isto ocorreu devido à mudança de estado, resultado da temperatura de transição vítrea da solução ao entrar em contato com o ar de secagem.

É sabido que um material pode mudar de estado físico devido a alterações de temperatura e/ou pressão ou teor de umidade. O estado amorfo metaestável é sensível a mudanças de temperatura, umidade, massa molecular e composição. A mudança deste estado vítreo para o estado “gomoso ou borrachudo” ocorre na temperatura de transição vítrea, T<sub>g</sub>. (Roos, 1995). Segundo Collares e Finzer (2002) e Roos (1995) cada material possui sua T<sub>g</sub>, que pode ser função da atividade de água em que o material se encontra.

A T<sub>g</sub> da sacarose está normalmente na faixa de 52°C à 70°C (SLADE et al., 1993; ROOS, 1995). Como as temperaturas de entrada do ar usadas neste ensaio foram de 60°C e 80°C pode ter ocorrido tal mudança de estado.

A T<sub>g</sub> influencia também na aderência do produto nas paredes do secador, que é outro problema muito conhecido em processos de microencapsulação por *spray drying*. Em todos os experimentos deste estudo percebeu-se incrustação de material, tanto na parede do secador, como nas outras partes, como ciclone e chaminé.

## 2.4 Considerações finais

A adição de sacarose como agente encapsulante nas formulações testadas neste estudo propiciou aumento da germinação e viabilidade dos conídios de *Trichoderma asperellum* em comparação com os ensaios sem uso de material de parede. De certa forma conclui-se que o uso deste material como agente encapsulante apresenta-se como uma possibilidade de aplicação para a microencapsulação dos conídios, entretanto, devido a baixa Tg da sacarose e aos problemas encontrados de incrustação na câmara de secagem e no frasco coletor torna-se oportuno o estudo de outros materiais a fim de encontrar melhores resultados.

Em relação às variáveis operacionais estudadas, observou-se que existe certa interação entre elas, sendo, portanto importante estudá-las posteriormente em um planejamento estatístico para indicação de tendências e direções da pesquisa.

Concluiu-se que a utilização da vazão de alimentação da amostra de  $0,9\text{L h}^{-1}$ , é inviável ao processo devido aos baixos rendimentos de secagem obtidos.

## 2.5 Referências

ALEXANDRE, H. V.; FIGUEIREDO, R. M. F.; QUEIROZ, A.J. de M. **Isotermas de adsorção de umidade da pitanga em pó**. Revista de Biologia e Ciências da Terra, v.7, p.11-20, 2007.

A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemists). **Official methods of analysis of the association analytical chemists**. 18.ed. Gaithersburg, MD, 2005. p.1526.

CANO-CHAUCA, M.; STRINGHETA, P. C.; RAMOS, A. M.; CAL-VIDAL, J. **Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization**. Innovative Food Science and Emerging Technologies. Oxford, v. 5, n.4, p.420-427, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2005.05.003>.

CAI, Y.Z; CORKE, H. **Production and properties of spray-dried Amaranthus betacyanin pigments**. Journal of Food Science, v. 65(6), p. 1248-1252, 2000. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10273.x>.

CHIRIGE, J.; BUERA, M. P. **Water Activity, Water Glass Dynamics, and the Control of Microbiological Growth in Foods**. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 36, n. 5, p. 465-500, 1996. <https://doi.org/10.1080/10408399609527736>.

COLLARES, F. P.; FINZER, J. R. D. **A transição vítrea em produtos alimentícios**. Brazilian Journal of Food Technology, v. 5, p. 117-130, 2002.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. **Recent developments in microencapsulation of food ingredients**. Drying Technology, London, v. 23, n. 7, p. 1361-1394, 2005. <https://doi.org/10.1081/DRT-200063478>.

FELLOWS, P. J. **Food Processing Technology - Principles and Practice**. Artmed: São Paulo, 2006.

FILKOVÁ, I.; HUANG, L.X.; MUJUMDAR, A.S. **Industrial spray drying systems**. In: MUJUMDAR, A.S. Handbook of Industrial Drying. 3.ed. Boca Raton: CRC, 2006. Cap.10. p. 215.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. **Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview**. Food Research International, 40, p. 1107–1121, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004>.

GOFF, H.D; VERESPEJ, E.; JERMANN, D. **Glass transitions in frozen sucrose solutions are influenced by solute inclusions within ice crystals**. Thermochemica Acta, v. 399, p.43-55, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0040-6031\(02\)00399-4](https://doi.org/10.1016/S0040-6031(02)00399-4).

JIN, X., HARMAN, G. E., & TAYLOR, A. G. **Conidial biomass and desiccation tolerance of *Trichoderma harzianum* produced at different medium water potentials**. Biological Control, 1, 237–243, 1991. [https://doi.org/10.1016/1049-9644\(91\)90072-8](https://doi.org/10.1016/1049-9644(91)90072-8).

JIN, X.; CUSTIS, D. **Microencapsulating aerial conidia of *Trichoderma harzianum* through spray drying at elevated temperatures**. Biological control, v. 56, p. 202-208, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.11.008>.

LABMAQ do Brasil Ltda. (2003) **Manual de Operações do Mini-Spray Dryer MSD 0.5**. Departamento de Engenharia. Disponível em <[www.engenharia@labmaqdobrasil.com.br](http://www.engenharia@labmaqdobrasil.com.br)>.

LIU, X-D.; ATARASHI, T.; FURURA, T.; YOSHII, H.; AISHIMA, S.; OHKAWARA, M.; LINKO, P. **Microencapsulation of emulsified hydrophobic flavours by spray drying**. Drying Technology, v. 19, p. 1361-1374, 2001. <https://doi.org/10.1081/DRT-100105293>.

MA, X.; XIAOBING, W.; CHENG, J.; NIE, X.; YU, X.; ZHAO, Y.; WANG, W. **Microencapsulation of *Bacillus subtilis* B99-2 and its biocontrol efficiency against *Rhizoctonia solani* in tomato**. Biological Control, v. 90, p. 34-41, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.05.013>.

MASTERS, K. **Spray Drying Handbook**. 5. ed. Nova York: Longman, 1991.

MUÑOZ-CELAYA, A. L.; et al. **Spray-drying microencapsulation of *Trichoderma harzianum* conidias in carbohydrate polymers matrices**. Carbohydrate polymers, v. 88, p. 1141-1148, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.12.030>.

ROCKLAND, L. B.; BEUCHAT, L. R. **Water Activity: Theory and Applications to Food**. Marcel Dekker, New York, p. 404, 1987.

ROOS, Y. **Characterization of Food Polymers Using State Diagrams**. Journal of Food Engineering, p. 340-360, 1995. [https://doi.org/10.1016/0260-8774\(95\)90050-L](https://doi.org/10.1016/0260-8774(95)90050-L).

ROSENBER, M.; KOPELMAN, I. J.; TALMON, Y. **Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 38, 1990.

SIMONIN, H., BENEY, L., GERVAIS, P. **Sequence of occurring damages in yeast plasma membrane during dehydration and rehydration: Mechanisms of cell death**. Biochimica et Biophysica Acta 1768, p. 1600–1610, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.03.017>.

SLADE, L., LEVINE, H., LEVOLELLA, J., WANG, M. **The glassy state phenomenon in applications for the food industry: application of the food polymer science approach to structure-function relationships of sucrose in cookie and cracker systems**. Journal of the Science of Food and Agriculture., v. 63, p.133-176, 1993. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740630202>.

SRITHAM, E.; GUNASEKARAN, S. **Thermal evaluation of sucrose-maltodextrin-sodium citrate bioglass: Glass transition temperature**. Food Hydrocolloids, v. 60, p. 589-597, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.030>.

TEDESCHI, C.; LEUENBERGER, B.; UBBINK, J. **Amorphous–amorphous phase separation in hydrophobically-modified starch–sucrose blends I**. Phase behavior and



thermodynamic characterization. Food Hydrocolloids, v.58, p.75-88, 2016.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.02.021>.

### **CAPÍTULO 3 - AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA DE LETALIDADE E USO DE DIFERENTES MATERIAIS DE PAREDE NO PROCESSO DE MICROENCAPSULAÇÃO DE CONÍDIOS DE *TRICHODERMA ASPERELLUM* POR *SPRAY DRYING***

#### **3.1 Introdução**

O uso de microrganismos tem se destacado no cenário mundial visando substituição parcial ou total de produtos químicos no controle de doenças na agricultura (BARKER, 2003; CARVALHO, 2006; WARD et al., 2012; POPP et al., 2013). O controle biológico é uma alternativa à agricultura sustentável e de alta produtividade, sendo que a utilização de biofungicidas resulta em importantes benefícios à sociedade se comparado com fungicidas químicos, tais como redução de contaminação química nos alimentos, solos e águas (WAAGE, 1997; CARVALHO, 2006; POPP et al., 2013).

*Trichoderma* spp., compreende fungos que apresentam potencial para promoção de crescimento vegetal, sendo suas espécies as mais utilizadas para controle de fitopatógenos no mundo (MONTE, 2001; OMAR et al., 2006; CARVALHO et al., 2014; BAE, et al., 2016; SAWANT et al., 2017). Um dos problemas associados aos produtos formulados é a baixa viabilidade do agente biológico durante o armazenamento e aplicação no campo, uma vez que fatores climáticos afetam sua sobrevivência. Devido a este fato, a microencapsulação vem sendo estudada para prolongar a vida útil, controlar a liberação do microrganismo e protegê-lo de agentes do ambiente e, dessa forma, melhorar seu desempenho (BURGAIN et al., 2011; JOHN et al., 2011; JIN & CUSTIS, 2011; MUÑOZ-CELAYA et al., 2012; LI et al., 2017).

A microencapsulação por *spray drying* consiste em um processo no qual pode-se fornecer uma barreira física ao material do núcleo, protegendo-o de certas condições do ambiente e, dessa forma, proporcionando aumento de vida útil do produto (DESAI, PARK, 2005; GHARSALLAOUI et al., 2007; ZUIDAM & SHIMONI, 2009; JAMEKHORSHID et al., 2014).

Uma etapa fundamental no processo de microencapsulação por *spray dryer* é a escolha do material de parede, baseado nas propriedades físicas e químicas do núcleo, do custo do material e de sua aplicação (GHARSALLAOUI et al., 2007). Diversos materiais têm sido reportados no processo de microencapsulação, como alguns carboidratos (COMUNIAN et al., 2011; ARSLAN et al., 2015; SANTOS et al., 2015; AMARA et al., 2017; SANCHEZ-REINOSO et al., 2017; CAMPELO et al., 2018; WU et al., 2018; KAVOOSI et al., 2018;

RAMAKRISHNAN et al., 2018) e proteínas (ARSLAN et al., 2015; IXTAINA et al., 2015; CAMPELO et al., 2018).

A temperatura de entrada do ar de secagem durante o processo de *spray drying* também é uma variável determinante na sobrevivência dos conídios de *Trichoderma spp.* (JIN, CUSTIS, 2011; MUÑOZ-CELAYA et al., 2012; FERNÁNDEZ-SANDOVAL et al., 2012). Dessa maneira, o estudo da morte microbiana é de fundamental importância, uma vez que o processo de microencapsulação por *spray drying* necessita da aplicação de calor para a realização do processo de desidratação, sendo que temperaturas muito elevadas podem causar dano à membrana do conídio e temperaturas baixas podem não ser suficientes para a secagem (JIN, CUSTIS, 2011; FERNÁNDEZ-SANDOVAL et al., 2012). Apesar da importância dessa informação, não há na literatura trabalhos que avaliaram a temperatura de letalidade dos conídios de *Trichoderma asperellum* em secagem por *spray dryer*.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi estudar a temperatura de letalidade dos conídios de *Trichoderma asperellum* durante o processo de *spray drying* sem adição de material de parede. Além disso, caracterizar cinco diferentes materiais, sacarose (SU), maltodextrina DE20 (MD20), soro de leite em pó (WH), goma arábica (GA) e lactose (LA) e avaliar o potencial de aplicação desses agentes na microencapsulação dos conídios de *Trichoderma asperellum* por *spray drying*.

## **3.2 Material e Métodos**

### **3.2.1 Suspensão de conídios de *Trichoderma asperellum* e materiais de parede**

As suspensões dos conídios de *Trichoderma asperellum* utilizadas neste estudo foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Biocontrole Farroupilha S.A – Lallemand, localizado na cidade de Patos de Minas-MG-Brasil. As suspensões de *Trichoderma asperellum* foram caracterizadas antes de cada experimento em relação à: umidade, atividade de água, concentração de conídios, germinação e unidades formadoras de colônia (UFC).

Para avaliar o uso de diferentes materiais de parede no processo de microencapsulação foram utilizados cinco materiais diferentes, sacarose (SU) (açúcar cristal comercial) (Brasil), maltodextrina DE20 (MD20) (Galena, Brasil), goma arábica (GA) (Nexira Brasil Comercial Ltda, Brasil), soro de leite em pó (WH) (Sooro, Brasil) e lactose (LA) (New Química, Brasil). Os materiais de parede foram caracterizados quanto à umidade, atividade de água, higroscopicidade e solubilidade em água.

### 3.2.2 Estudo da temperatura de letalidade

As suspensões dos conídios de *Trichoderma asperellum* foram alimentadas ao *spray dryer* para avaliação da letalidade do fungo com e sem adição de material de parede de secagem.

As secagens utilizando apenas os conídios de *Trichoderma asperellum* foram realizadas com temperatura de entrada ( $T_i$ ) de 60, 70, 80, 90, 100, 110 e 120°C, resultando em temperaturas de saída do ar de secagem ( $T_o$ ) de 35, 44, 53, 65, 71, 80 e 88°C, respectivamente.

#### 3.2.2.1 Processo de microencapsulação

Para realizar o processo de microencapsulação dos conídios de *Trichoderma asperellum*, após a adição do material de parede a solução foi mantida sob agitação constante durante todo o processo. A temperatura do ar de entrada utilizada foi de 90°C uma vez que se observou pelos estudos prévios da letalidade que essa era uma temperatura crítica. A concentração de material de parede estabelecida foi de 1:5 (massa seca de conídios de *Trichoderma asperellum*:massa seca de material de parede)

Em todos os experimentos foram utilizadas a vazão de alimentação da amostra ao secador de 0,6 L h<sup>-1</sup>, a vazão do ar de secagem de  $9,90 \times 10^4$  L h<sup>-1</sup> e a vazão do ar de atomização de 2.400 L h<sup>-1</sup>.

Após o processo de *spray drying* todos os pós produzidos foram armazenados sob refrigeração e posteriormente caracterizados quanto à: umidade, atividade de água, higroscopicidade, solubilidade em água e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para realizar as análises microbiológicas os pós foram reidratados até a mesma concentração de esporos da solução alimentada ao secador; e caracterizados quanto à germinação e UFC, com objetivo principal de avaliar a quantidade de conídios viáveis (CV) e percentual de sobrevivência dos conídios (SP).

### **3.2.3 Ensaios de caracterização dos materiais de parede, suspensão dos conídios e micropartículas de conídios de *Trichoderma asperellum* obtidas pelo processo de *spray drying***

#### **3.2.3.1 Análises físico-químicas**

A umidade das soluções de *Trichoderma asperellum*, dos materiais de parede e das micropartículas foi determinada de acordo com a metodologia descrita no Item 2.2.4.1. A atividade de água ( $a_w$ ), higroscopicidade e solubilidade foram determinadas conforme as metodologias expostas nos itens 2.2.4.2, 2.2.4.3 e 2.2.4.4, respectivamente.

#### **3.2.3.2 Análises microbiológicas**

Para avaliar a porcentagem de CV após o processo de *spray drying* realizou-se o teste de germinação, conforme apresentado no item 2.2.4.5.

Para a contagem do número de UFC foram realizadas diluições seriadas das amostras de conídios de *Trichoderma asperellum* e posterior plaqueamento em placas de petri contendo meio de cultura PDA (KASVI, Brasil). Utilizou-se triton (Dinâmica, Brasil) ( $0,25 \text{ mL L}^{-1}$ ) para limitar o diâmetro das colônias. Ácido lático ( $0,25 \text{ mL L}^{-1}$ ) também foi adicionado ao meio de cultura para evitar contaminação bacteriana. Após o plaqueamento das amostras as placas foram incubadas à  $25^\circ\text{C}$  em câmara B.O.D. (Ethiktechnology, Brasil) de acordo com metodologia descrita por Jin e Custis (2011) com algumas modificações. A contagem de células viáveis foi feita após 48 h da incubação e expressa em UFC por g ( $\log \text{ UFC g}^{-1}$ ). A porcentagem de sobrevivência dos conídios de *Trichoderma asperellum* foi avaliada relacionando o número de UFC da solução de alimentação do *spray dryer* com o número de UFC do pó obtido após o processo de *spray drying*, o qual foi diluído em água na proporção de 1g de pó:9g de água estéril (PICOT & LACROIX, 2004).

#### **3.2.3.3 Microscopia eletrônica de varredura**

As microscopias eletrônicas de varredura (MEV) das amostras de pó dos conídios microencapsulados e da amostra controle (conídios secos em *spray dryer* sem material de parede) foram realizadas utilizando um microscópio eletrônico de varredura convencional (Marca: Zeiss, Modelo: EVO MA10). O recobrimento das amostras com ouro foi realizado utilizando um metalizador (Marca: LEICA, Modelo: EM SCD 050), foi usada uma corrente de

50 mA por 120 segundos. As análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica de Varredura da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia.

### 3.3 Resultados e discussão

#### 3.3.1 Estudo da temperatura de letalidade dos conídios de *Trichoderma asperellum* secos em *spray drying* sem materiais de parede

Para avaliar as propriedades físicas da suspensão dos conídios de *Trichoderma asperellum* e dos pós após o processo de secagem foram feitas análises de umidade e  $a_w$  (Tabela 3.1), sendo a viabilidade celular dos microrganismos avaliada por CV e SP (Figura 3.1).

**Tabela 3.1.** Propriedades físico-químicas e microbiológicas da suspensão dos conídios de *Trichoderma asperellum* e das micropartículas obtidas após o processo de *spray drying*.

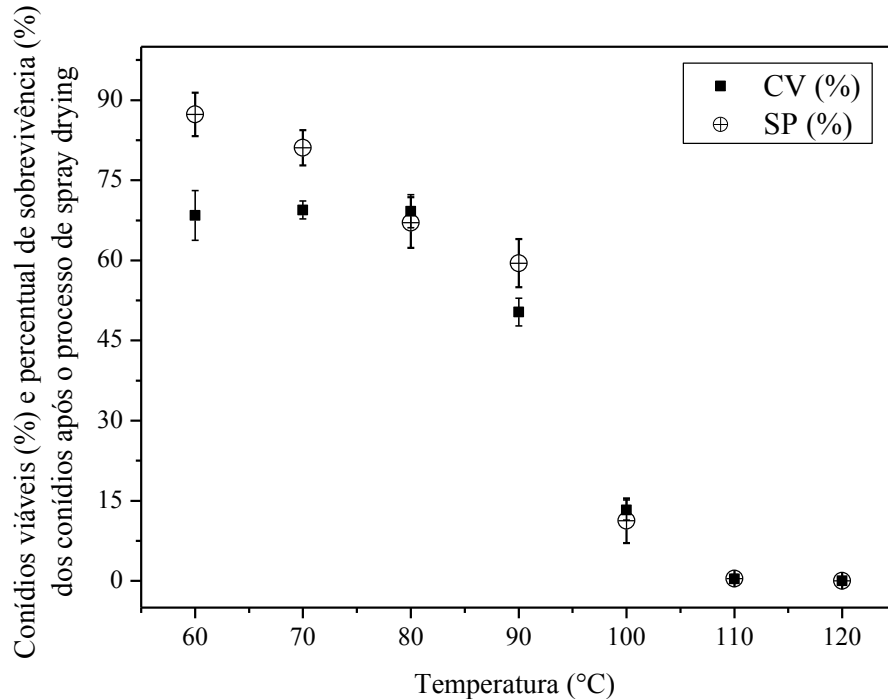
T <sub>i</sub> /T <sub>o</sub> (°C)	Umidade (%)	$a_w$	Germinação (%)	UFC (UFCg <sup>-1</sup> )
<b>Suspensão de conídios de <i>Trichoderma asperellum</i></b>				
	97,81 ± 0,28	0,98 ± 0,00	97,13 ± 0,52	3,23×10 <sup>8</sup>
<b>Conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> em pó</b>				
60/35	7,62 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,34 ± 0,00 <sup>a</sup>	67,11 ± 5,21 <sup>a</sup>	2,65×10 <sup>8</sup>
70/44	6,91 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,32 ± 0,00 <sup>a</sup>	67,44 ± 5,36 <sup>a</sup>	2,39×10 <sup>8</sup>
80/53	5,00 ± 0,25 <sup>c</sup>	0,34 ± 0,01 <sup>a</sup>	67,22 ± 3,07 <sup>a</sup>	2,27×10 <sup>8</sup>
90/65	4,45 ± 0,22 <sup>d</sup>	0,20 ± 0,00 <sup>c</sup>	48,89 ± 4,99 <sup>b</sup>	2,15×10 <sup>8</sup>
100/71	4,26 ± 0,14 <sup>d</sup>	0,23 ± 0,01 <sup>c</sup>	12,89 ± 2,37 <sup>c</sup>	3,64×10 <sup>7</sup>
110/80	4,55 ± 0,07 <sup>d</sup>	0,24 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,33 ± 0,70 <sup>d</sup>	1,35×10 <sup>6</sup>
120/88	4,16 ± 0,10 <sup>d</sup>	0,29 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>d</sup>	1,62×10 <sup>5</sup>

Foi verificado que utilizando temperaturas de entrada para o ar de secagem de 60 e 70°C os dados obtidos de umidade para os pós foram mais altos do que quando se utilizou temperaturas acima de 80°C. Tal fato ocorreu porque as temperaturas mais altas aumentam o gradiente de temperatura dentro da câmara de secagem, conseqüentemente facilita-se a transferência de calor e o processo de desidratação.

Os valores de  $a_w$  obtidos neste ensaio foram baixos, sendo inferiores à 0,35. É recomendado que tenham baixa atividade de água para sua estabilidade enquanto armazenados (ROCKLAND; BEUCHAT, 1987; CHIRIGE; BUERA, 1996; FELLOWS, 2006).

Na Figura 3.1 estão apresentados os resultados de CV e SP dos conídios de *Trichoderma asperellum* em função da temperatura de entrada do ar de secagem na câmara do *spray dryer*.

**Figura 3.1.** Conídios viáveis e percentual de sobrevivência dos conídios de *Trichoderma asperellum* em função da temperatura de entrada do ar de secagem na câmara do *spray dryer* - Experimentos controle (sem adição de material de parede).



Pela Tabela 3.1 e Figura 3.1 pode-se observar que o processo de secagem em *spray dryer* causou acentuada redução na porcentagem de germinação e UFC quando alterou-se a  $T_i$  do ar de secagem de 60 para 90°C. À 60°C a redução na germinação e UFC foi de  $31,59 \pm 4,66\%$  e  $12,68 \pm 4,06$ , respectivamente. À 90°C a redução na germinação e UFC foi de  $49,67 \pm 2,60\%$  e  $40,52 \pm 4,50$ , respectivamente. Os cálculos foram feitos comparando-se com o valor médio de germinação e UFC inicial da suspensão de conídios alimentada ao secador (Tabela 3.1). A partir da temperatura de entrada do ar de secagem de 100°C o processo tornou-se inviável, uma vez que a porcentagem de CV and SP foi quase insignificante.

### 3.3.2 Caracterização dos materiais de parede utilizados no processo de microencapsulação e das micropartículas de conídios de *Trichoderma asperellum* obtidas por *spray drying*

As propriedades físicas e químicas do material de parede podem produzir materiais de diferentes características (RODRÍGUEZ-RESTREPO et al., 2017), desta forma, foram feitos ensaios de caracterização dos materiais de parede e para comparação dos resultados também foram feitos testes físico-químicos e microbiológicos para a suspensão e pós dos conídios de



*Trichoderma asperellum* formuladas com SU, MD20, GA, WH and LA, conforme apresentados na Tabela 3.2.

**Tabela 3.2.** Propriedades físico-químicas e microbiológicas obtidas antes e após o processo de *spray drying*.

<b>Materiais de parede</b>				
<b>Amostra</b>	<b>Umidade (%)</b>	<b>a<sub>w</sub></b>	<b>Higroscopicidade (g 100g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Solubilidade (%)</b>
SU	2,68 ± 0,06 <sup>d</sup>	0,63 ± 0,03 <sup>a</sup>	2,20 ± 0,61 <sup>d</sup>	99,68 ± 0,18 <sup>†</sup>
MD20	4,80 ± 0,20 <sup>c</sup>	0,54 ± 0,01 <sup>b</sup>	12,75 ± 0,17 <sup>a</sup>	92,72 ± 0,48 <sup>b</sup>
GA	10,55 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,44 ± 0,00 <sup>c</sup>	8,24 ± 0,13 <sup>b</sup>	13,23 ± 1,1 <sup>d</sup>
WH	6,15 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,60 ± 0,00 <sup>a</sup>	7,93 ± 0,10 <sup>c</sup>	84,36 ± 0,46 <sup>c</sup>
LA	2,77 ± 0,07 <sup>d</sup>	0,33 ± 0,01 <sup>d</sup>	0,28 ± 0,17 <sup>c</sup>	5,46 ± 0,42 <sup>c</sup>

<b>Suspensão de conídios de <i>Trichoderma asperellum</i></b>				
<b>Amostra</b>	<b>Umidade (%)</b>	<b>a<sub>w</sub></b>	<b>Germinação (%)</b>	<b>UFC (UFC g<sup>-1</sup>)</b>
SU	93,19 ± 0,01	0,95 ± 0,01 <sup>a</sup>	97,33 ± 0,58 <sup>a</sup>	3,48 × 10 <sup>8</sup>
MD20	93,88 ± 0,01	0,94 ± 0,01 <sup>a</sup>	97,33 ± 0,58 <sup>a</sup>	3,06 × 10 <sup>8</sup>
GA	92,82 ± 0,02	0,93 ± 0,00 <sup>a</sup>	98,00 ± 1,00 <sup>a</sup>	2,73 × 10 <sup>8</sup>
WH	92,95 ± 0,02	0,94 ± 0,00 <sup>a</sup>	97,33 ± 0,58 <sup>a</sup>	3,48 × 10 <sup>8</sup>
LA	92,82 ± 0,02	0,93 ± 0,01 <sup>a</sup>	97,33 ± 0,58 <sup>a</sup>	3,79 × 10 <sup>8</sup>

<b>Conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> em pó</b>						
<b>Amostra</b>	<b>Umidade (%)</b>	<b>a<sub>w</sub></b>	<b>Higroscopicidade (g 100g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Solubilidade em água (%)</b>	<b>Germinação (%)</b>	<b>UFC (UFC g<sup>-1</sup>)</b>
SU	2,32 ± 0,03 <sup>e</sup>	0,26 <sup>c</sup> ± 0,01	2,15 ± 0,35 <sup>e</sup>	87,66 <sup>a</sup> ± 2,27	78,67 ± 1,15 <sup>b</sup>	2,87 × 10 <sup>8</sup>
MD20	3,40 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,37 <sup>a</sup> ± 0,01	14,63 ± 0,07 <sup>b</sup>	82,86 <sup>b</sup> ± 0,36	82,67 ± 2,08 <sup>a</sup>	2,85 × 10 <sup>8</sup>
GA	6,04 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,37 <sup>a</sup> ± 0,03	15,82 ± 0,18 <sup>a</sup>	83,10 <sup>b</sup> ± 0,94	82,33 ± 2,08 <sup>a</sup>	2,23 × 10 <sup>8</sup>
WH	3,07 ± 0,10 <sup>d</sup>	0,33 <sup>ab</sup> ± 0,01	13,98 ± 0,08 <sup>c</sup>	85,70 <sup>a</sup> ± 0,12	81,67 ± 1,15 <sup>a</sup>	2,88 × 10 <sup>8</sup>
LA	3,27 ± 0,06 <sup>c</sup>	0,28 <sup>c</sup> ± 0,01	4,63 ± 0,07 <sup>d</sup>	78,21 <sup>c</sup> ± 1,97	68,00 ± 1,00 <sup>c</sup>	1,70 × 10 <sup>8</sup>

Os valores obtidos de a<sub>w</sub> para os materiais de parede variaram de 0,33 ± 0,01 à 0,63 ± 0,03, enquanto que para as micropartículas variaram de 0,26 ± 0,01 à 0,37 ± 0,03. Em ambos os casos os valores foram inferiores ao estabelecidos como seguros na literatura, de 0,60, para armazenamento (ROCKLAND; BEUCHAT, 1987; FELLOWS, 2006), sendo assim, considerados estáveis microbiologicamente para armazenamento, impedindo, portanto, o desenvolvimento de outros microrganismos e a alteração de características do produto pelo desenvolvimento dos mesmos (ROCKLAND; BEUCHAT, 1987; CHIRIGE; BUERA, 1996; FELLOWS, 2006). No estudo de Ramakrishnan et al. (2018) os valores de a<sub>w</sub> variaram de 0,24 ± 0,03 à 0,33 ± 0,03, utilizando maltodextrina e goma arábica como materiais de parede no processo de microencapsulação de compostos bioativos em suco de tamarindo por *spray drying*.

Açúcares menores são, geralmente, de natureza muito higroscópica, devido às fortes interações com moléculas de água, sobretudo na ausência de um padrão de cristalização, os chamados sólidos amorfos (KAREL et al., 1994; IMAMURA et al., 2013; LIANG et al., 2015). Os resultados de higroscopicidade da sacarose obtidos com este estudo divergiram com o relatado pela literatura. Uma vez que a sacarose apresentou o menor resultado ( $2,20 \pm 0,61 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ ), sendo bastante inferior aos demais materiais e a maltodextrina DE20 apresentou o resultado mais alto de todos os materiais ( $12,75 \pm 0,17 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ ). O aumento de higroscopicidade de maltodextrinas está associado ao aumento do valor de DE (dextrose equivalente). Carboidratos têm o efeito de absorção de água devido às ligações entre hidrogênio e grupos hidroxila, presentes nas moléculas de água e regiões amorfas dos sólidos, respectivamente (SAMUHASANEETOO et al., 2004; PHISUT, 2012). A maltodextrina utilizada neste trabalho tem alto valor de DE (20), sendo assim, conclui-se que o maior valor de higroscopicidade em comparação com os outros materiais avaliados seja devido a isto.

A solubilidade de todos os materiais de parede foi considerada adequada para utilização em microencapsulação por *spray drying*,  $5,46 \pm 0,24$  à  $99,68 \pm 0,18\%$ , pois tal método necessita de materiais, pelo menos, parcialmente solúveis em água (DESAI, PARK, 2005), e durante os ensaios de secagem nenhum material causou entupimento na mangueira que bombeava a suspensão ou no bico atomizador, problemas que normalmente ocorrem em secagens envolvendo materiais insolúveis em água ou muito viscosos (KRZYSZTOF, KRZYSZTOF, 2009; MURUGESAN, ORSAT, 2011; MOEJES et al., 2018).

De acordo com Kim, Chen e Pearce (2003) grandes moléculas totalmente insolúveis, tem propensão a precipitar na camada mais externa das micropartículas, diminuindo a eficiência do processo de microencapsulação.

Em estudos de caracterização, Raja et al. (1989), Chronakis (1998) e Neri et al. (2011) relataram que maltodextrinas com diferentes números de DE têm bom desempenho como materiais de parede por formar baixa viscosidade, mesmo quando estão presentes em altas concentrações no meio.

No trabalho de Aghbashlo et al. (2012), foi verificado que a incorporação de sacarose e de lactose, materiais com solubilidades bastante distintas, em misturas com leite em pó desnatado, proporcionou os melhores resultados de eficiência de encapsulação de emulsão de óleo de peixe por *spray drying*,  $84,92 \pm 0,19\%$  e  $84,96 \pm 0,03\%$ , respectivamente. A eficiência de encapsulação foi associada a menor temperatura de transição vítrea da lactose e sacarose, devido a tendência à formação de crosta.

Foi verificado que utilizando temperaturas de entrada para o ar de secagem de 90°C os dados obtidos de umidade para as micropartículas, utilizando diferentes materiais de parede, apresentaram em geral valores inferiores a 6% de umidade, sendo comum para produtos em pó obtidos por esta técnica (MASTER, 1991). Conclui-se também que a umidade obtida para as micropartículas é capaz de fornecer bom armazenamento, pois produtos com baixos valores de umidade podem obter melhor estabilidade ao longo do tempo (MASTER, 1991; FILKOVÁ, 2006). A formulação contendo goma arábica como material de parede apresentou o maior percentual de umidade ( $6,04 \pm 0,06$ ) em relação às demais, e a da sacarose ( $2,32 \pm 0,03$ ) o menor.

Neste estudo a higroscopicidade das micropartículas variou de  $2,15 \pm 0,35 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$  à  $15,82 \pm 0,18 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ , utilizando sacarose e goma arábica como materiais de parede, respectivamente. Estes resultados são semelhantes com os obtidos por Rodrigues-Restrepo et al. (2017) que trabalhou com misturas de goma arábica (GA) e proteínas, leite em pó integral (WMP), proteína isolada de soja (SPI) e leite em pó desnatado (SMP), para microencapsular *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*. Os autores obtiveram resultados de higroscopicidade variando de  $5,56 \pm 0,51$  à  $15,21 \pm 3,02$  (g de água  $100\text{g}^{-1}$  de sólido), utilizando misturas de GA-SPI (relação 25:75) e GA-SMP (relação 50:50), respectivamente.

No trabalho de Ramakrishnan et al. (2018) os valores de higroscopicidade das micropartículas utilizando maltodextrina resistente, maltodextrina e goma arábica foram de  $27,57 \pm 0,05$ ,  $27,91 \pm 0,005$  e  $45,55 \pm 0,05 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ , respectivamente, para a microencapsulação de compostos bioativos em suco de tamarillo por *spray drying*.

Altos valores de higroscopicidade podem formar aglomerações e deixar o material pegajoso com alta tendência de formação de *caking* (GOULA & ADAMAPOULOS, 2008). Apesar do baixo valor higroscópico da sacarose, seu uso como material de parede para microencapsulação em *spray dryer* apresenta uma limitação operacional, devido ao uso de temperaturas elevadas. Acima de temperaturas de 60°C a sacarose pode sofrer mudança de estado, dependendo do valor de atividade de água, devido à transição vítrea, o que acarreta em pegajosidade e aderência do material nas paredes do equipamento (ROOS, 1995; GOOF, VERESPEJ, JERMANN, 2003; SRITHAM, GUNASEKARAN, 2016; TEDESCHI, LEUENBERGER, UBBINK, 2016). Por isso, industrialmente, além de compor material de parede na secagem por *spray dryer*, maltodextrinas são utilizadas para controle de higroscopicidade e prevenção de cristalização (WANG, WANG, 2000; NAWI et al., 2015). A higroscopicidade de um produto está ligada à sua estabilidade física, química e microbiológica.

O estudo do comportamento higroscópico é importante na predição da vida útil do produto e condições de armazenamento (SOUKOULIS et al., 2014; RODRÍGUEZ-RESTREPO et al., 2017).

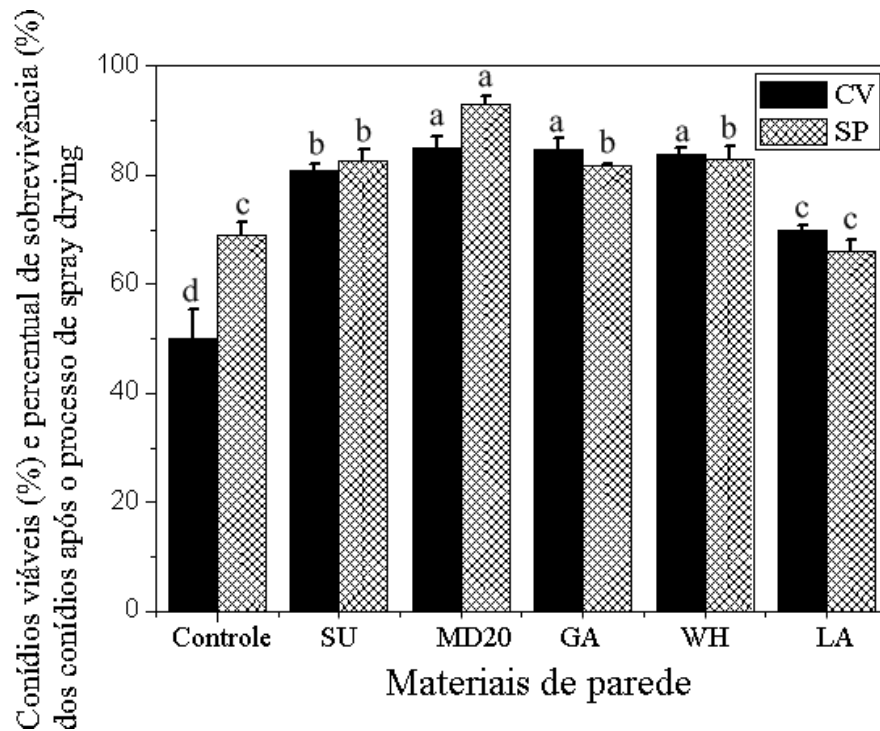
As formulações contendo sacarose, maltodextrina e goma arábica apresentaram resultados de solubilidade semelhantes, o que pode ser explicado pela característica de hidrofiliidade dos carboidratos. A interação hidrofóbica geralmente está relacionada à estrutura química das moléculas, que aumenta com a fração e tamanho das superfícies hidrofóbicas (BUTTERSACK, 2017). Os valores de solubilidade deste estudo variaram de  $78,21 \pm 1,97$  % à  $87,66 \pm 2,27$ , para as amostras produzidas com lactose e sacarose, respectivamente. O valor inferior de solubilidade utilizando lactose como material de parede pode ser atribuído à menor solubilidade deste material em água ( $5,46 \pm 0,42$ ), comparado com outros açúcares, como a sacarose por exemplo (ALAIS, 1985; BHARGAVA, JELEN, 1996; YALKOWSKY, HE, 2003).

A solubilidade das micropartículas obtidas neste estudo produzidas com goma arábica,  $83,10 \pm 0,94$ %, foi análoga ao valor obtido por Rodríguez-Restrepo et al. (2017) em micropartículas de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* microencapsuladas com uma mistura de goma arábica e isolado de proteína de soja (relação 75:25), de  $84,02 \pm 1,63$ %.

Como as concentrações dos materiais de parede foram iguais para todos os tratamentos (1:5 (massa seca de conídios de *Trichoderma asperellum*:massa seca de material de parede)), pode-se concluir que o tipo de material de parede influenciou significativamente na solubilidade do produto em água. Rodríguez-Restrepo et al. (2017) utilizou misturas de 20% massa/volume de proteína e goma arábica nas seguintes proporções: 75:25 50:50 25:75, para estudar a microencapsulação de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* por *spray drying*. Os materiais proteicos utilizados foram leite em pó integral, isolado de proteína de soja e leite em pó desnatado. Foi verificado que a concentração do material de parede afetou significativamente ( $p < 0,05$ ) a solubilidade dos pós produzidos, sendo que para todos os tratamentos avaliados o aumento da concentração de goma arábica resultou no aumento de solubilidade das micropartículas de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*.

Na Figura 3.2 estão apresentados os valores de CV (%) and SP (%) dos conídios de *Trichoderma asperellum* secos em *spray drying* com e sem adição de material de parede (controle), com concentração de 1:5 (massa seca de conídios de *Trichoderma asperellum*:massa seca de material de parede), todas as secagens tiveram a temperatura de entrada do ar de secagem de 90°C.

**Figura 3.2.** Conídios viáveis e percentual de sobrevivência dos conídios de *Trichoderma asperellum* com diferentes materiais de parede (1:5 massa seca de conídios/massa seca de material de parede) após o processo de microencapsulação por *spray drying* com a temperatura de 90 °C.



Observa-se pela Figura 3.2 que os resultados de CV e SP, para todos os materiais de parede avaliados na microencapsulação, foram melhores se comparados com os do controle (sem material de parede). Além disso, não houve diferença significativa ( $p < 0.05$ ), pelo teste de *Tukey*, entre a porcentagem de conídios viáveis para os materiais de parede maltodextrina DE20, goma arábica e soro de leite. Os menores valores de conídios viáveis obtidos foram de  $80,82 \pm 1,19\%$  e  $69,86 \pm 1,03\%$ , utilizando sacarose e lactose como materiais de parede, respectivamente. Por outro lado, a MD20 apresentou os melhores valores de CV e de SP (%) dos conídios de *Trichoderma asperellum*, sendo que  $92,89 \pm 1,47\%$  sobreviveram após o processo de *spray drying*. Muñoz-Celaya et al. (2012) também observaram valores de SP de conídios de *Trichoderma harzianum* na mesma ordem que os obtidos neste trabalho. Esse autores avaliaram o uso maltodextrina DE10, maltodextrina DE20, goma arábica e uma combinação 1:1 de maltodextrina DE10 com goma arábica como materiais de parede na microencapsulação de conídios de *Trichoderma harzianum*. A mistura 1:1 de maltodextrina DE10-goma arábica utilizando temperatura de entrada de 120°C produziu o melhor resultado do trabalho, que foi um SP de 86%. O tratamento utilizando apenas MD20 obteve 75,39% de SP dos conídios, utilizando uma temperatura de secagem na entrada mais elevada, 150°C.

Na faixa experimental avaliada, em relação aos demais materiais de parede investigados, percebe-se que não houve diferença estatística ( $p < 0.05$ ) pelo teste de *Tukey*, no SP (%) dos conídios após a microencapsulação para as formulações de sacarose ( $82,55 \pm 2,01\%$ ), goma arábica ( $81,59 \pm 0,37\%$ ) e soro de leite ( $82,84 \pm 2,35\%$ ).

O processo de microencapsulação utilizando lactose como material de parede apresentou o pior SP (%),  $66,17 \pm 2,09\%$  dos conídios se mantiveram viáveis. Esse resultado é bem inferior aos encontrados por outros autores ao utilizar outros materiais de parede (JIN & CUSTIS, 2011; MUÑOZ-CELAYA et al., 2012) na microencapsulação de conídios de *Trichoderma spp.* por *spray drying*.

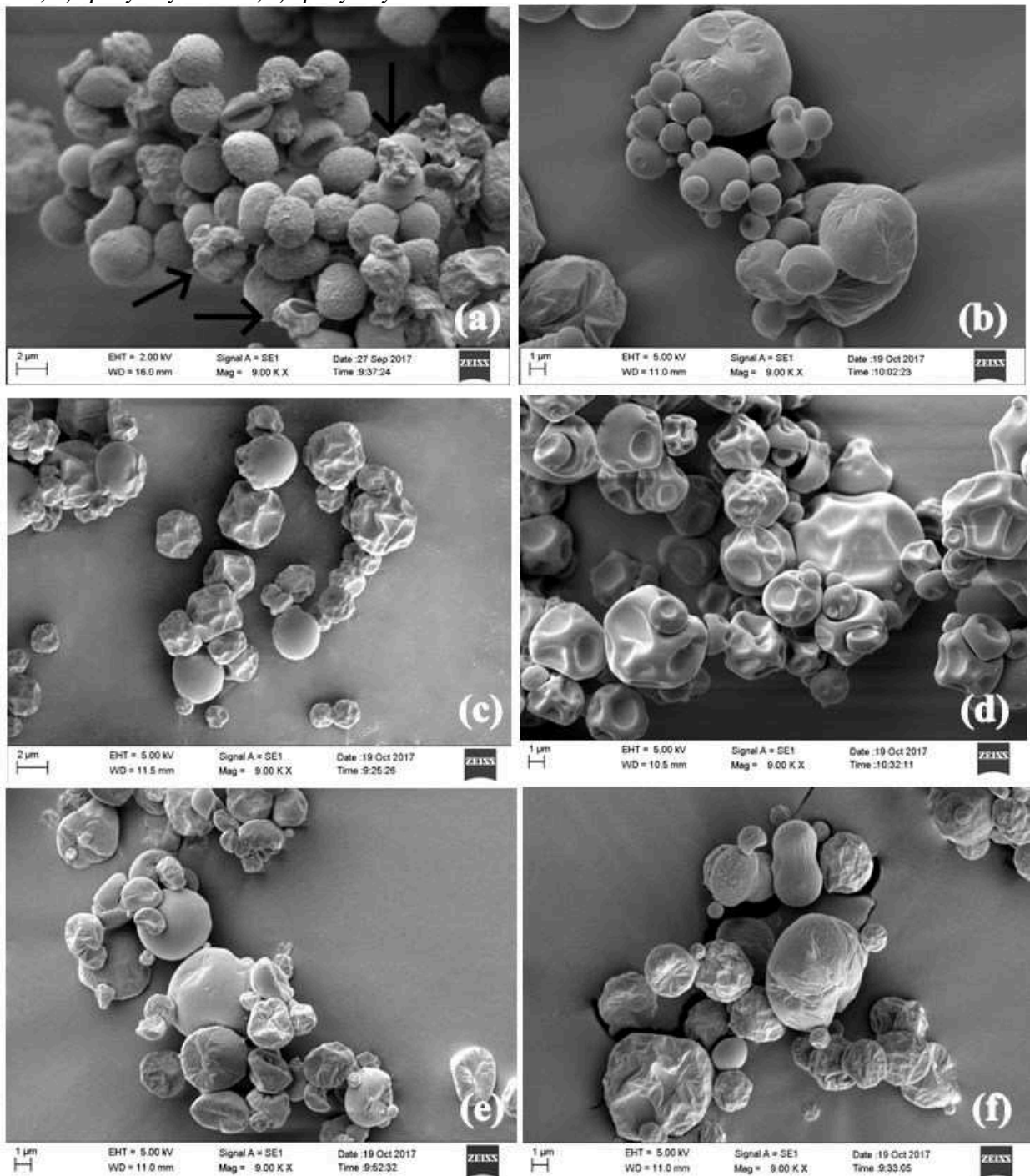
No trabalho de Tang e Li (2013) foi verificado que a adição de lactose em emulsões de proteína de soja secas por *spray drying* melhorou a eficiência de retenção do material. Gharsallaoui et al., 2011 explicam que carboidratos fornecem um efeito de proteção para filmes interfaciais de proteínas devido a interação carboidrato-proteína. Entretanto, Tang e Li (2013) observaram que a adição de lactose diminuiu significativamente a estabilidade de emulsões reconstituídas. No trabalho de Faldt and Bergenstahl (1996) foi avaliada a microencapsulação de óleo de soja (30% em peso seco) por *spray drying* utilizando misturas de lactose e proteína de soro em diferentes proporções em peso, 99/1, 95/5, 80/20, 60/40, 40/60 e 20/80. Pela avaliação dos materiais obtidos após o processo de secagem foi verificado que os pós contendo maiores concentrações de lactose apresentaram um aumento no tamanho das gotículas de emulsão, após redispersão, em comparação com a emulsão anterior à secagem. Também foi observado liberação de óleo para os pós com maiores concentrações de lactose após armazenamento. Todavia, baixas concentrações de lactose não causaram aumento no tamanho de gotícula, nem forneceram liberação de óleo para as superfícies do pó.

A microencapsulação por atomização de *Penicillium frequentans* utilizando leite desnatado como material de parede e temperatura do ar de entrada de  $150^{\circ}\text{C}$  resultou em uma sobrevivência de apenas 28% (GUIJARRO et al., 2006). Horaczek e Viernsteis (2004) avaliaram a adição de uma mistura aquosa de leite desnatado e polivinilpirrolidona (PVP K90) como matriz de encapsulação de conídios do fungo *Beuveria brongniartii*. Segundo os autores, a secagem por *spray drying* apresentou sérios danos ao material fúngico, resultando em um pó com baixos valores de germinação, após 24 horas de incubação, de  $36,7 \pm 6,9\%$ ,  $35,0 \pm 7,8\%$  e  $3,0 \pm 2,1\%$ , utilizando temperaturas do ar de entrada de  $60^{\circ}\text{C}$ ,  $80^{\circ}\text{C}$  e  $100^{\circ}\text{C}$ , respectivamente, sendo que uma amostra controle da solução alimentada ao secador apresentou após 24 h de incubação  $96,4 \pm 1,5\%$  de germinação. Jin e Custis (2011) fizeram um estudo de

microencapsulação com 2% (massa/volume) de solução, e diferentes níveis de temperatura  $T_i/T_o$  (Temperatura de entrada/Temperatura de saída) ( $^{\circ}\text{C}$ ), variando a  $T_i$  do ar de 40 a  $140^{\circ}\text{C}$  para a microencapsulação de conídios de *Trichoderma harzianum*. Os experimentos mostraram que os melhores resultados de UFC  $\text{g}^{-1}$  foram nas temperaturas de 50 a  $81^{\circ}\text{C}$ , sendo a configuração de  $60/31^{\circ}\text{C}$  ( $T_i/T_o$ ) a de maior SP (%), aproximadamente 70%, sendo que os valores de CFU variaram de  $5 \times 10^{10}$  à  $5,8 \times 10^{10}$  Log UFC  $\text{g}^{-1}$  de pó. E configurações com temperaturas mais altas,  $120/140^{\circ}\text{C}$  ( $T_i/T_o$ ) apresentaram os menores valores de UFC  $\text{g}^{-1}$  de pó, como era esperado ( $2,9 \times 10^8$  à  $6,9 \times 10^8$  Log UFC  $\text{g}^{-1}$  de pó seco por *spray drying*).

As microscopias eletrônicas de varredura dos conídios de *Trichoderma asperellum* secos sem a adição de material de parede e das micropartículas de conídios de *Trichoderma asperellum* produzidas com os materiais de parede (SU, MD20, GA, WP e LA) são mostradas na Figura 3.3.

**Figura 3.3.** Micrografias eletrônicas de varredura de micropartículas secas por *spray drying* (fotos tiradas a 9000 x): a) controle; b) *spray dryer* SU; c) *spray dryer* MD20; d) *spray dryer* GA; e) *spray dryer* WH; f) *spray dryer* LA.



Observa-se pela Figura 3.3 (a), em que se tem a amostra controle, que os esporos estão livres e sem qualquer revestimento. Constata-se a presença de conídios com a membrana rompida e/ou deformada, muitos apresentam-se também murchos e danificados, impedindo assim o desenvolvimento dos mesmos, o que justifica os baixos valores de conídios viáveis e percentual de sobrevivência. Segundo Maheshwari (2000) componentes celulares são



normalmente danificados pelo calor, pois quando aquecidos à determinadas temperaturas as enzimas e as membranas dos fungos mudam sua estrutura, comprometendo a proteção e regulação do ambiente celular, afetando drasticamente seu desenvolvimento.

Nas microscopias das formulações produzidas utilizando materiais de parede (Figura 3.3 – b à f) verifica-se que suas morfologias são claramente diferentes da controle, apresentando formação de uma estrutura ao redor dos conídios em todos os tratamentos. Todas as formulações apresentaram-se (Figura 3.3 – c à f), com exceção da formulação com sacarose (Figura 3.3 - b), formação de matriz irregular, de formato indefinido, com partículas deformadas e amolgadas, e de tamanhos variados, sendo estas morfologias características de pós secos por *spray drying* (TONON et al., 2011; DI-BATTISTA et al., 2015), sendo que neste trabalho as partículas com maior semelhança morfológica são as de maltodextrina DE20 e goma arábica, semelhança esta também observada no trabalho de Battista et al. (2015). Na formulação com sacarose (Figura 3.3 - b) foi verificado que a maior parte das partículas apresenta-se com uma matriz regular e de formato esférico, não sendo encontrados conídios descobertos.

Não foi verificado nenhum esporo sem cobertura nas formulações contendo MD20 e soro de leite, o que pode justificar os  $92,89 \pm 1,47\%$  e  $82,84 \pm 2,35\%$  de sobrevivência dos conídios, respectivamente. A morfologia das partículas deste estudo formuladas com MD20 é semelhante com as imagens do trabalho de Muñoz-Celaya (2012) que microencapsularam conídios de *Trichoderma harzianum* por *spray drying*, utilizando temperatura de entrada do ar de 150°C e maltodextrina DE10 e goma arábica como materiais de parede.

Nas formulações contendo goma arábica (Figura 3.3 - d) e lactose (Figura 3.3 - f) foi verificada a presença de alguns esporos sem cobertura de material de parede. Acredita-se que a solubilidade da goma arábica ( $13,23 \pm 1,1$ ) e da lactose ( $5,46 \pm 0,42$ ) tenham influenciado nestes resultados, uma vez que esses materiais são menos solúveis que a sacarose ( $99,68 \pm 0,18$ ) e maltodextrina DE20 ( $92,72 \pm 0,48$ ) por exemplo, que se solubilizam e espalham melhor na suspensão de conídios de *Trichoderma asperellum*. Ainda assim, o percentual de sobrevivência dos conídios utilizando goma arábica ( $81,59 \pm 0,37\%$ ) foi considerado satisfatório em comparação com outros estudos (JIN e CUSTIS, 2011; MUÑOZ-CELAYA, 2012).

### 3.4 Considerações finais

O maior percentual de morte dos conídios de *Trichoderma asperellum*, sem proteção, foi obtido quando se utilizou temperaturas de secagem acima de 90°C, sendo que na temperatura de 110°C ocorreu total letalidade dos conídios.

A aplicação de sacarose, maltodextrina DE20, goma arábica, soro de leite e lactose como materiais de parede promoveu a formação de micropartículas de conídios de *Trichoderma asperellum* por *spray drying*. Todos apresentaram características favoráveis à técnica de microencapsulação por *spray drying*, uma vez que apresentaram altas ou moderadas solubilidade em água, além de baixos valores de umidade e atividade de água, que podem afetar positivamente o acondicionamento dos produtos encapsulados ao longo do tempo. Dentre os materiais de parede estudados o que apresentou os melhores resultados de CV (%) e SP (%) foi a maltodextrina DE20, seguida do soro de leite, goma arábica, sacarose e lactose.

De acordo com a avaliação morfológica, em todas as formulações averiguadas observou-se que os tamanhos das partículas não foram homogêneos, o que, entretanto, não é visto como um problema, pois a viabilidade dos conídios não foi afetada. Não foi observado fissuras ou fissuras aparentes na parede das micropartículas, o que colaborou para proteção dos conídios.

De forma geral, acredita-se que os resultados de microencapsulação foram satisfatórios, de acordo com o observado na literatura e uma vez que a maioria dos tratamentos possibilitou cobertura total ao redor de todos os conídios e apenas alguns esporos de algumas formulações estavam descobertos, como pode ser verificado pelas microscopias.

### 3.5 Referências

AGHBASHLO, M.; MOBILI, H.; MADADLOU, A.; RAFIEE, S. **The correlation of wall material composition with flow characteristics and encapsulation behavior of fish oil emulsion.** Food Research International, v. 49 (1), p. 379-388, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.031>.

ALAIS, C. **Ciencia de la leche, principios de técnica lechera.** 4ª ed. Sevilla: Editorial Reverté S.A, p.873, 1985.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). **Official methods of analysis of the association analytical chemists.** 18.ed. Gaithersburg, MD, 2005. 1526p.

AMARA, C.B.; KIM, L.; OULAHAL, N.; DEGRAEVE, P.; GHARSALLAOUI, A. **Using complexation for the microencapsulation of nisin in biopolymer matrices by spray-drying.** Food Chemistry, v. 236, p. 32-40, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.168>.

ARSLAN, S.; ERBAS, M.; TONTUL, I.; TOPUZ, A. **Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* with different wall materials by spray drying.** LWT - Food Science and Technology, v. 63, p. 685-690, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.034>.

BAE, S.J.; MOHANTA, T.K.; CHUNG, J.Y.; RYA, M.; PARK, G.; SHIM, S.; HONG, S.B.; SEO, H.; BAE, D.W.; BAE, I.; KIM, J.J.; BAE, H. ***Trichoderma* metabolites as biological control agents against *Phytophthora* pathogens.** Biological Control, v. 92, January 2016, p. 128-138, 2016. <https://doi.org/10.1007/s002940050431>.

BAEK, J. M., HOWELL, C. R., AND KENERLEY, C. M. **The role of extracellular chitinase from *Trichoderma virens* Gv29-8 in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*.** Curr. Genet. 35: p. 41-50, 1999.

BHARGAVA, A.; JELEN, P. **Lactose Solubility and Crystal Growth as Affected by Mineral Impurities.** Journal of Food Science, v. 61(1), p.1-5. 1996. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1996.tb14754.x>.

BARKER, K. R. **Perspectives on plant and soil nematology.** Annual Review of Phytopathology, v. 41, p.1-25, 2003. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095647>.

BATTISTA, C.A.D.; CONSTENLA, D.; RAMÍREZ-RIGO, M.V.; PIÑA, J. **The use of arabic gum, maltodextrin and surfactants in the microencapsulation of phytosterols by spray drying.** Powder Technology, v. 286, p. 193-201, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2015.08.016>.

BATTISTA, C.A.D; CONSTENLA, D.; RIGO, M.V.R.; PIÑA, J. **Process analysis and global optimization for the microencapsulation of phytosterols by spray drying.** Powder Technology, v. 321, p. 55-65, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2017.08.008>.

BHARGAVA, A.; JELEN, P. **Lactose solubility and crystal growth as affected by mineral impurities.** Journal of Food Science, v. 61(1), p.1-5. 1996. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1996.tb14754.x>.

BURGAIN, J.; GAIANI, C.; LINDER, M.; SCHER, J. **Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications.** Journal of Food Engineering, 104, p. 467-483, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.12.031>.

BUTTERSACK, C. **Hydrophobicity of carbohydrates and related hydroxy compounds.** Carbohydrate Research, v.446-447, p.101-112,, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2017.04.019>.

CAI, Y. Z.; CoRKe, H. **Production and properties of spray-dried *Amaranthus Betacyanin* Pigments.** Journal of Food Science, v. 65, n. 6, p. 1248-1252, 2000. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10273.x>.

CAMPELO, P.H.; SANCHES, E.A; FERNANDES, R.V.B.; BOTREL, D.A.; BORGES, S.V. **Stability of lime essential oil microparticles produced with protein-carbohydrate blends.** Food Research International, v.105, p.936-944, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.034>.

CANO-CHAUCA, M.; STRINGHETA, P. C.; RAMOS, A. M.; CAL-VIDAL, J. **Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization.** Innovative Food Science and Emerging Technologies. Oxford, v. 5, n.4, p.420-427, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2005.05.003>.

CAPARINO, O. A., TANG, J., NINDO, C. I., SABLANI, S. S., POWERS, J. R., & FELLMAN, J. K. **Effect of drying methods on the physical properties and microstructures of mango (Philippine “Carabao” var) powder.** Journal of Food Engineering, 111, p. 135–148, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.01.010>.

CARVALHO, F. P. **Agriculture, pesticides, food security and food safety.** Environmental Science & Policy, v. 9, p.685-290, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.envsci.2006.08.002>.

CARVALHO, D. D. C.; JUNIOR, M. L.; MARTINS, I.; INGLIS, P.W.; MELLO, S.C.M. **Biological control of *Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli* by *Trichoderma harzianum* and its use for common bean seed treatment.** Tropical Plant Pathology, v. 39(5), p. 384-391, 2014. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762014000500005>.

CHET, I. ***Trichoderma* - Application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne pathogenic fungi.** p. 140-160 in: Innovative Approaches to Plant Disease Control. I. Chet, ed. John Wiley & Sons, New York, 1987.

CHIRIGE, J.; BUERA, M. P. **Water Activity, Water Glass Dynamics, and the Control of Microbiological Growth in Foods.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 36, n. 5, p. 465-500, 1996. <https://doi.org/10.1080/10408399609527736>.

CHRONAKIS, I.S. **On the Molecular Characteristics, Compositional Properties, and Structural/Functional Mechanisms of Maltodextrins: A Review**, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38:7, 599-637, 1998. <https://doi.org/10.1080/10408699891274327>.

COMUNIAN, T. A, et al. **Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried chlorophyllide, a natural food colourant, using gum arabic, maltodextrina and soy protein isolate-based carrier systems**. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, p. 1259–1265, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02617.x>.

DANIELSON, R.M.; DAVEY, C.B. **Effects of nutrients and acidity on phialospore germination of *Trichoderma in vitro***. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 5, Issue 5, p. 517-524, 1973. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(73\)90041-2](https://doi.org/10.1016/0038-0717(73)90041-2).

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. **Recent developments in microencapsulation of food ingredients**. *Drying Technology*, London, v. 23, n. 7, p. 1361-1394, 2005. <https://doi.org/10.1081/DRT-200063478>.

DI-BATTISTA, C.A.; CONSTENLA, D.; RAMÍREZ-RIGO, M.V.; PIÑA, J. **The use of arabic gum, maltodextrin and surfactants in the microencapsulation of phytosterols by spray drying**. *Powder Technology*, v. 286, p. 193-201, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2015.08.016>.

ECKERT, C.; SERPA, V.G.; SANTOS, A.C.F.; COSTA, S.M.; DALPUBEL, V.; LEHN, D.N.; SOUZA, C.F. V. **Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 through spray drying and using dairy whey as wall materials**. *LWT - Food Science and Technology*, v. 82, p. 176-183, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.045>.

EMBRAPA MEIO AMBIENTE. **Avaliação da qualidade de produtos à base de *Trichoderma***. *Jaguariúna*, p. 5-40, 2012.

FÄLDT, P., BERGENSTÅHL, B. **Spray-dried whey protein/lactose/soybean oil emulsions: 2. Redispersability, wettability and particle structure.** Food Hydrocolloids, v.10, p. 431–439, 1996. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(96\)80021-X](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(96)80021-X).

FAVARO-TRINDADE, C.S.; SANTANA, A.S.; MONTERREY-QUINTERO, E.S.; TRINDADE, F.M. NETTO, M.A. **The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate.** Food Hydrocolloids, v. 24, p. 336-340, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.10.012>.

FELLOWS, P. J. **Food processing technology - Principles and Practice.** Artmed: São Paulo, 2006.

FERNÁNDEZ-SANDOVAL, M.T.; ORTIZ-GARCÍA, M.; GALINDO, E.; SERRANO-CARREÓN, L. **Cellular damage during drying and storage of *Trichoderma harzianum* spores.** Process Biochemistry, v.47(2), p.186-194, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.10.006>.

FILKOVÁ, I.; HUANG, L. X.; MUJUMDAR, A. S. **Industrial spray drying systems.** In: MUJUNDAR, A. S. Handbook of Industrial Drying. 3.ed. Boca Raton: CRC, 2006.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. **Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview.** Food Research International, 40, p. 1107–1121, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004>.

GHARSALLAOUI, A., SAUREL, R., CHAMBIN, O., VOILLEY, A. **Pea (*Pisum sativum*, L.) protein isolates stabilized emulsions: a novel system for microencapsulation of lipophilic ingredients by spray drying.** Food Bioprocess and Technology, v.5(6), p. 2211–2221, 2011. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0497-z>.

GOFF, H.D; VERESPEJ, E.; JERMANN, D. **Glass transitions in frozen sucrose solutions are influenced by solute inclusions within ice crystals.** Thermochemica Acta, v. 399, p.43-55, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0040-6031\(02\)00399-4](https://doi.org/10.1016/S0040-6031(02)00399-4).

GOULA, A.M.; ADAMOPOULOS, K.G.A. **Effect of maltodextrin addition during spray drying of tomato pulp in dehumidified Air: II. Powder Properties.** *Drying Technology*, v.26, p. 726-737, 2008. <https://doi.org/10.1080/07373930802046377>.

GUIJARRO, B., LARENA, I., MELGAREJO, P., & DE CAL, A. **Effect of drying on conidial viability of *Penicillium frequentans*, a biological control agent against peach brown rot disease caused by *Monilinia spp.*** *Biocontrol Science and Technology*, v.16, p. 257–269, 2006. <https://doi.org/10.1080/09583150500335897>.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. S.; ESCUDERO, I. R.; ASENSIO A. C.; FERRÉ, J.; CABALLERO, P. **Encapsulation of the *Bacillus thuringiensis* secretable toxins Vip3Aa and CryIIa in *Pseudomonas fluorescens*.** *Biological Control*, v. 66, p. 159-165, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.05.002>.

HOKKANEN, H.M.T. **Success in classical biological control.** *Crit. Rev. Plant Sci.* 3, 35–73, 1985. <https://doi.org/10.1080/07352688509382203>.

HOWELL, C. R. **Effect of *Gliocladium virens* on *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, and damping-off of cotton seedlings.** *Phytopathology*, v. 72, p. 496-498, 1982. <https://doi.org/10.1094/Phyto-72-496>.

HOWELL, C. R. **Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts.** *Plant Disease*, v. 87, p. 4-10, 2003. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.1.4>.

IMAMURA, K.; KIMURA, Y.; NAKAYAMA, S.; SAYURI, M.; OGAWA, S.; HOSHINO, T.; OSHITANI, J.; KOBAYASHI, T.; ADACHI, S.; MATSUURA, T.; IMANAKA, H.; ISHIDA, N.; NAKANISHI, K. **Characteristics of amorphous matrices composed of different types of sugars in encapsulating emulsion oil droplets during freeze-drying.** *Food Research International*, v. 51, p. 201-207, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.010>.



IXTAINA, V.Y.; JULIO, L.M.; WAGNER, J.R.; NOLASCO, S.M.; TOMÁS, M.C. **Physicochemical characterization and stability of chia oil microencapsulated with sodium caseinate and lactose by spray-drying.** Powder Technology, v. 271, p. 26-34, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2014.11.006>.

JAMEKHORSHID, A.; SADRAMELI, S. M.; FARID, M. **A review of microencapsulation methods of phase change materials (PCMs) as a thermal energy storage (TES) medium. Renewable and Sustainable.** Energy Reviews, 31, 531-542, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.12.033>.

JIN, X.; CUSTIS, D. **Microencapsulating aerial conidia of *Trichoderma harzianum* through spray drying at elevated temperatures.** Biological control, v. 56, p. 202-208, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.11.008>.

JOHN, R. P.; TYAGI, R. D.; BRAR, S. K.; SURAMPALLI, R. Y.; PRÉVOST, D. **Bio-encapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery.** Critical Reviews in Biotechnology, v. 31, p. 211-226, 2011. <https://doi.org/10.3109/07388551.2010.513327>.

KAGAMI, Y.; SUGIMURA, S.; FUJISHIMA, N.; MATSUDA, K.; KOMETANI, T.; MATSUMURA, Y. **Oxidative Stability, structure, and physical characteristics of microcapsules formed by spray drying of fish oil with protein and dextrin wall materials.** Food Science. v. 68, p. 2248–2255, 2003. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb05755.x>.

KAREL, M.; ANGLEA, S.; BUERA, P.; KARMAS, R.; LEVI, G.; ROOS, Y. **Stability-related transitions of amorphous foods.** Thermochemica Acta, v. 246, p. 249-269, 1994. [https://doi.org/10.1016/0040-6031\(94\)80094-4](https://doi.org/10.1016/0040-6031(94)80094-4).

KAVOOSI, G.; DERAKHSHAN, M.; SALEHI, M.; RAHMATI, L. **Microencapsulation of zataria essential oil in agar, alginate and carrageenan.** Innovative Food Science & Emerging Technologies, v.45, p.418-425, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.12.010>.

KIM, E.H.J.; CHEN, X.D.; PEARCE, D. **On the mechanisms of surface formation and the surface composition of industrial milk powder.** *Drying Technology*, v.21 (2), p. 265-278, 2003. <https://doi.org/10.1081/DRT-120017747>.

KRZYSZTOF, C.; KRZYSZTOF, S. **Spray drying technique. In: Hardware and process parameters.** *Journal of pharmaceutical sciences*, v.99, p. 575-586, 2009.

LI, Y.; TANG, B.; CHEN, J.; LAI, P. **Microencapsulation of plum (*Prunus salicina Lindl.*) phenolics by spray drying technology and storage stability.** *Food Science and Technology*, 2017. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.09817>.

LIAN, W.C.; HSIAO, H.C.; CHOU, C.C. **Survival of *bifidobacteria* after spray-drying.** *International Journal of Food Microbiology*, v. 74, p. 79-86, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00733-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00733-4).

LIANG, J.; WANG, S.; LUDESCHER, R.D. **Effect of additives on physicochemical properties in amorphous starch matrices.** *Food Chemistry*, v. 171, p.298–305, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.010>.

MA, X.; XIAOBING, W.; CHENG, J.; NIE, X.; YU, X.; ZHAO, Y.; WANG, W. **Microencapsulation of *Bacillus subtilis* B99-2 and its biocontrol efficiency against *Rhizoctonia solani* in tomato.** *Biological Control*, v. 90, p. 34-41, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.05.013>.

MA, X et al. **Microencapsulation of *Bacillus subtilis* B99-2 and its biocontrol efficiency against *Rhizoctonia solani* in tomato.** *Biological Control*, p. 34-41, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.05.013>.

MASTERS, K. **Spray Drying Handbook.** 5. ed. Nova York: Longman, 1991.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M, K. **Thermophilic fungi: their physiology and enzymes.** *Microbiology and molecular biology reviews*. p. 461-488, 2000. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.3.461-488.2000>.

MASTERS, K. **Spray Drying Handbook**. 5. ed. Nova York: Longman, 1991.

MILNER, R.J.; HUPPATZ, R.J.; SWARIS, S.C. **A new method for assessment of germination of *metarhizium* conidia**. Journal of invertebrate pathology, v. 57, p.121-123, 1991. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(91\)90048-U](https://doi.org/10.1016/0022-2011(91)90048-U).

MOEJES, S.N.; VISSER, Q.; BITTER, J.H.; VAN BOXTEL, A.J.B. **Closed-loop spray drying solutions for energy efficient powder production**. Innovative Food Science & Emerging Technologies, v. 47, p.24-37, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.01.005>.

MONTE, E. **Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology**. Int Microbiol. v. 4: p. 1-4, 2001.

MORGAN, C. A.; HERMAN, N.; WHITE, P. A.; VESEY, G. **Preservaton of microorganisms by drying: a reiew**. Journal of Microbiological Methods, v. 66, p. 188-193, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.017>.

MUÑOZ-CELAYA, A. L.; et al. **Spray-drying microencapsulation of *Trichoderma harzianum* conidias in carbohydrate polymers matrices**. Carbohydrate polymers, v. 88, p. 1141-1148, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.12.030>.

MURUGESAN, R.; ORSAT, V. **Spray Drying for the production of nutraceutical ingredients:A Review**. Food Bioprocess Technology, v.8, p.1-12, 2011.

NAWI, N. M.; MUHAMAD, I. I.; MARSIN, A. M. **The physicochemical properties of microwave-assisted encapsulated anthocyanins from *Ipomoea batatas* as affected by different wall materials**. Food Science & Nutrition, v. 3(2), p. 91–99, 2015. <https://doi.org/10.1002/fsn3.132>.

NERI, L.; PITTIA, P.; BERTOLO, G.; TORREGGIANI, D.; SACCHETTI, G. **Influence of water activity and system mobility of peroxidase activity in maltodextrina solutions**. Food Biophysics, v.6, p.281-287, 2011. <https://doi.org/10.1007/s11483-011-9218-z>.

OMAR, I.; O'NEILL, T.M.; ROSSALL, S. **Biological control of *fusarium* crown and root rot of tomato with antagonistic bacteria and integrated control when combined with the fungicide carbendazim.** *Plant Pathology*, v. 55 , p. 92–99, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01315.x>.

PHISUT, N. **Spray drying technique of fruit juice powder:** some factors influencing the properties of product. *International Food Research Journal*, v.19, n.4, p.1297-1306, 2012.

POPP, J.; PETÓ, K.; NAGY, J. **Pesticide productivity and food security.** A review. *Agronomy for Sustainable Development*. v. 33, p. 243-255, 2013. <https://doi.org/10.1007/s13593-012-0105-x>.

RAJA K. C. M., SANKARIKUTTY B., SREEKUMAR M., JAYALEKSHMY A., & NARAYANAN C. S. **Material characterization studies of maltodextrin samples for the use of wall material.** *Starch*, v. 41, p. 298–303, 1989. <https://doi.org/10.1002/star.19890410805>.

RAMAKRISHNAN, Y.; ADZAHAN, N.M; YUSOF, Y.A.; MUHAMMAD. K. **Effect of wall materials on the spray drying efficiency, powder properties and stability of bioactive compounds in tamarillo juice microencapsulation.** *Powder Technology*, v. 328, p. 406-414, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2017.12.018>.

ROCKLAND, L. B.; BEUCHAT, L. R. **Water Activity:** Theory and Applications to Food. Marcel Dekker, New York, p. 404, 1987.

RODRÍGUEZ-RESTREPO, Y. A.; GIRALDO, F. I.; RODRÍGUEZ-BARONA, S. **Solubility as a fundamental variable in the characterization of wall material by spray drying of food components:** Application to microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis. *Journal of Food Process Engineering*, p. 1-8, 2017. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12557>.

ROOS, Y. **Characterization of food polymers using state diagrams.** *Journal of Food Engineering*, p. 340-360, 1995. [https://doi.org/10.1016/0260-8774\(95\)90050-L](https://doi.org/10.1016/0260-8774(95)90050-L).

ROSENBER, M.; KOPELMAN, I. J.; TALMON, Y. **Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 38, 1990. SAMUHASANEETOO, S.; CHAISERI, S.; FARHAT, I.A.; SAJJAANANTAKIL, T.; PONGSAWATMANIT, R. **Application of the “dual sorption” model for water adsorption of maltodextrin various DE.** Kasetsart Journal Natural Science, v.38, p.515-522, 2004.

SANCHEZ-REINOSO, Z.; OSORIO, C.; HERRERA, A. **Effect of microencapsulation by spray drying on cocoa aroma compounds and physicochemical characterisation of microencapsulates.** Powder Technology, v. 318, p. 110-119, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2017.05.040>.

SANTOS, M. G. et al. **Microencapsulation of xylitol by double emulsion followed by complex coacervation.** Food Chemistry, v. 171, p. 32-29, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.093>.

SAWANT, I.S.; WADKAR, P.N.; GHULE, S.B.; RAJGURU, Y.R.; SALUNKHE, V.P.; SAWANT, S.D. **Enhanced biological control of powdery mildew in vineyards by integrating a strain of *Trichoderma harzianum* with Sulphur.** Biological Control, v. 114, p.133-143, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.08.011>.

SOUKOULIS, C.; BEHBOUDI-JOBBEHDAR, S. **Impact of milk protein type on the viability and storage stability of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 using spray drying.** Food and Bioprocess Technology, 7, p.1255-1268, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1120-x>.

SRITHAM, E.; GUNASEKARAN, S. **Thermal evaluation of sucrose-maltodextrin-sodium citrate bioglass: Glass transition temperature.** Food Hydrocolloids, v. 60, p. 589-597, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.030>.

TANG, C-H.; LI, X-R. **Microencapsulation properties of soy protein isolate: Influence of preheating and/or blending with lactose.** Journal of Food Engineering, v.117, p.281–290, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.03.018>.

TEDESCHI, C.; LEUENBERGER, B.; UBBINK, J. **Amorphous–amorphous phase separation in hydrophobically-modified starch–sucrose blends I. Phase behavior and thermodynamic characterization.** Food Hydrocolloids, v.58, p.75-88, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.02.021>.

TONON, R.V.; GROSSO, C.R.F.; HUBINGER, M.D. **Influence of emulsion composition and inlet air temperature on the microencapsulation of flaxseed oil by spray drying.** Food Research International, v. 44, p. 282–289, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.018>.

WAAGE, J. **Global developments in biological control and the implications for Europe.** EPPO Bull. v. 27, p. 5-13, 1997. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.1997.tb00610.x>.

WANG, J.; WANG, L. **Structures and properties of comercial maltodextrins from corn, potato, and rice starches.** Starch/Starke, v. 52, p.296-304, 2000. [https://doi.org/10.1002/1521-379X\(20009\)52:8/9<296::AID-STAR296>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1521-379X(20009)52:8/9<296::AID-STAR296>3.0.CO;2-A).

WANG, Y. ZHU, X.; BIE, X.; LU, F.; ZHANG, C.; YAO, S.; LU, Z. **Preparation of microcapsules containing antimicrobial lipopeptide from *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2 by spray drying.** LWT - Food Science and Technology. v. 56, p. 502-507, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.11.041>.

WARD, E.; KERRY, B. R.; MANZANILLA-LÓPEZ, R. H.; MUTUA, G.; DEVONSHIRE, J.; KIMENJU, J. HIRSCH, P. R. **The pochochia clamydosporia serine protease gene vcp1 is subject to regulation by carbon, nitrogen and pH: implications for nematode biocontrol.** PloS ONE, v. 7(4), p. 12, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035657>.

WU, H. Q.; SUN, L.L.; LIU, F.; WANG, Z.Y. ; CAO, C.W. **Preparation of dry flowable formulations of *Clonostachys rosea* by spray drying and application for *Sclerotinia***

***sclerotiorum* control.** Journal of Integrative Agriculture, v. 17, p.613-620, 2018.  
[https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61811-2](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61811-2).

YALKOWSKY, S.H., HE, Y. **Handbook of aqueous solubility Data: An extensive compilation of aqueous solubility data for organic compounds** Extracted from the **AQUASOL database.** CRC Press LLC, Boca Raton, FL, p. 881, 2003.  
<https://doi.org/10.1201/9780203490396>.

ZUIDAM, N. J.; SHIMONI, E. **Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to take them.** Springer-Verlag, New York Inc., 3-29, 2009.

## CAPÍTULO 4: OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE MICROENCAPSULAÇÃO DOS CONÍDIOS DE *TRICHODERMA ASPERELLUM* POR *SPRAY DRYING*

### 4.1 Introdução

A viabilidade dos microrganismos que atuam no controle biológico é afetada por diversos fatores, incluindo, altos valores de atividade de água ( $a_w$ ) em casos de formulações líquidas (SRIRAM et al., 2011), temperaturas elevadas em processos de secagem (JIN, CUSTIS, 2011), tempo e temperatura de armazenamento (MUÑOZ-CELAYA et al., 2012; BROECKX et al., 2017; REYES, et al., 2018), contaminação do meio e estresse oxidativo (REYES et al., 2018).

Atualmente as pesquisas têm se voltado para o uso de planejamentos estatísticos e conjuntamente para o aperfeiçoamento de modelos que descrevam adequadamente processos de secagem e microencapsulação de microrganismos (CHANDRAMOULIA et al., 2004; CHÁVEZ, LEDEBOER, 2007; KOC et al., 2010; ANEKELLA, ORSATB, 2013) de forma a obter otimização de processos (COSTA et al., 2015 ).

A aplicação da metodologia de planejamento estatístico, em estudos que possuem um número elevado de variáveis que podem influenciar no processo é importante, uma vez que permite o estudo do grau de influência destas e de suas interações no sistema. Permite também reduzir o número de experimentos em determinado estudo, dessa forma diminuindo tempo e recursos financeiros necessários para uma investigação experimental (SILVA et al., 2008).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi estudar a influência da temperatura do ar de secagem e da concentração de maltodextrina sobre as características dos pós de conídios de *Trichoderma asperellum* produzidos pelo processo de *spray drying*, por meio de um planejamento composto central (PCC) visando a determinação das condições ótimas de processamento por meio de metodologia de superfície de resposta e modelos matemáticos, além de caracterizar por testes físico-químicos, microbiológicos e morfológicos o material resultante.



## 4.2 Material e Métodos

### 4.2.1 Suspensão de conídios de *Trichoderma asperellum* e material de parede

As suspensões de *Trichoderma asperellum* foram caracterizadas antes de cada experimento em relação à: umidade, germinação, concentração de conídios e UFC, conforme descrito nos itens 2.2.4.1, 2.2.4.5, 2.2.4.6 e 3.2.3.2, respectivamente.

Maltodextrina DE20 (Galena, Brasil) foi utilizada como material de parede na realização dos ensaios de microencapsulação dos conídios de *Trichoderma asperellum* deste capítulo. A escolha deste material foi baseada nos resultados dos estudos anteriormente realizados (Capítulo 3).

### 4.2.2 Microencapsulação por *spray drying*

A suspensão de *Trichoderma asperellum* com o material de parede foi mantida à temperatura ambiente e sob agitação constante durante sua alimentação no *spray dryer*. Em todos os experimentos foram utilizadas a vazão de alimentação da amostra ao secador de 0,6 L h<sup>-1</sup>, a vazão do ar de secagem de 9,90 × 10<sup>4</sup> L h<sup>-1</sup> e a vazão do ar de atomização de 2.400 L h<sup>-1</sup>.

Baseado nos estudos dos capítulos anteriores identificou-se que as variáveis mais importantes a serem investigadas no processo de microencapsulação dos conídios de *Trichoderma asperellum* foram a temperatura de entrada do ar de secagem e a concentração do material de parede.

Após a definição das faixas de operação das variáveis temperatura de entrada do ar e concentração do material de parede para estabelecer os parâmetros dos ensaios de microencapsulação, empregou-se um PCC do tipo rotacional, com três réplicas no ponto central, totalizando 11 experimentos, tendo como variáveis resposta o rendimento de secagem, umidade das micropartículas, conídios viáveis (CV) e percentual de sobrevivência (SP) dos conídios. A Tabela 4.1 apresenta os níveis utilizados e o PCC completo. As faixas de variação entre o limite inferior e o superior para as variáveis independentes (temperatura de entrada do ar e concentração de maltodextrina) foram determinadas de acordo com testes preliminares e outros trabalhos da literatura que microencapsularam conídios de *Trichoderma*.

Para melhor padronização da quantidade de material de parede adicionado à suspensão de conídios de *Trichoderma asperellum* estabeleceu-se a relação definida por massa seca de conídios de *Trichoderma asperellum*/massa seca de material de parede (MD20).

**Tabela 4.1.** Planejamento composto central empregado nos ensaios de microencapsulação por *spray drying* utilizando maltodextrina DE20 como material de parede.

<b>Experimento</b>	<b>T<sub>e</sub> (°C)</b>	<b>Concentração [MS Ta/MS de MD20]</b>
1	-1 (60 °C)	-1 (1:1,4)
2	-1 (60 °C)	1 (1:8,4)
3	1 (100 °C)	-1 (1:1,4)
4	1 (100 °C)	1 (1:8,4)
5	- $\alpha$ (51,8 °C)	0 (1:4,9)
6	$\alpha$ (108,2 °C)	0 (1:4,9)
7	0 (80 °C)	- $\alpha$ (1:0)
8	0 (80 °C)	$\alpha$ (1:9,8)
9	0 (80 °C)	0 (1:4,9)
10	0 (80 °C)	0 (1:4,9)
11	0 (80 °C)	0 (1:4,9)

T<sub>e</sub> – Temperatura de entrada do ar de secagem; MS – Massa seca; Ta – Conídios de *Trichoderma asperellum*; MD20 – Maltodextrina DE20.

Após o processo de *spray drying* todos os pós produzidos foram caracterizados quanto à: umidade, atividade de água, higroscopicidade, solubilidade em água e MEV. Para realizar as análises microbiológicas os pós foram reidratados até a mesma concentração de esporos da solução alimentada ao secador; e caracterizados quanto à germinação e UFC, com objetivo principal de avaliar a quantidade de conídios viáveis (CV) e o percentual de sobrevivência dos conídios.

#### 4.2.3 Otimização do processo e validação experimental

Com o objetivo de encontrar as melhores condições operacionais para a microencapsulação dos conídios de *Trichoderma asperellum* por *spray drying* o processo foi otimizado pela metodologia de superfície de respostas (MSR) descrita por Box, Hunter & Huter (1978), com base nos dados PCC. Em seguida utilizando as equações do modelo obtidas usou-se o *software* Matlab para fazer a junção das curvas de contorno e encontrar a região otimizada.

Os critérios que se desejou alcançar com a otimização do processo foram: alta viabilidade do microrganismo, além de baixa umidade dos pós microencapsulados e alto rendimento de secagem. Dessa forma, as respostas do sistema têm que ser otimizadas simultaneamente, portanto, as respostas de conídios viáveis e percentual de sobrevivência foram analisadas considerando satisfatórias as faixas de umidade inferior a 6% e rendimento de secagem acima de 50%.

#### **4.2.4 Ensaios de caracterização da suspensão dos conídios e das micropartículas**

##### ***4.2.4.1 Análises experimentais***

A umidade das soluções de *Trichoderma asperellum* e das micropartículas foi determinada de acordo com a metodologia descrita no item 2.2.4.1. A atividade de água ( $a_w$ ), higroscopicidade e solubilidade foram determinadas conforme as metodologias expostas nos itens 2.2.4.2, 2.2.4.3 e 2.2.4.4, respectivamente.

Para avaliar a porcentagem de CV após o processo de *spray drying* realizou-se o teste de germinação, conforme apresentado no item 2.2.4.5. Para a contagem do número de UFC e cálculo do percentual de sobrevivência dos conídios após o processo de *spray drying* foi seguida a metodologia descrita no item 3.2.3.2

As microscopias eletrônicas de varredura foram obtidas de acordo com a metodologia apresentado no item 3.2.3.3. A distribuição do tamanho de partículas das micropartículas de conídios de *Trichoderma asperellum* obtidas após o processo de *spray drying* foi avaliada pela técnica de difração a laser utilizando o equipamento Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Reino Unido). Para fazer a dispersão do material em pó a ser analisado foi utilizado álcool isopropílico.

### 4.3 Resultados

#### 4.3.1 Planejamento composto central

Os resultados de rendimento de secagem RS (%), umidade (%), conídios viáveis CV (%) e percentual de sobrevivência SP (%) em função das condições experimentais do PCC realizado utilizando MD20 como material de parede estão apresentados na Tabela 4.2.

**Tabela 4.2.** Resultados do planejamento composto central realizado utilizando MD20 como material de parede.

Exp.	T <sub>e</sub> (°C)	[MS Ta/MS MD20]	RS (%)	Umidade (%)	CV (%)	SP (%)
1	60	1:1,4	54,84	7,80 ± 0,05	82,88 ± 2,14	75,45 ± 3,87
2	60	1:8,4	51,04	5,87 ± 0,04	83,22 ± 5,34	83,32 ± 3,98
3	100	1:1,4	67,27	3,31 ± 0,03	8,90 ± 1,57	19,93 ± 2,60
4	100	1:8,4	59,69	4,06 ± 0,05	5,82 ± 0,59	7,03 ± 0,09
5	51,8	1:4,9	36,50	7,01 ± 0,09	92,76 ± 2,60	89,02 ± 1,73
6	108,2	1:4,9	76,37	1,57 ± 0,04	0,69 ± 0,60	0,10 ± 0,18
7	80	1:0	56,32	3,70 ± 0,04	67,12 ± 1,57	67,55 ± 1,66
8	80	1:9,8	56,47	3,62 ± 0,08	93,90 ± 1,17	86,99 ± 3,20
9	80	1:4,9	65,19	3,78 ± 0,05	86,90 ± 2,07	83,30 ± 3,77
10	80	1:4,9	50,70	3,38 ± 0,09	81,03 ± 2,39	81,90 ± 1,75
11	80	1:4,9	67,11	4,17 ± 0,06	83,10 ± 3,33	80,23 ± 1,84

Sendo: Exp. – Experimento; T<sub>e</sub> – Temperatura de entrada do ar de secagem; MS – Massa seca; Ta – Conídios de *Trichoderma asperellum*; RS – Rendimento de secagem; CV – Conídios viáveis; SP – Percentual de sobrevivência.

Maa et al. (1998) relatam que as configurações das variáveis do *spray dryer* podem aumentar a eficiência de coleta de produtos, contudo, a deposição de pó nas paredes do equipamento é um dos fatores que limita a recuperação do material. Pela Tabela 4.2 pode-se verificar que o rendimento de secagem neste estudo variou de 50,7% (Experimento 10) a 76,37% (Experimento 6). No trabalho de MAA et al. (1998) foi investigado o desempenho de um *spray dryer* para preparação de polpa de tomate em pó. Os autores verificaram que os resíduos de material presentes na câmara de secagem e no ciclone são significativos e causaram diferenças no rendimento do processo. Além disso, os autores também verificaram que os valores alcançados de eficiência de coleta de pó foram função da temperatura do ar de entrada e das vazões de alimentação de ar e de produto. Segundo Liang e King (1991) e Maa et al. (1998)

as incrustações influenciam no rendimento de pó coletado uma vez que afeta o processo de transferência de calor entre os fluidos em movimento dentro da câmara de secagem.

Pode-se observar pela Tabela 4.2 que altas temperaturas de entrada de ar 100 e 108,2°C, dos experimentos 3, 4 e 6, influenciaram negativamente nos conídios viáveis (CV) e no percentual de sobrevivência dos conídios (SP).

Os resultados de umidade do material seco no *spray dryer* foram mais altos, na faixa de 7%, nos experimentos 1 e 5, já que foram realizados com baixas temperaturas de entrada do ar de secagem de 60 e 51,8°C, respectivamente. No experimento 2 como se usou a relação maior de massa seca de material de parede em relação à massa seca de conídios no valor de 01:8,4 foi possível obter um valor de umidade menor de 5,87%.

No estudo do planejamento composto central observou-se um alto percentual de sobrevivência em torno de 80% que foram obtidos em temperaturas de 80°C e relação de material de parede sobre a massa seca de conídios acima de 1:4,9. No trabalho de Ma et al. (2015) foi observado que a taxa de sobrevivência de *B. subtilis* microencapsulado por *spray drying* utilizando maltodextrina como material de parede foi superior a 90%, utilizando temperatura do ar de entrada de 145°C e 0,55 L h<sup>-1</sup> de vazão de alimentação da amostra ao secador. Com os resultados obtidos experimentalmente para o rendimento de secagem (RS), umidade das micropartículas (umidade), conídios viáveis (CV) e percentual de sobrevivência (SP), utilizou-se o *Software Statistica* para analisar as respostas do planejamento composto central utilizando teste *t-Student* com nível de significância de 10%.

#### **4.3.1.1 Análise dos resultados obtidos para a variável resposta: Rendimento de secagem**

Na Tabela 4.3 estão os parâmetros lineares (L), os termos quadráticos (Q) e as interações entre as variáveis temperatura do ar de entrada (T<sub>e</sub>) e concentração de maltodextrina ([MP]) para a variável resposta rendimento de secagem, juntamente com os coeficientes de regressão, desvio padrão do parâmetro estimado e valores de p, para o nível de significância de 10%.

**Tabela 4. 3.** Resultado da regressão múltipla aplicada ao PCC sobre o resultado de rendimento de secagem.

<b>Termo</b>	<b>Coefficiente de regressão</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>P</b>
Constante	61,00	4,76	0,00
<b>Te (L)</b>	<b>9,68</b>	<b>2,91</b>	<b>0,02</b>
Te (Q)	-1,83	3,47	0,62
[MP] (L)	-1,40	2,92	0,65
[MP] (Q)	-1,85	3,47	0,62
Te x [MP]	-0,95	4,12	0,83

Nota: Os termos estatisticamente significativos estão em negrito.  $R^2=0,70$ . Sendo:  $T_e$  – Temperatura de entrada do ar de secagem; L – Linear; Q – Quadrático; [MP] - [Massa seca de conídios de *Trichoderma asperellum* / Massa seca de Maltodextrina DE20].

Utilizando os resultados do rendimento de secagem expostos na Tabela 4.3, após a regressão múltipla, obteve-se a equação com os parâmetros significativos, Equação 4.1 com coeficiente de determinação de 70%.

$$\text{Rendimento de secagem (\%)} = 61,00 + 9,68T_e \quad (4.1)$$

De acordo com a Equação 4.1, pode ser avaliado por meio dos coeficientes de regressão que dentre as variáveis estudadas, apenas a temperatura de entrada influencia no rendimento de secagem, que um aumento na temperatura do ar de entrada no secador influencia positivamente no rendimento de secagem.

Realizando a análise de variância (ANOVA) visualizada na Tabela 4.4, verifica-se que o  $F_{\text{calc}}=8,20$ , foi significativo ( $p=0,01$ ) para o termo linear da Temperatura do ar de entrada, para um nível de significância de 10%.

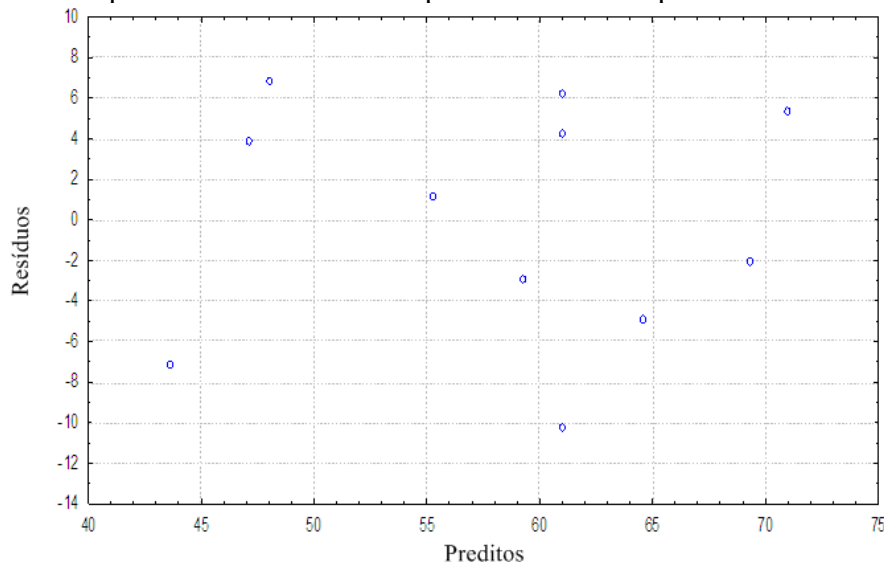
**Tabela 4.4.** Análise de variância para a variável resposta rendimento de secagem para o planejamento composto central.

Fonte de variação	GL	Soma quadrática	Média quadrática	$F_{\text{calc.}}$	p
<b>Regressão</b>	<b>2</b>	<b>765,48</b>	<b>382,74</b>	<b>8,20</b>	<b>0,01</b>
Resíduos	8	373,28	46,66		
Total		1138,76			

Nota: Os termos estatisticamente significativos estão em negrito.  $R^2=0,70$ .

A avaliação dos resíduos *versus* valores preditos apresentados pela Figura 4.1 mostra que os resíduos estão distribuídos aleatoriamente em torno de zero, portanto a variância é constante para os valores de resposta e os dados não apresentam tendência em sua distribuição.

**Figura 4.1** Valores preditos versus resíduos para a variável resposta rendimento de secagem.



#### 4.3.1.2 Análise dos resultados obtidos para a variável resposta: Umidade

Na Tabela 4.5 estão apresentados os parâmetros lineares (L), os termos quadráticos (Q) e as interações entre as variáveis temperatura do ar de entrada ( $T_i$ ) e concentração de maltodextrina [MP] para a variável resposta umidade das micropartículas, juntamente com os

coeficientes de regressão, desvio padrão do parâmetro estimado e valores de p, para o nível de 10% ( $\alpha=0,10$ ).

**Tabela 4. 5.** Resultado da regressão múltipla aplicada ao PCC sobre o resultado de umidade das micropartículas de conídios de *Trichoderma asperellum*.

Termo	Coefficiente de regressão	Desvio padrão	P
Constante	3,78	0,51	0,00
<b>Temperatura (L)</b>	<b>-1,75</b>	<b>0,31</b>	<b>0,00</b>
Temperatura (Q)	0,58	0,38	0,18
[MP] (L)	-0,16	0,32	0,63
[MP] (Q)	0,26	0,38	0,52
Te x [MP]	0,67	0,45	0,19

Nota: Os termos estatisticamente significativos estão em negrito.  $R^2=0,88$ . Sendo: L – Linear; Q – Quadrático; [MP] - [Massa seca de conídios de *Trichoderma asperellum* / Massa seca de Maltodextrina DE20].

Utilizando os resultados da umidade das micropartículas exibidos na Tabela 4.5, após a regressão múltipla, foi obtido a equação para o modelo reduzido com os parâmetros significativos, Equação 4.2.

$$\text{Umidade (\%)} = 3,78 - 1,75T_e \quad (4.2)$$

Pela Equação 4.2, pode ser verificado por meio dos coeficientes de regressão que um aumento na Temperatura do ar de entrada no secador causa diminuição no percentual de umidade das micropartículas. Jin e Custis (2011) avaliaram o processo de microencapsulação de conídios de *Trichoderma harzianum* com temperaturas variando de 40 a 140°C, e observaram que em temperaturas do ar de entrada muito baixas ocorria condensação de água na parede da câmara de secagem, fato que indica que o processo não estava adequado. Entretanto, em temperaturas elevadas o processo operava normalmente.



Realizando a análise de variância (ANOVA) visualizada na Tabela 4.6, verifica-se que o  $F_{\text{calc}}=12,74$ , foi significativo ( $p=0,003$ ) para um nível de significância de 10%. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, expresso na Tabela 4.6 e Figura 4.5.

**Tabela 4.6.** Análise de variância para a variável resposta umidade das micropartículas para o planejamento composto central.

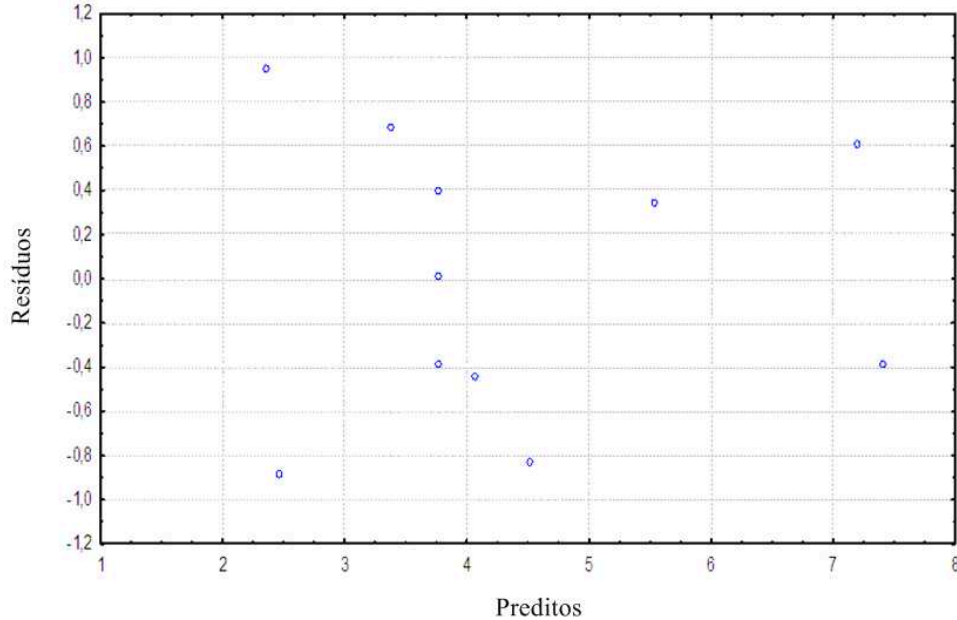
<b>Fonte de variação</b>	<b>GL</b>	<b>Soma quadrática</b>	<b>Média quadrática</b>	<b><math>F_{\text{calc}}</math></b>	<b>p</b>
<b>Regressão</b>	<b>2</b>	<b>24,68</b>	<b>12,34</b>	<b>12,74</b>	<b>0,003</b>
Residual	8	7,75	0,97		
Total		32,43			

Nota: Os termos estatisticamente significativos estão em negrito.  $R^2=0,88$ .

O coeficiente de determinação obtido após o ajuste dos modelos aos dados experimentais (Equação 4.4) indica uma boa concordância entre os valores experimentais e os previstos pelo modelo, 88% da variabilidade dos dados experimentais de umidade foram explicados pela equação proposta.

Pela Figura 4.2 verificou-se que os resíduos estão distribuídos de forma aleatória em torno de zero, indicando variância constante para os valores de resposta e que os dados não estão tendenciosos.

**Figura 4. 2.** Valores preditos *versus* resíduos para a variável resposta umidade.



#### 4.3.1.3 Análise dos resultados obtidos para a variável resposta: Conídios viáveis

Na Tabela 4.7 estão os parâmetros lineares (L), os termos quadráticos (Q) e as interações entre as variáveis temperatura do ar de entrada ( $T_e$ ) e concentração de maltodextrina [MD20] para a variável resposta conídios viáveis das micropartículas, juntamente com os coeficientes de regressão, erros padrão e valores de p, para o nível de 10% ( $\alpha=0,10$ ) de significância.

**Tabela 4.7.** Resultado da regressão múltipla aplicada ao PCC sobre o resultado de conídios viáveis das micropartículas de conídios de *Trichoderma asperellum*.

Termo	Coefficiente de regressão	Erro padrão	p
Constante	83,68	7,99	0,00
<b>Temperatura (L)</b>	<b>-35,20</b>	<b>4,89</b>	<b>0,00</b>
<b>Temperatura (Q)</b>	<b>-23,08</b>	<b>5,82</b>	<b>0,01</b>
[MP] (L)	4,39	4,89	0,41
[MP] (Q)	-6,19	5,82	0,34
$T_e \times$ [MP]	-0,86	6,92	0,91

Nota: Os termos estatisticamente significativos estão em negrito.  $R^2=0,93$ . Sendo: L – Linear; Q – Quadrático; [MP] - [Massa seca de conídios de *Trichoderma asperellum* / Massa seca de Maltodextrina DE20].

Utilizando os resultados dos conídios viáveis exibidos na Tabela 4.7, após a regressão múltipla, foi obtido a equação para o modelo reduzido com os parâmetros significativos, Equação 4.3 (parâmetros significativos).

$$\text{Conídios viáveis (\%)} = 83,68 - 35,20T_e - 23,08T_e^2 \quad (4.3)$$

De acordo com a Equação 4.3, pode ser verificado por meio dos coeficientes de regressão que um aumento na temperatura do ar de entrada, tanto nos termos lineares quanto nos quadráticos, causa diminuição no percentual de conídios viáveis. Jin e Custis (2011) avaliaram no processo de microencapsulação de conídios de *Trichoderma harzianum* que com temperaturas do ar de entrada de 140°C era observado baixa sobrevivência dos conídios, enquanto que em 60°C a porcentagem de sobrevivência foi a mais elevada.

Na Tabela 4.8 está apresentada a análise de variância para o planejamento composto central no estudo da influência da temperatura do ar de entrada e concentração de maltodextrina na variável resposta conídios viáveis. Verificou-se que os  $F_{\text{calc}}=10,14$  foi significativo ( $p=0,006$ ) para um nível de significância de 10%.

**Tabela 4.8.** Análise de variância para a variável resposta conídios viáveis para o planejamento composto central.

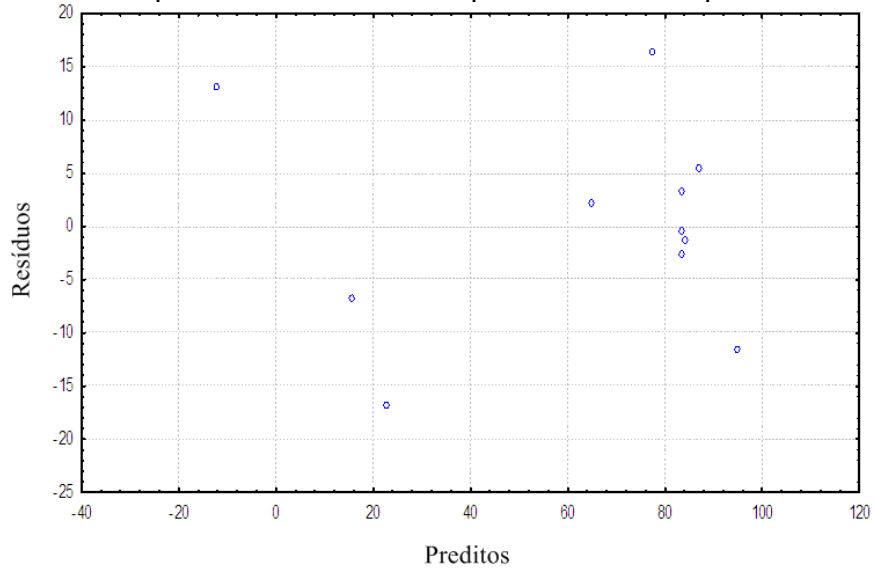
<b>Fonte de variação</b>	<b>GL</b>	<b>Soma quadrática</b>	<b>Média quadrática</b>	$F_{\text{calc}}$	<b>p</b>
Regressão	2	10.064,79	5.032,40	10,14	0,006
Resíduos	8	3.971,05	496,38		
Total		14.035,85			

Nota: Os termos estatisticamente significativos estão em negrito.  $R^2=0,93$ .

O coeficiente de determinação obtido após o ajuste dos modelos aos dados experimentais (Equação 4.3) indica uma boa concordância entre os valores experimentais e os previstos pelo modelo, em que 93% da variabilidade dos dados experimentais de conídios viáveis foram explicados pela equação proposta.

Pela Figura 4.3 nota-se que os resíduos estão distribuídos de forma aleatória em torno de zero, indicando variância constante para os valores de resposta e que os dados não apresentaram tendência.

**Figura 4.3.** Valores preditos versus resíduos para a variável resposta conídios viáveis.



#### ***4.3.1.4 Análise dos resultados obtidos para a variável resposta: Percentual de sobrevivência***

Na Tabela 4.9 estão os parâmetros lineares (L), os termos quadráticos (Q) e as interações entre as variáveis temperatura do ar de entrada ( $T_i$ ) e concentração de maltodextrina (MD20) para a variável resposta percentual de sobrevivência, juntamente com os coeficientes de regressão, erros padrão e valores de p, para o nível de 10% ( $\alpha=0,10$ ) de significância.

**Tabela 4.9.** Resultado da regressão múltipla aplicada ao PCC sobre o resultado do percentual de sobrevivência dos conídios de *Trichoderma asperellum* microencapsulados.

<b>Termo</b>	<b>Coefficiente de regressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>P</b>
Constante	81,81	6,12	0,00
<b>Temperatura (L)</b>	<b>-32,19</b>	<b>3,74</b>	<b>0,00</b>
<b>Temperatura (Q)</b>	<b>-22,24</b>	<b>4,46</b>	<b>0,00</b>
[MP] (L)	2,81	3,74	0,49
[MP] (Q)	-5,89	4,46	0,24
Te x [MP]	-5,19	5,30	0,37

Nota: Os termos estatisticamente significativos estão em negrito.  $R^2=0,95$ . Sendo: L – Linear; Q – Quadrático; [MP] - [Massa seca de conídios de *Trichoderma asperellum* / Massa seca de Maltodextrina DE20].

Utilizando os dados do percentual de sobrevivência dos conídios microencapsulados apresentados na Tabela 4.9, após a regressão múltipla, foi obtido a equação para o modelo reduzido com os parâmetros significativos, Equação 4.4.

$$\text{Percentual de sobrevivência (\%)} = 81,81 - 32,19T_e - 22,24T_e^2 \quad (4.4)$$

De acordo com a Equação 4.4, pode ser verificado por meio dos coeficientes de regressão que um aumento na temperatura do ar de entrada, tanto nos termos lineares quanto nos quadráticos, causou diminuição no percentual de sobrevivência dos conídios. Jin e Custis (2011) avaliaram no processo de microencapsulação de conídios de *Trichoderma harzianum* que com temperaturas do ar de entrada variando de 40 a 140°C os piores resultados de sobrevivência dos conídios obtidos foram para altas temperaturas, entre 120-140 °C.

A Tabela 4.10 apresenta a análise de variância para o planejamento composto central no estudo da influência da temperatura do ar de entrada e concentração de maltodextrina na variável resposta percentual de sobrevivência. Verificou-se que o  $F_{\text{calc}}=9,64$  foi significativo ( $p=0,007$ ) para o termo linear e quadrático da temperatura do ar de entrada, respectivamente, para um nível de 10% de significância.

**Tabela 4.10.** Análise de variância para a variável resposta percentual de sobrevivência para o planejamento composto central.

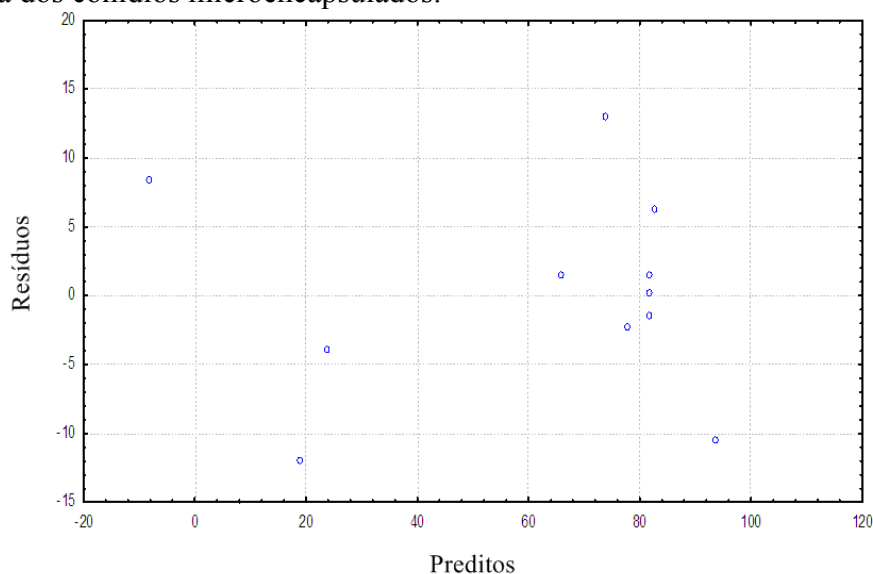
Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F <sub>calc</sub>	p
<b>Regressão</b>	<b>2</b>	<b>8.354,14</b>	<b>4.177,07</b>	<b>9,64</b>	<b>0,007</b>
Resíduos	8	3.466,26	433,28		
Total		11.820,40			

Nota: Os termos estatisticamente significativos estão em negrito.  $R^2=0,95$ .

O coeficiente de determinação obtido após o ajuste dos modelos aos dados experimentais (Equação 4.8) indica uma boa concordância entre os valores experimentais e os previstos pelo modelo, em que 95% da variabilidade dos dados experimentais de percentual de sobrevivência dos conídios foram explicados pela equação proposta. Observou-se que a assim como no percentual de conídios viáveis a temperatura de entrada do ar de secagem, tanto o termo linear como o quadrático, foi a variável que influenciou no percentual de sobrevivência dos conídios ao nível de 10% de significância, sendo o termo linear o mais acentuado.

Pela Figura 4.4 nota-se que os resíduos estão distribuídos de forma aleatória em torno de zero, indicando variância constante para os valores de resposta e que os dados não apresentam tendência.

**Figura 4.4.** Valores preditos versus resíduos para a variável resposta percentual de sobrevivência dos conídios microencapsulados.



Com base nas equações dos modelos, obtidas por meio dos parâmetros significativos do processo, pode-se observar que a temperatura de entrada do ar de secagem influenciou em todas as respostas avaliadas. Porém, ficou evidente a necessidade de aplicação do material de parede como forma de proteção dos conídios no processo de secagem, confirmado pelo teste de letalidade apresentado no Capítulo 2, além de fornecer uma barreira física durante a vida de prateleira do produto, como será apresentado no Capítulo 5.

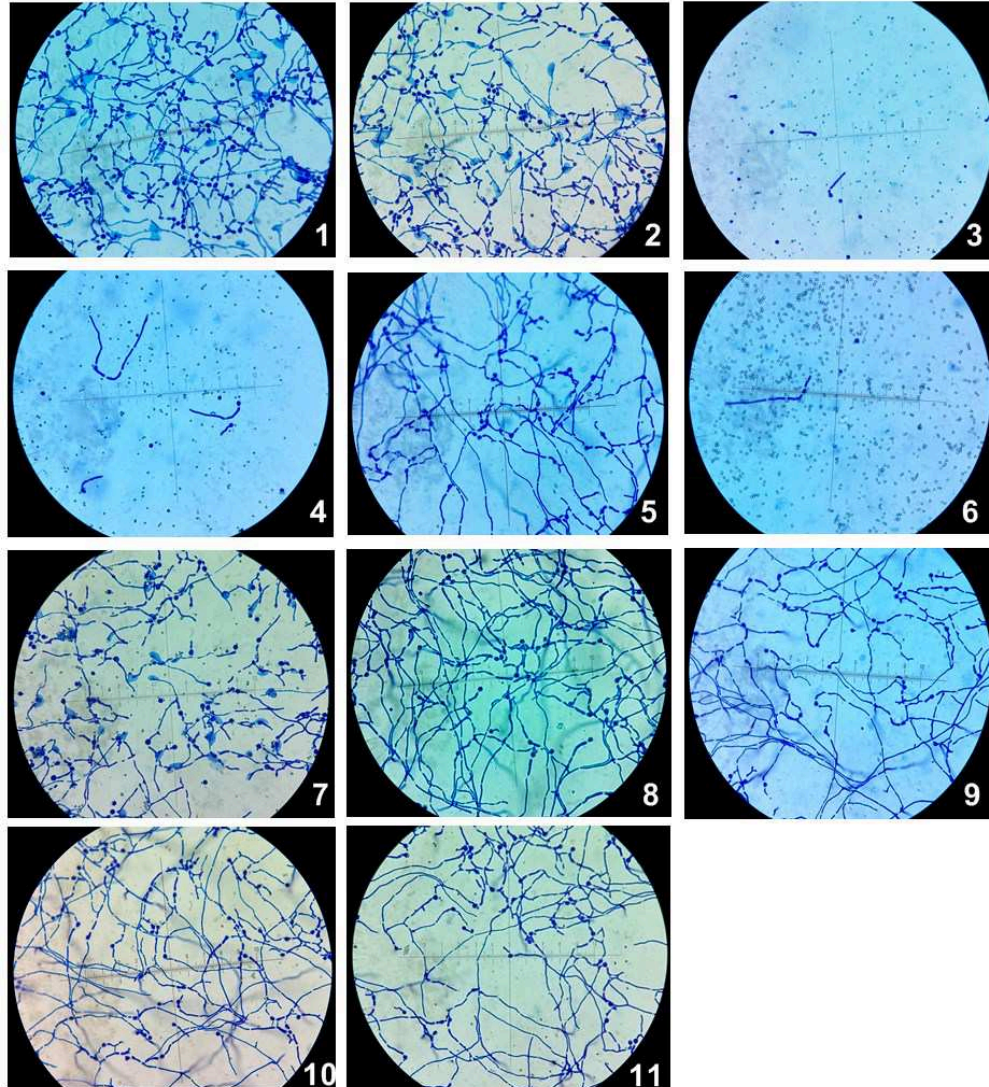
### **4.3.2 Análises microbiológicas**

#### **4.3.2.1 Germinação e conídios viáveis**

Os testes de germinação foram realizados nas micropartículas obtidas no planejamento composto central. Na Figura 4.5 estão apresentadas as fotografias obtidas por microscópio óptico do ensaio de germinação dos esporos, realizado com os conídios microencapsulados por *spray drying* utilizando maltodextrina DE20 como material de parede.

Percebe-se pela Figura 4.5 que o processo de secagem em *spray dryer* não impediu a germinação dos conídios e seu crescimento durante o tempo de incubação em câmara B.O.D., com exceção dos Experimentos 3 ( $T_e = 100\text{ }^\circ\text{C}$  e [1:1,4] massa seca de conídios de *Trichoderma asperellum*/massa seca de maltodextrina DE20), 4 ( $T_e = 100\text{ }^\circ\text{C}$  e [1:8,4] massa seca de conídios de *Trichoderma asperellum*/massa seca de maltodextrina DE20) e 6 ( $T_e = 108,2\text{ }^\circ\text{C}$  e [1:4,9] massa seca de conídios de *Trichoderma asperellum*/massa seca de maltodextrina DE20). E estes três experimentos tiveram em comum temperatura de entrada do ar  $\geq 100\text{ }^\circ\text{C}$ , podendo, assim, concluir que mesmo com altas concentrações de material de parede não foi possível proteger os conídios com temperaturas de secagem superior a  $100\text{ }^\circ\text{C}$ .

**Figura 4.5.** Germinação dos conídios de *Trichoderma asperellum* microencapsulados por diferentes condições experimentais definidas pelo PCC utilizando maltodextrina DE20 como material de parede (Experimentos 1 ao 11).



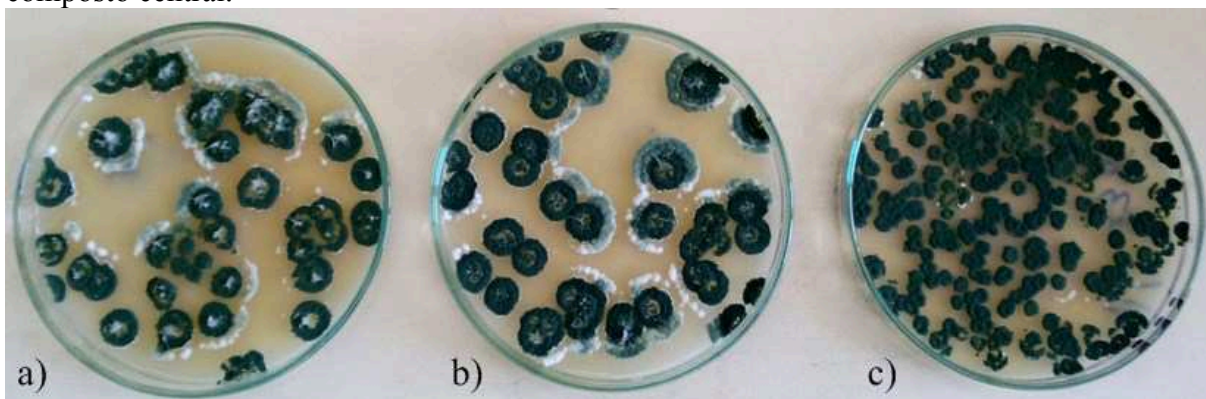
#### 4.3.2.2 Unidades formadoras de colônia

As formulações do produto da fermentação sólida dos *Trichoderma asperellum* em milho e as micropartículas resultantes da secagem usando as condições especificadas para o PCC foram analisadas quanto as UFC. A Figura 4.6 apresenta as fotografias de placas contendo as unidades formadoras de colônia das suspensões de conídios de *Trichoderma asperellum* utilizadas para preparação das formulações microencapsuladas no planejamento composto central (antes da secagem). Como pode ser visto pela Figura 4.7 não houve diferença no crescimento ou formato das colônias de *Trichoderma asperellum* após se realizar o processo de



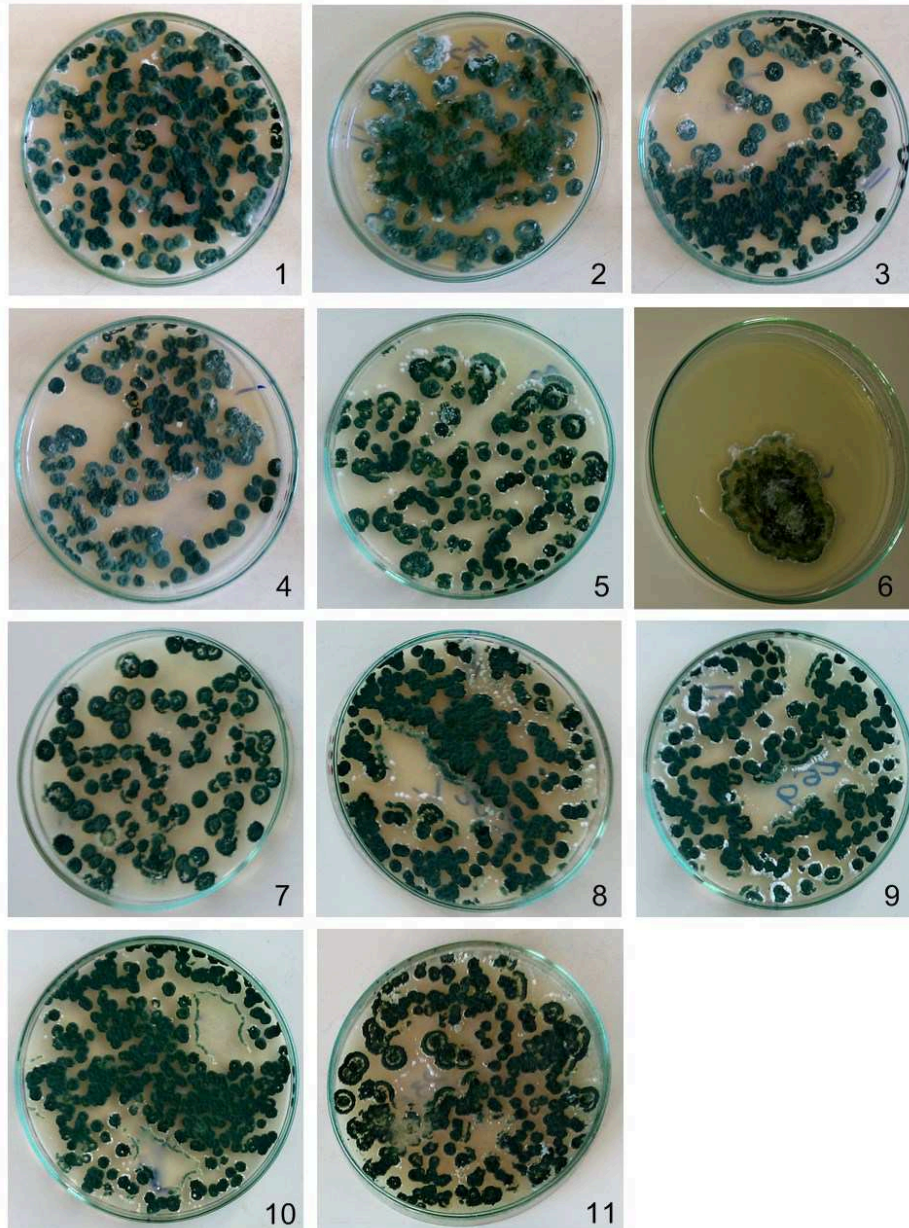
microencapsulação por *spray drying* nas condições especificadas do planejamento composto central.

**Figura 4.6.** Unidades formadoras de colônia das suspensões de conídios de *Trichoderma asperellum* utilizadas para preparação das formulações microencapsuladas no planejamento composto central.



Sendo: Item a) e item b) Unidades formadoras de colônia das diluições -7; Item c) Unidades formadoras de colônia da diluição -6.

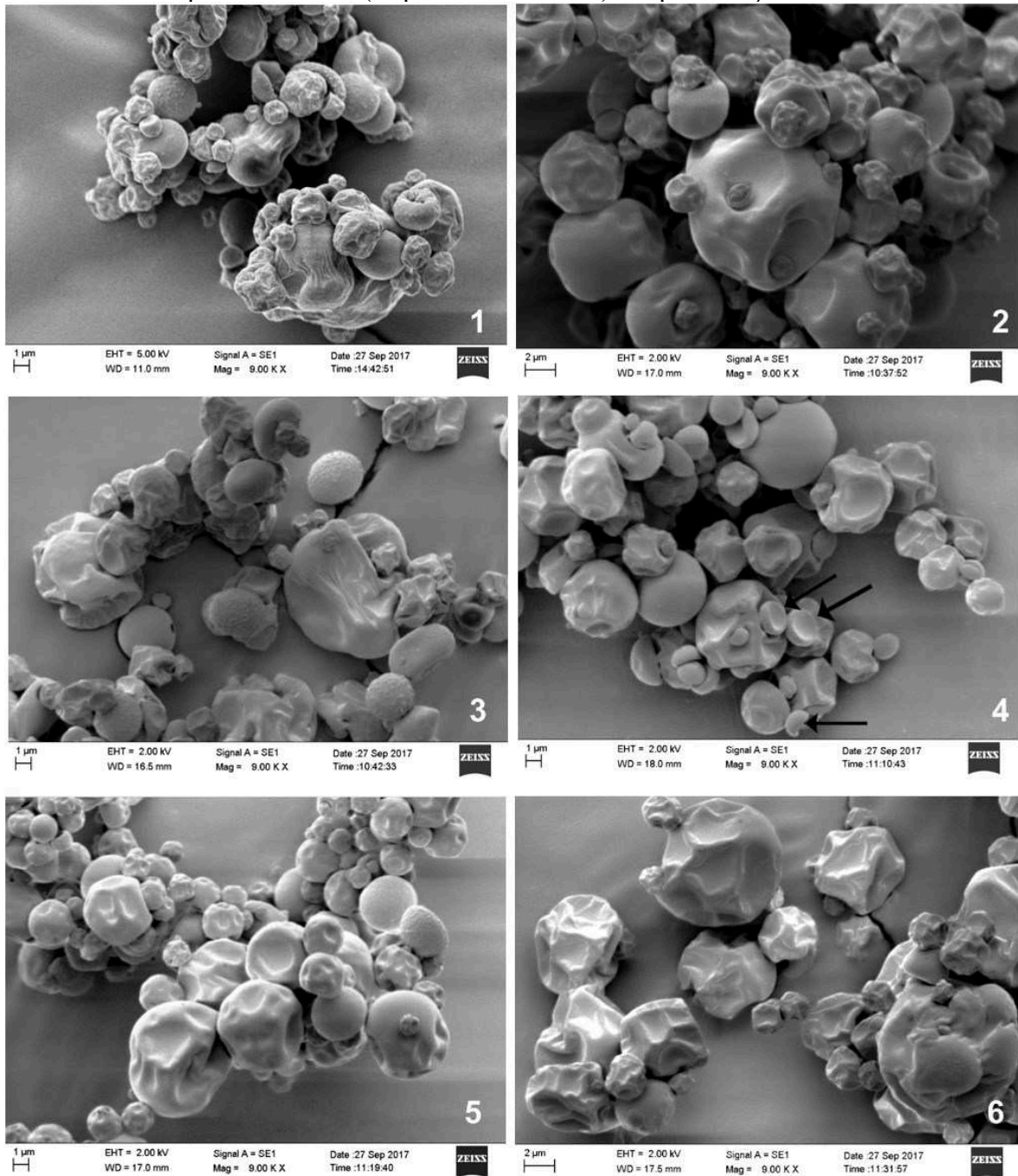
**Figura 4.7.** Unidades formadoras de colônia das micropartículas de conídios de *Trichoderma asperellum* obtidas por diferentes condições experimentais definidas pelo planejamento composto central utilizando maltodextrina DE20 como material de parede.



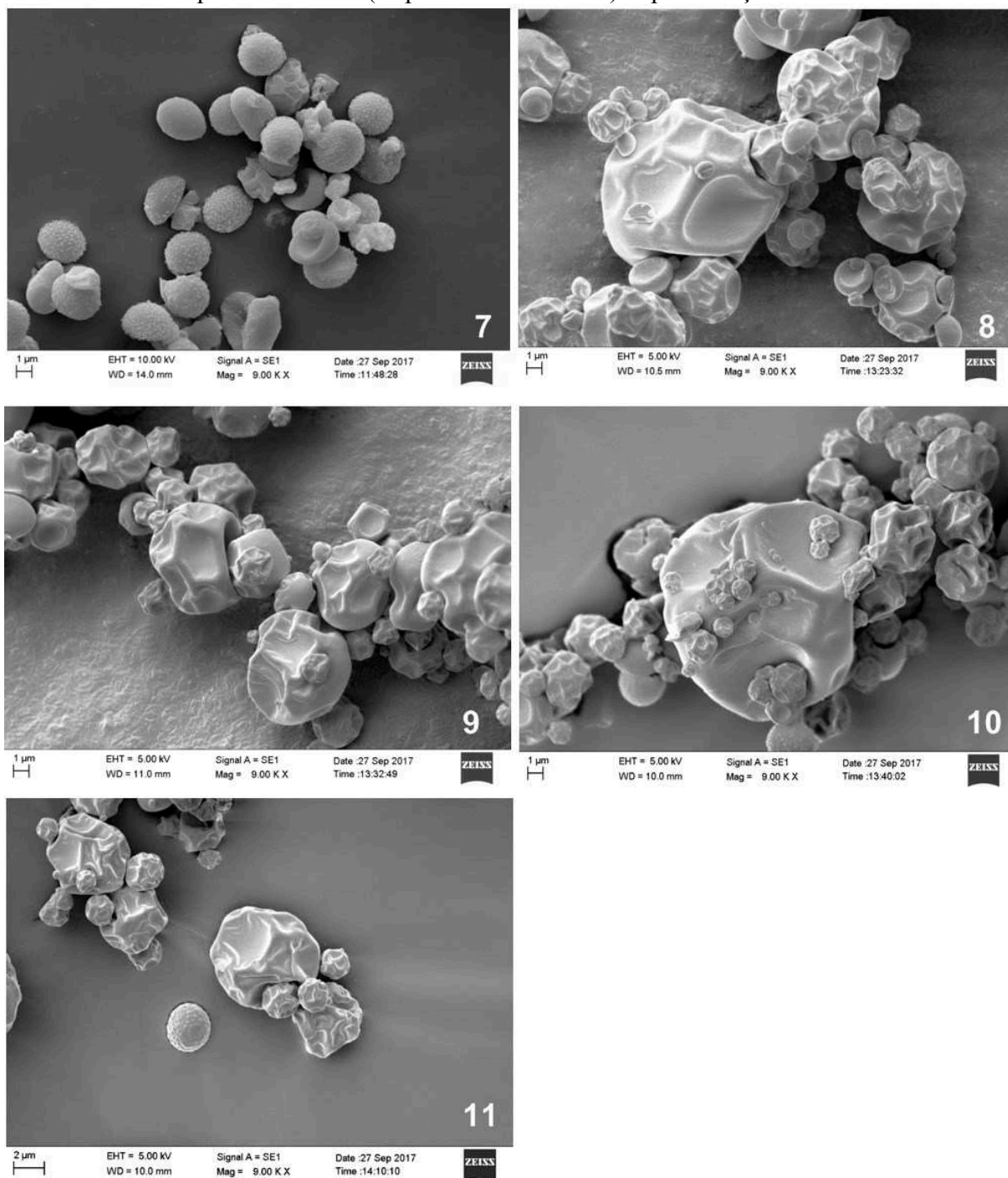
### 4.3.2.3 Microscopia eletrônica de varredura

As microscopias eletrônicas de varredura dos experimentos do planejamento composto central estão representadas nas Figuras 4.8 e 4.9.

**Figura 4.8.** Microscopia eletrônica de varredura para as micropartículas de conídios de *Trichoderma asperellum* microencapsuladas por *spray drying* utilizando maltodextrina DE20 como material de parede no PCC (Experimentos 1 ao 6). FAproximação de 9000 x.



**Figura 4.9.** Microscopia eletrônica de varredura para as micropartículas de conídios de *Trichoderma asperellum* microencapsuladas por *spray drying* utilizando maltodextrina DE20 como material de parede no PCC (Experimentos 7 ao 11). Aproximação de 9000 x.



Pelas Figuras 4.8 e 4.9 observou-se formação de micropartículas em todos os experimentos, com exceção do Experimento 7 ( $T_e = 80^\circ\text{C}$  e [1:0] massa seca de conídios de *Trichoderma asperellum*/massa seca de MD20) que não houve adição de maltodextrina DE20 como material de parede, estando os esporos, portanto, livres e sem qualquer revestimento. Na imagem do Experimento 3 ( $T_e = 100^\circ\text{C}$  e [1:1,4] massa seca de conídios de *Trichoderma*

*asperellum*/massa seca MD20) constatou-se a presença de partículas com cobertura e conídios livres sem proteção, tal fato provavelmente ocorreu devido a baixa concentração do material de parede (MAHESHWARI, 2000).

Pela imagem do experimento 4 ( $T_e = 100^\circ\text{C}$  e [1:8,4] massa seca de conídios de *Trichoderma asperellum*/massa seca de MD20) e 8 ( $T_e = 80^\circ\text{C}$  e [1:9,8] massa seca de conídios de *Trichoderma asperellum*/massa seca de maltodextrina DE20) verificou-se que mesmo com alta concentração de material de parede são encontrados alguns esporos sem revestimento.

Comparando-se todas as imagens das Figuras 4.8 e 4.9 percebeu-se que em todos os experimentos, com exceção do experimento 3 e 7 com baixa ou nenhuma concentração de material de parede, houve formação de um revestimento grosso e espesso nos conídios, comparando com os conídios livres. Este revestimento proporcionou a proteção dos conídios durante o processo de desidratação, explicando-se assim as porcentagens maiores de CV e EM em comparação com o experimento sem adição de material de parede. A maior parte das partículas apresenta-se com uma matriz irregular, de formato indefinido, tamanhos variados e superfícies enrugadas. De acordo com Saénz et al. (2009) as superfícies enrugadas podem ser associadas ao rápido processo de evaporação de água a qual as amostras são atribuídas durante a secagem por *spray drying*.

A morfologia das partículas deste estudo é semelhante com as das micropartículas de *Trichoderma harzianum* com adição de maltodextrina DE10 como material de parede no trabalho de Muñoz-Celaya (2012) obtidas por *spray drying* e com temperatura de entrada do ar de secagem de  $150^\circ\text{C}$ .

#### **4.3.2.4 Análise de distribuição de tamanho de partículas**

Os resultados da análise de distribuição de tamanho de partículas para alguns experimentos do planejamento composto central utilizando maltodextrina DE20 como material de parede das micropartículas de conídios de *Trichoderma asperellum* são apresentados na Tabela 4.11 e Figura 4.10.

**Tabela 4. 11.** Distribuição do tamanho de partículas, *span* e uniformidade das micropartículas de conídios de *Trichoderma asperellum* para o planejamento composto central.

Exp.	T <sub>i</sub> (°C)	[MS Ta/MS MD20]	d <sub>0,1</sub> (µm)	d <sub>0,5</sub> (µm)	d <sub>0,9</sub> (µm)	Span	Uniformidade
1	60	1:1,4	1,56	5,78	11,76	1,76	0,53
2	60	1:8,4	1,42	6,86	13,23	1,72	0,50
5	51,8	1:4,9	1,07	2,77	4,78	1,34	0,40
6	108,2	1:4,9	1,37	6,07	12,07	1,76	0,52
7	80	1:0	2,15	4,4	9,52	1,68	0,54
8	80	1:9,8	1,34	6,68	12,63	1,69	0,49
11	80	1:4,9	1,24	3,78	7,61	1,68	0,51

Sendo: Exp. – Experimento; T<sub>e</sub> – Temperatura de entrada do ar de secagem; MS – Massa seca; Ta – Conídios de *Trichoderma asperellum*; MD20 – Maltodextrina DE20.

Os termos d<sub>0,1</sub>, d<sub>0,5</sub> e d<sub>0,9</sub>, representam o diâmetro da esfera equivalente abaixo do qual se encontram 10%, 50% e 90% das partículas da amostra, respectivamente (TRIBOLI, 2014).

Neste estudo os valores de d<sub>0,1</sub> variaram de 1,07 à 2,15 µm. Os valores de d<sub>0,5</sub> variaram de 2,77 à 6,86 µm e de d<sub>0,9</sub> de 4,78 a 13,23 µm.

Jin e Custis (2011) microencapsularam conídios de *Trichoderma harzianum* utilizando sacarose como material de parede, sendo empregado um mini *spray dryer* (B-290 - BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Suíça) e velocidade de alimentação de aproximadamente 3 mL por minuto. Segundo os autores o tamanho de micropartículas de conídios obtidos no respectivo trabalho foi considerado muito pequeno, em torno de 10-25 µm, entretanto tamanhos de partículas maiores ou menores podem ser obtidos dependendo dos ajustes da vazão de alimentação do atomizador e da bomba.

No trabalho de Ma et al. (2015) as micropartículas de *Bacillus subtilis* B99-2 obtidas por *spray drying* utilizando maltodextrina como material de parede apresentaram tamanho médio de partículas de 7-14 µm.

O *Span* é avaliado com base nos diâmetros d<sub>0,1</sub>, d<sub>0,5</sub> e d<sub>0,9</sub>. Este número representa uma medida da largura de distribuição do tamanho de partículas e do índice de dispersão das mesmas em determinada amostra. Pode ser calculado pela Equação 4.9 (TRIBOLI, 2014):

$$Span = \frac{d(x,0,9) - d(x,0,1)}{d(x,0,5)} \quad (4.9)$$

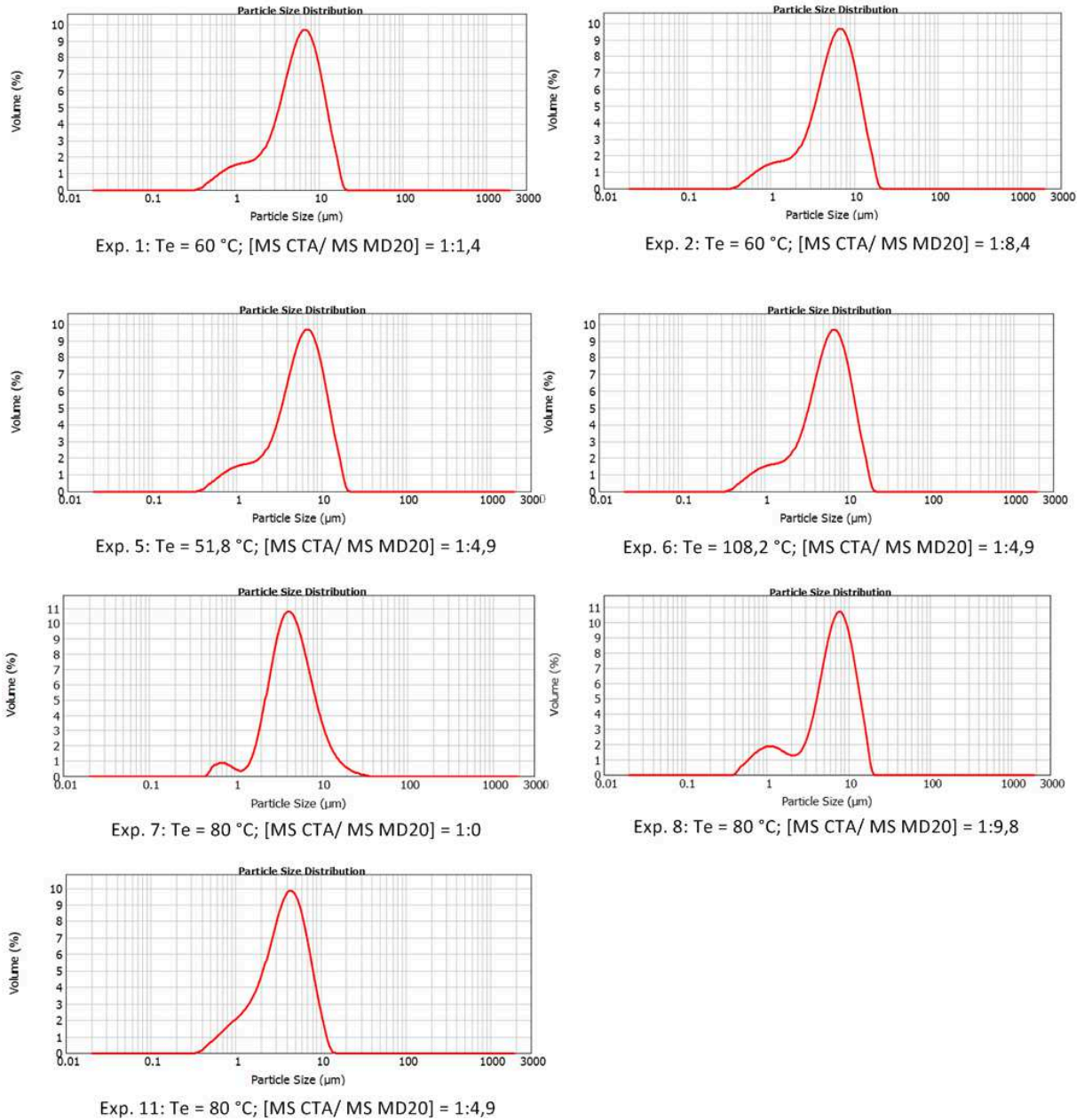
em que: x representa o tipo de distribuição (volume, superfície, comprimento, numérica, etc) e d corresponde aos diâmetros baseado na distribuição de volume das partículas (10, 50 e 90) (TRIBOLI, 2014).



O tamanho e a distribuição de partículas de uma dada amostra estão relacionados com características operacionais do processo, tais como o tamanho e distribuição das gotas durante o processo de atomização do líquido alimentado ao secador (TRIBOLI, 2014). Tais fatores influenciam nas propriedades de fluidez e umectabilidade de pós (BARBOSA-CÁNOVAS, JULIANO, 2005). Partículas com boa fluidez oferecem facilidades no processamento e formulação (JIN, CUSTIS, 2011).

Na Figura 4.10 estão apresentados os diagramas de distribuição do tamanho de partículas das micropartículas de conídios de *Trichoderma asperellum* para alguns experimentos do planejamento composto central (experimentos 1, 2, 5, 6, 7, 8 e 11) utilizando maltodextrina DE20 como material de parede.

**Figura 4.10.** Distribuição do tamanho de partículas das micropartículas de conídios de *Trichoderma asperellum* para o PCC.



Sendo: Exp. – Experimento; Te – Temperatura de entrada do ar de secagem; MS – Massa seca; CTA – Conídios de *Trichoderma asperellum*; MD20 – Maltodextrina DE20.

Observando-se os diagramas da Figura 4.10 verifica-se que todos apresentam aspectos de distribuição semelhantes. Tal fato pode ser justificado pela fixação das variáveis vazão de alimentação da amostra, vazão de atomização e vazão do ar de secagem, uma vez que essas variáveis podem contribuir na formação de partículas maiores ou menores.

Diante dos resultados de distribuição do tamanho de partículas do ponto central, experimento 11 (Te = 80°C e [1:4,9] massa seca de conídios de *Trichoderma asperellum*/massa seca de MD20) observa-se que a dispersão dos diâmetros está menor e mais simétrica, e há



formação de apenas um pico. Já as outras amostras apresentam formação de dois picos, sendo o primeiro próximo a região de 1  $\mu\text{m}$ . Acredita-se que este pico foi devido a formação de partículas contendo apenas o material de parede, sem presença de conídios no núcleo, uma vez que a massa de maltodextrina foi maior que a massa de conídios em todos os experimentos, com exceção do experimento 7.

### **4.3.3 Otimização do processo**

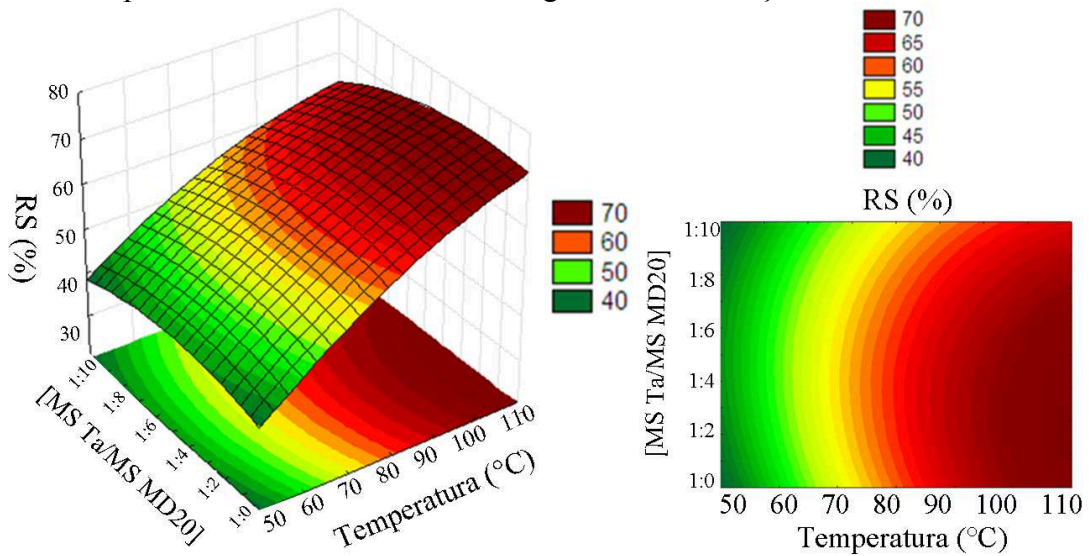
#### ***4.3.3.1 Análise das superfícies de resposta***

As superfícies de resposta dos resultados do planejamento composto central estão apresentadas nas Figuras 4.11, 4.12, 4.13 e 4.14, em relação ao rendimento de secagem, umidade das micropartículas, conídios viáveis e percentual de sobrevivência dos conídios, respectivamente.

Na Figura 4.11 está apresentada a superfície de resposta para o rendimento de secagem do processo de microencapsulação dos conídios de *Trichoderma asperellum* por *spray drying* em função das variáveis temperatura de entrada do ar de secagem e concentração de maltodextrina DE 20.

Verificou-se pela superfície de resposta, Figuras 4.11, que o aumento da temperatura do ar de entrada é significativo no aumento de rendimento do processo e que sua diminuição causa redução no rendimento. Entretanto, é sabido que em condições de temperaturas mais altas ocorre diminuição da sobrevivência dos conídios após o processo de microencapsulação por *spray drying*, sendo esta a principal condição a ser avaliada. A influência da concentração de maltodextrina DE20 para o rendimento de secagem foi observada que as baixas concentrações de maltodextrina, abaixo de 1:7 obtiveram os melhores resultados.

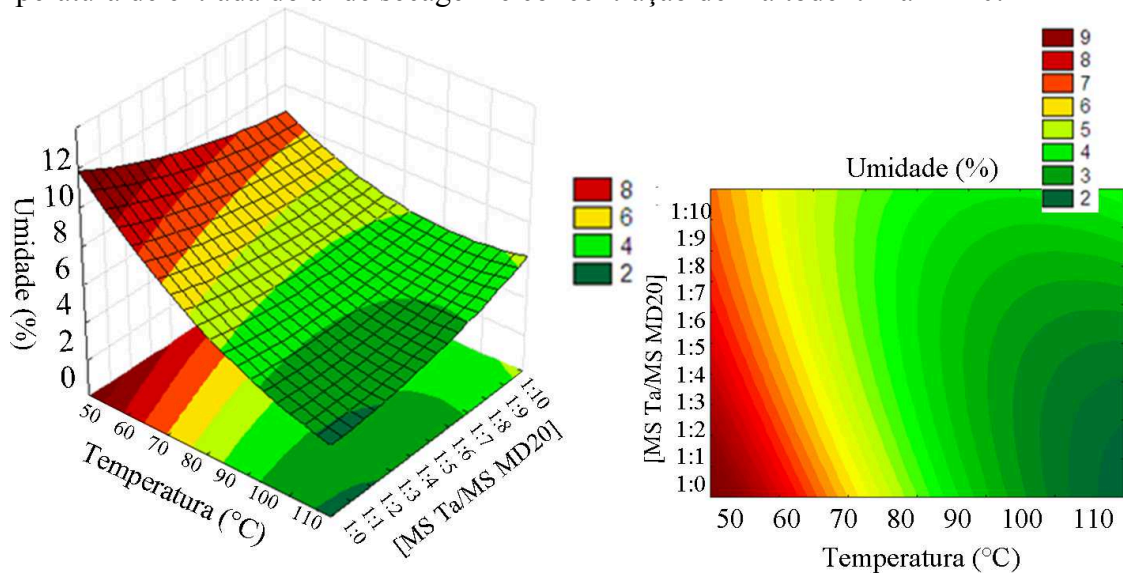
**Figura 4.11.** Superfície de resposta para o rendimento de secagem do processo de microencapsulação dos conídios de *Trichoderma asperellum* por *spray drying* em função das variáveis Temperatura de entrada do ar de secagem e Concentração de Maltodextrina DE20.



Na Figura 4.12 está ilustrada a superfície de resposta para a umidade das micropartículas de conídios de *Trichoderma asperellum* obtidas no processo de microencapsulação por *spray drying* em função das variáveis temperatura do ar de entrada e concentração de maltodextrina DE20 como material de parede e a Figura 4.12 esboça as curvas de nível.

Neste planejamento composto central o valor de  $R^2$  para a variável resposta umidade foi de 0,88, dessa forma tem-se que o modelo explica 88% da variabilidade dos dados. Verifica-se pela superfície de resposta e pela curva de nível (Figura 4.12) que o aumento da temperatura do ar de entrada é significativo na redução de umidade das micropartículas. Valores de temperatura entre 50°C e 60°C fornecem amostras com umidade em torno de 8%, enquanto que temperaturas mais elevadas, 100°C a 110°C fornecem materiais com umidade entre 2% e 3%. Entretanto, foi observado pelos experimentos que temperaturas de entrada do ar acima de 100°C não são viáveis, devido às baixas porcentagens de sobrevivência dos conídios. A concentração de maltodextrina não se mostrou significativa.

**Figura 4.12.** Superfície de resposta para a umidade das micropartículas de conídios de *Trichoderma asperellum* microencapsulados por *spray drying* em função das variáveis temperatura de entrada do ar de secagem e concentração de maltodextrina DE20.

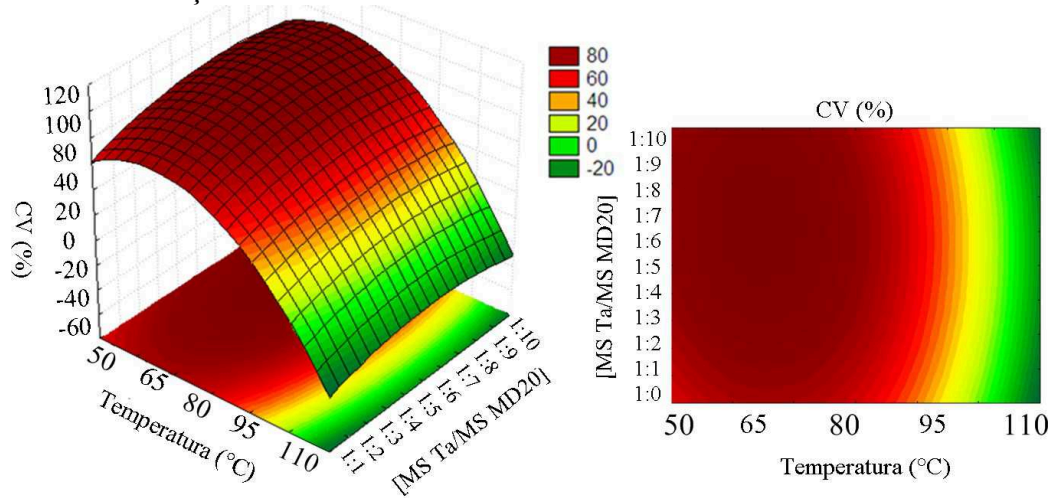


Na Figura 4.13 estão retratadas a superfície de resposta e a curva de nível para a porcentagem de conídios viáveis das micropartículas de conídios de *Trichoderma asperellum* obtidas no processo de microencapsulação por *spray drying* em função das variáveis temperatura de entrada do ar de secagem e concentração de maltodextrina DE20 como material de parede.

Juntamente com o valor do coeficiente de determinação,  $R^2 = 0,93$ , que mostra que o modelo explica 93% da variabilidade dos dados, é válida a construção das superfícies de resposta e curvas de nível que apresentam o comportamento da variável conídios viáveis em função da Temperatura de entrada do ar de secagem e Concentração de Maltodextrina DE20 no processo de microencapsulação.

De acordo com a avaliação gráfica (Figuras 4.13) é possível verificar que a região com o maior percentual de conídios viáveis está concentrada em temperaturas do ar de entrada entre 55°C a 75°C e concentração de maltodextrina DE20 entre 1:3 a 1:10 (massa seca de conídios de *Trichoderma asperellum*/massa seca de maltodextrina DE20).

**Figura 4.13.** Superfície de resposta para o percentual de conídios viáveis após o processo de microencapsulação por *spray drying* em função das variáveis temperatura de entrada do ar de secagem e concentração de maltodextrina DE20.

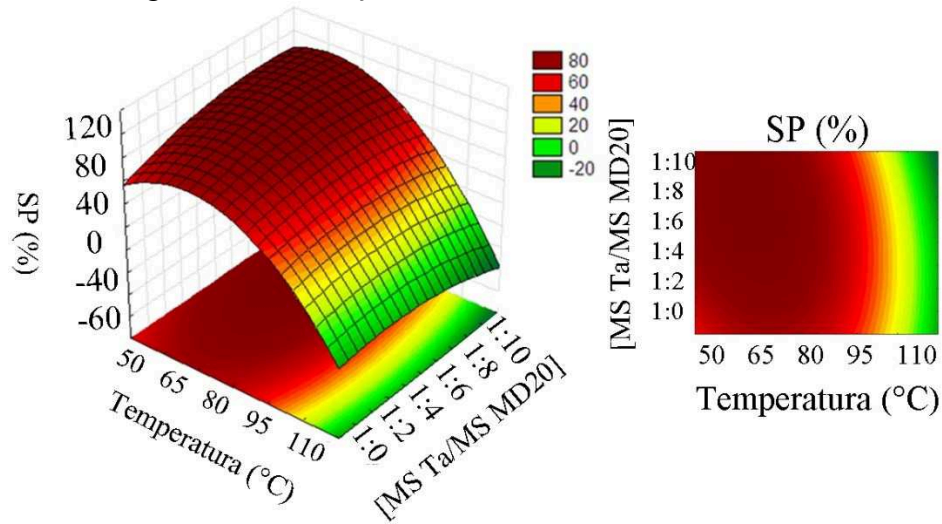


Na Figura 4.14 estão retratadas a superfície de resposta e a curva de nível para o percentual de sobrevivência no processo de microencapsulação dos conídios de *Trichoderma asperellum* por *spray drying* em função das variáveis temperatura de entrada do ar de secagem e concentração de Maltodextrina DE20 como material de parede.

O coeficiente de determinação,  $R^2 = 0,95$ , indica que 95% da variabilidade dos dados podem ser explicadas pelo modelo, sendo assim é válida a construção das superfícies de resposta e curvas de nível para apresentar o comportamento da variável percentual de sobrevivência dos conídios em função da temperatura de entrada do ar de secagem e concentração de maltodextrina DE20.

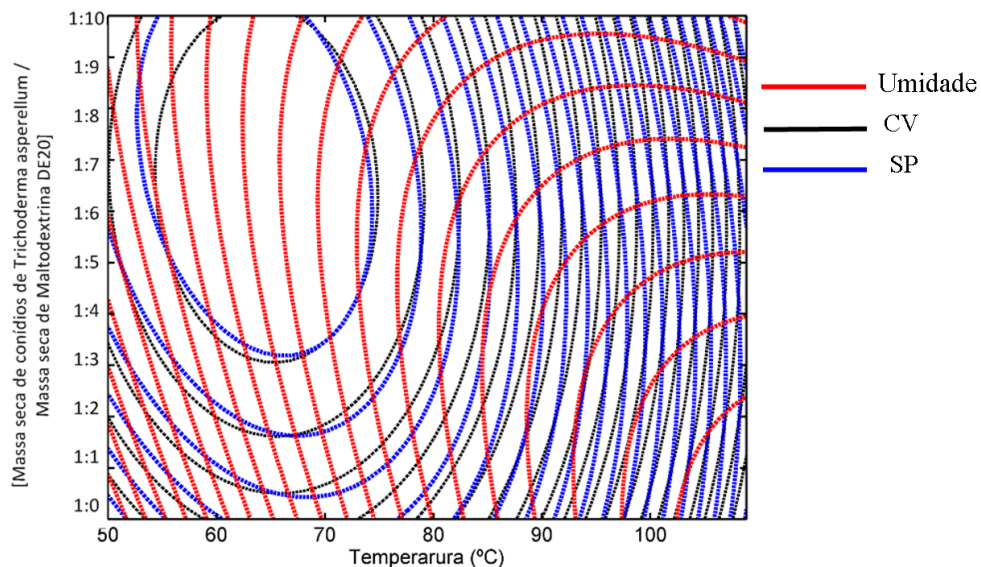
De acordo com a avaliação gráfica (Figuras 4.14) nota-se que a região com o maior percentual de sobrevivência está concentrada em temperaturas do ar de entrada entre 60°C a 70°C e concentração de maltodextrina DE20 entre 1:5 a 1:9 (massa seca de conídios de *Trichoderma asperellum*/massa seca de maltodextrina DE20).

**Figura 4.14.** Superfície de resposta para percentual de sobrevivência dos conídios após o processo de microencapsulação por *spray drying* em função das variáveis temperatura de entrada do ar de secagem e concentração de maltodextrina DE20.



A junção das curvas de contorno foi obtida com auxílio do *software Matlab* e são mostradas na Figura 4.15, para o percentual de umidade, conídios viáveis e percentual de sobrevivência. Foram construídas a partir dos resultados dos experimentos do planejamento composto central, e tem o objetivo de avaliar as regiões otimizadas do processo.

**Figura 4.15.** Curvas de contorno para o percentual de umidade, conídios viáveis e percentual de sobrevivência para o PCC.

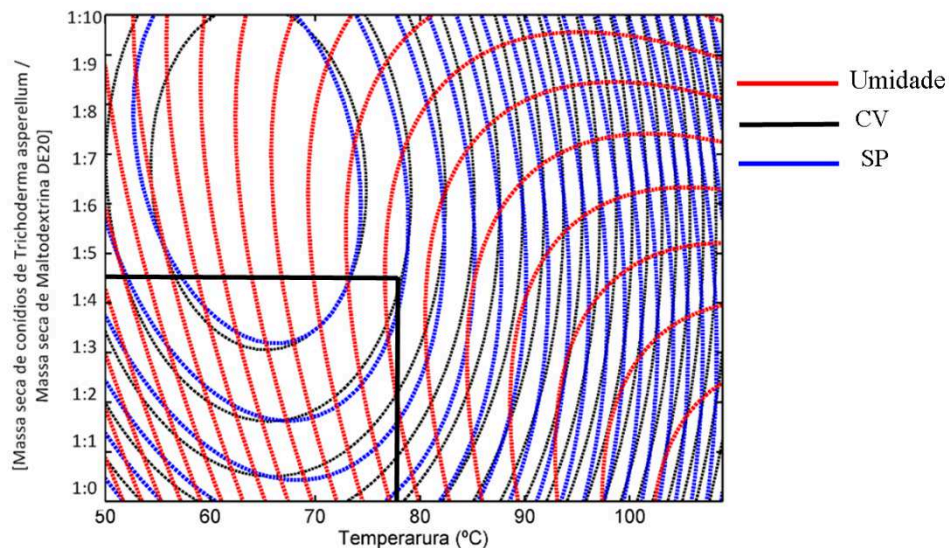


Na Figura 4.16 destacou-se a região otimizada para os resultados de umidade, conídios viáveis e percentual de sobrevivência dos conídios obtidos pelo planejamento composto central



utilizando maltodextrina DE20 como material de parede. Nota-se que os melhores resultados compreendem regiões de temperatura do ar de entrada de 77°C a 79°C e concentração de maltodextrina DE20 de 1:3,8 a 1:7 (massa seca de conídios de *Trichoderma asperellum*/massa seca de maltodextrina DE20). Como não é possível estabelecer temperaturas de 77°C a 79°C no modelo do *spray dryer* utilizado, devido as faixas do equipamento, definiu-se 80°C como a temperatura ótima do ar de entrada e 1:4,5 (massa seca de conídios de *Trichoderma asperellum*/massa seca de maltodextrina DE20) como a concentração de maltodextrina DE20 ótima. Com estes parâmetros realizou-se um novo ensaio em triplicata para confirmar os resultados e fazer a validação do modelo.

**Figura 4.16.** Região selecionada por meio das curvas de contorno para os melhores valores de umidade, conídios viáveis e percentual de sobrevivência dos resultados do planejamento composto central utilizando MD20 como material de parede.



#### 4.3.4 Validação do modelo estatístico

Os resultados de rendimento de secagem, umidade, conídios viáveis e percentual de sobrevivência em função das condições experimentais da validação do modelo utilizando maltodextrina DE20 como material de parede na microencapsulação dos conídios de *Trichoderma asperellum* estão na Tabela 4.12.

**Tabela 4.12.** Rendimento de secagem, umidade, conídios viáveis e percentual de sobrevivência em função das condições da validação do modelo utilizando maltodextrina DE20 como material de parede no processo de microencapsulação.

Experimento	Te (°C)	Concentração (MS Ta/ MS MD20)	Umidade	RS	CV	SP
Validação do modelo	80	01:04,5	4,92 ± 0,07	63,85 ± 0,86	87,10 ± 1,16	85,78 ± 2,88

Sendo: Te – Temperatura de entrada do ar de secagem; MS – Massa seca; Ta – Conídios de *Trichoderma asperellum*; MD20 – Maltodextrina DE20.

Para a etapa de validação comparou-se os resultados experimentais com os valores preditos pelos modelo, utilizando os parâmetros da otimização do processo, temperatura do ar de entrada de 80°C e concentração de 1:4,5 (Massa seca de conídios de *Trichoderma asperellum*/Massa seca de maltodextrina DE20).

As equações utilizadas para os cálculos experimentais foram:

$$RS (\%) = 61,00 + 9,68T_e - 1,83T_e^2 - 1,40[MP] - 1,85[MP]^2 - 0,95T_e * [MP] \quad (4.1)$$

$$Umidade (\%) = 3,78 - 1,75T_e^2 + 0,58T_e^2 - 0,16[MP] + 0,26[MP]^2 + 0,67T_e * [MP] \quad (4.2)$$

$$CV (\%) = 83,68 - 35,30T_e - 23,08T_e^2 + 4,39[MP] - 6,17[MP]^2 - 0,86T_e * [MP] \quad (4.3)$$

$$PS (\%) = 81,81 - 32,19T_e - 22,24T_e^2 + 2,81[MP] - 5,89[MP]^2 - 5,19T_e * [MP] \quad (4.4)$$

Na Tabela 4.13 estão apresentados os valores encontrados pelas equações do modelo e os valores experimentais para o ensaio de validação.

**Tabela 4.13.** Comparação entre os valores preditos e experimentais do ensaio de validação do modelo.

	RS (%)	Umidade (%)	CV (%)	SP (%)
<b>Valor teórico</b>	61,13	3,80	83,10	81,41
<b>Valor experimental</b>	63,85 ± 0,86	4,92 ± 0,07	87,10 ± 1,16	85,78 ± 2,88

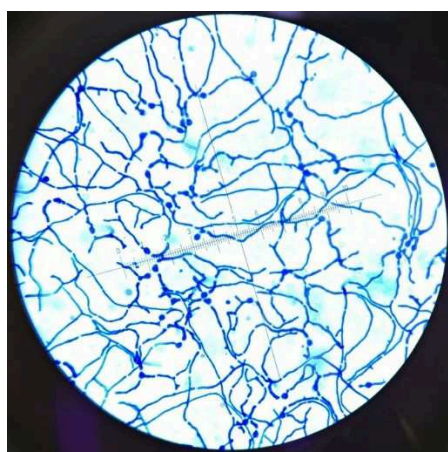
Sendo: RS – Rendimento de secagem; CV – Conídios viáveis; SP – Percentual de sobrevivência.

A análise dos resultados obtidos empiricamente e experimentalmente (Tabela 4.13) demonstrou que os resultados experimentais estão muito próximos aos valores obtidos de forma empírica. Sendo assim, os modelos para rendimento de secagem, conídios viáveis e percentual de sobrevivência dos conídios podem ser considerados adequados para permitir uma futura previsão de respostas em níveis confiáveis. Entretanto vale ressaltar que estes modelos são válidos apenas para a faixa experimental investigada.

#### 4.3.4.1 Germinação

Na Figura 4.17 está apresentada a imagem microscópica da germinação dos conídios de *Trichoderma asperellum* microencapsulados por *spray drying* utilizando maltodextrina DE20 como material de parede para o ensaio de validação.

**Figura 4.17.** Germinação dos conídios de *Trichoderma asperellum* microencapsulados por *spray drying* utilizando maltodextrina DE20 como material de parede para o ensaio de validação.



Verifica-se pela Figura 4.17 que o processo de microencapsulação por *spray drying* não impediu a germinação dos conídios e seu crescimento durante o tempo de incubação em câmara B.O.D. no ensaio de validação ( $T_e = 80^\circ\text{C}$  e [1:4,5] (massa seca de conídios de *Trichoderma asperellum*/massa seca de maltodextrina DE20). Portanto, pode-se concluir que

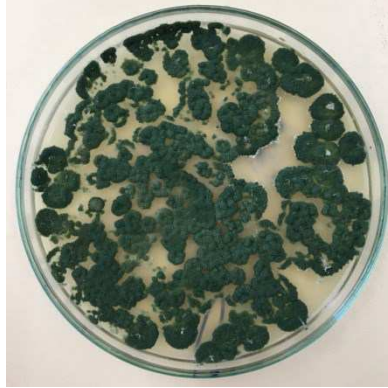


estas condições são adequadas para proteção dos conídios durante o processo nas faixas experimentais investigadas.

#### **4.3.4.2 Unidades formadoras de colônia**

Na Figura 4.18 apresenta-se uma fotografia das unidades formadoras de colônia dos conídios de *Trichoderma asperellum* microencapsulados por *spray drying* utilizando maltodextrina DE20 como material de parede para o ensaio de validação. Como pode ser verificado não houve diferença no crescimento miceliar ou formato das colônias de *Trichoderma asperellum* após se realizar o processo de microencapsulação por *spray drying*.

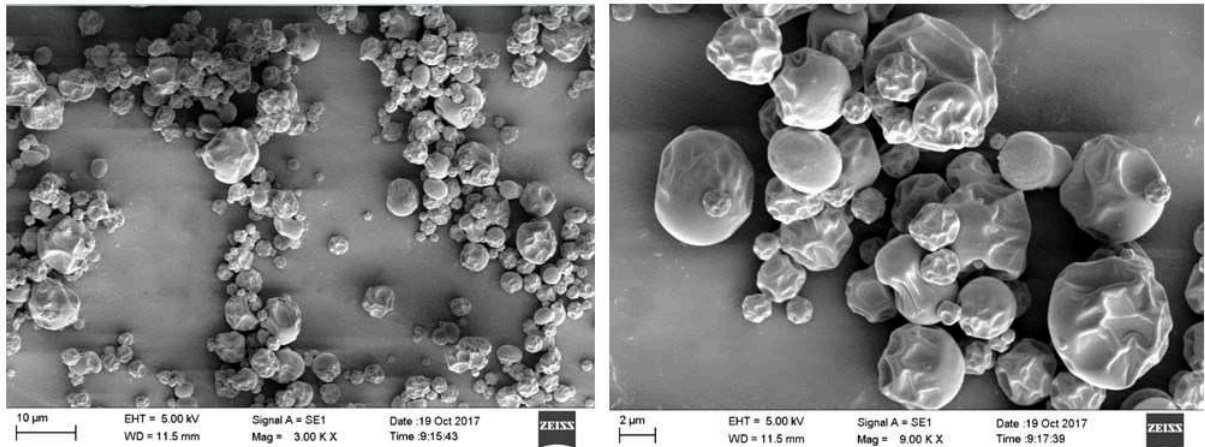
**Figura 4.18.** UFC dos conídios de *Trichoderma asperellum* microencapsulados por *spray drying* utilizando maltodextrina DE20 como material de parede para o ensaio de validação.



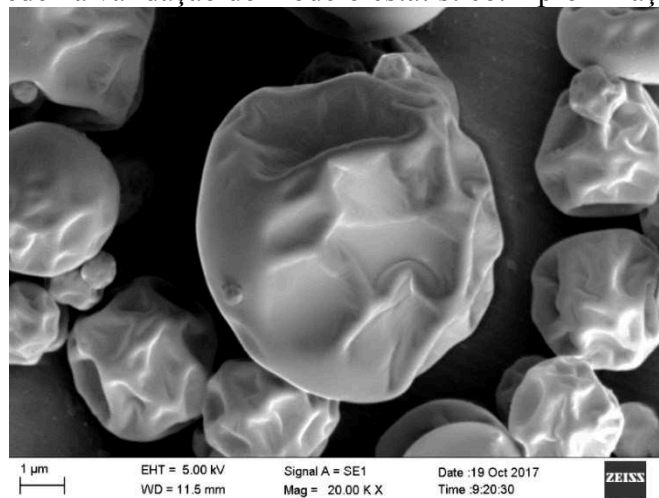
#### **4.3.4.3 Microscopia eletrônica de varredura**

Nas Figuras 4.19 e 4.20 estão apresentadas as microscopias eletrônicas de varredura dos conídios de *Trichoderma asperellum* microencapsulados por *spray drying* utilizando maltodextrina DE20 como material de parede para o ensaio de validação.

**Figura 4.19.** Microscopia eletrônica de varredura para as micropartículas de conídios de *Trichoderma asperellum* microencapsuladas por *spray drying* utilizando maltodextrina DE20 como material de parede na validação do modelo estatístico. Aproximação de 3.00 KX e 9.00 K



**Figura 4.20.** Microscopia eletrônica de varredura para as micropartículas de conídios de *Trichoderma asperellum* microencapsuladas por *spray drying* utilizando Maltodextrina DE20 como material de parede na validação do modelo estatístico. Aproximação de 20.00 KX.



As microscopias das Figuras 4.19 e 4.20 indicam a formação de micropartículas de conídios de *Trichoderma asperellum*. Nota-se que a formulação com maltodextrina DE20 no ensaio de validação formou uma cobertura ao redor dos conídios. A maior parte das partículas apresenta-se com uma matriz irregular, com formato indefinido e aparência enrugada. A cobertura do material de parede nos conídios aliado a uma temperatura do ar de entrada não muito alta, de 80°C, justifica os bons resultados de conídios viáveis ( $87,10 \pm 1,16\%$ ) e percentual de sobrevivência dos conídios ( $85,78 \pm 2,88\%$ ). Os resultados de CV e SP deste ensaio foram considerados satisfatórios em comparação com outros estudos que trabalharam

com microencapsulação de conídios de *Trichoderma harziannum* por *spray drying* (Jin e Custis, 2011; Muñoz-Celaya, 2012).

A morfologia das partículas deste estudo é semelhante com as partículas microencapsuladas com maltodextrina DE10 no trabalho de Muñoz-Celaya (2012) obtidas por *spray drying*.

#### 4.3.4.4 Distribuição de tamanho de partículas

Na Tabela 4.14 e Figura 4.21 estão exibidos os resultados da distribuição do tamanho de partículas para as micropartículas de conídios de *Trichoderma asperellum* para a Validação do modelo estatístico.

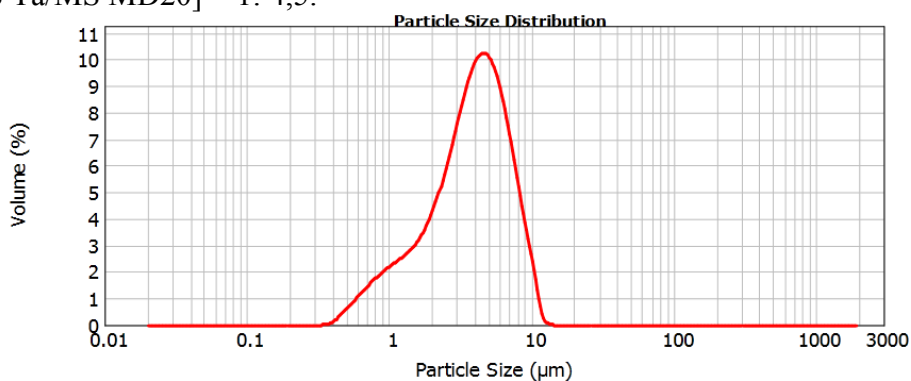
**Tabela 4.14.** Distribuição do tamanho de partículas, span e uniformidade das micropartículas de conídios de *Trichoderma asperellum* para a Validação do modelo estatístico.

Exp.	Te (°C)	Concentração (MS Ta/				Span	Uniformidade
		MS MD20)	d0,1 (µm)	d0,5 (µm)	d0,9 (µm)		
Validação	80	1:4,5	1,56	5,78	11,76	1,76	0,53

Sendo: Exp. – Experimento; Te – Temperatura de entrada do ar de secagem; MS – Massa seca; Ta – Conídios de *Trichoderma asperellum*; MD20 – Maltodextrina DE20.

Neste estudo os valores de  $d_{0,1}$ ,  $d_{0,5}$  e de  $d_{0,9}$  foram de 1,56 µm, 5,78 µm e 11,76 µm, respectivamente. O tamanho das partículas deste ensaio de validação ficaram semelhantes aos trabalhos de Jin e Custis (2011), de 10-25 µm e Ma et al. (2015), de 7-14 µm.

**Figura 4.21.** Distribuição do tamanho de partícula das micropartículas de conídios de *Trichoderma asperellum* para o ensaio de Validação do modelo estatístico. Validação - Te = 80°C e [MS Ta/MS MD20] = 1: 4,5.



Sendo: Te – Temperatura de entrada do ar de secagem; MS – Massa seca; Ta – Conídios de *Trichoderma asperellum*; MD20 – Maltodextrina DE20.

#### 4.4 Considerações finais

O planejamento composto central permitiu a investigação de 5 níveis de temperatura do ar de entrada e de concentração do material de parede (maltodextrina DE20), com isso foi possível determinar os efeitos de cada variável no processo e gerar gráficos de superfícies de resposta indicando as regiões ótimas para operação.

Com os resultados obtidos no PCC ficou evidente que a temperatura do ar de entrada, tanto os termos lineares quanto quadráticos, afetam de forma muito significativa a sobrevivência dos conídios, causando efeito negativo nos percentuais de conídios viáveis e percentual de sobrevivência quando aumentada acima de 100°C, ainda que com alta concentração de maltodextrina DE20 como agente protetor, nas faixas experimentais estudadas.

Os efeitos da variação concentração de maltodextrina no processo são menores, e percebe-se que tanto em baixas quanto em altas concentrações quando se tem uma temperatura do ar de entrada mais baixa é possível obter bons resultados de sobrevivência dos conídios de *Trichoderma asperellum* (conídios viáveis e percentual de sobrevivência).

A utilização das superfícies de resposta para a otimização do processo se mostrou adequada para encontrar a região ótima, uma vez que a junção das curvas de contorno das variáveis resposta umidade, conídios viáveis e percentual de sobrevivência permitiu encontrar condições favoráveis para o processo a fim de obter um produto com baixa umidade e alto percentual de conídios viáveis e sobrevivência dos conídios.

Os valores otimizados pelo planejamento composto central para as variáveis estudadas temperatura do ar de entrada e concentração de maltodextrina são de 80°C e 1:4,5 MS Ta/MS MD20, respectivamente. Na condição da região ótima obteve-se experimentalmente rendimento de secagem de  $63,85 \pm 0,86\%$ , umidade de  $4,92 \pm 0,07\%$ , conídios viáveis de  $87,10 \pm 1,16\%$  e percentual de sobrevivência de  $85,78 \pm 2,88\%$ , valores muito bons se comparados com estudos de microencapsulação de microrganismos.

O modelo estatístico construído para as variáveis resposta rendimento de secagem, conídios viáveis e percentual de sobrevivência mostraram-se adequados para estimar o comportamento do processo de microencapsulação dos conídios de *Trichoderma asperellum* por *spray drying* utilizando maltodextrina DE20 como material de parede. A comparação dos valores obtidos teoricamente e experimentalmente mostrou que os modelos estão bem ajustados aos dados, com exceção do modelo para umidade das micropartículas, que não se mostrou muito preditivo.



#### 4.5 Rerefências

ANEKELLA, A, K.; ORSATB, V. **Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying**. LWT - Food Science and Technology, 25, p.17-24, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.08.003>.

BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; JULIANO, P. **Physical and chemical properties of food powders**. In: ONWULATA, C. Encapsulated and powdered foods. Boca raton: Taylor & Fancis, cap.3, p. 39-65, 2005.

BOX, G.E.P.; HUNTER, H.G.; HUNTER, J.S. **Statistics for experiments**. New York: John Wiley Co., p. 310-530, 1978.

CHANDRAMOULIA, V.; KAILASAPATHY, K.; PEIRISB, P.; JONESB, M. **An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus spp.* in simulated gastric conditions**. Journal of Microbiological Methods 56: p. 27-35, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.09.002>.

CHÁVEZ, B. E.; LEDEBOER, A. M. **Drying of probiotics: Optimization of formulation and process to enhance storage survival**. Drying Technology 25:1193-1201, 2007. <https://doi.org/10.1080/07373930701438576>.

COSTA, J.M.G.; SILVA, E.K.; HIJO, A.A.C.T.; AZEVEDO, V.M.; MALTA, M.R.; ALVES, J.G.L.F.; BORGES, S.V. **Microencapsulation of swiss cheese bioaroma by spray-drying: Process optimization and characterization of particles**. Powder Technology, v.274, p.296-304, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2015.01.037>,

JIN, X.; CUSTIS, D. **Microencapsulating aerial conidia of *Trichoderma harzianum* through spray drying at elevated temperatures**. Biological control, v. 56, p. 202-208, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.11.008>.

KOC, B.; YILMAZER, M. S.; BALKIR, P.; ERTEKIN, F. K. (2010) **Spray drying of yogurt: Optimization of process conditions for improving viability and other quality attributes**. Drying Technology 28:495-507. <https://doi.org/10.1080/07373931003613809>.

LIANG, B.; KING, C.J. **Factors influencing flow patterns, temperature fields and consequent drying rates in spray drying.** *Drying Technology* 1991, 9 (1), 1–25. <https://doi.org/10.1080/07373939108916639>.

MA, X.; XIAOBING, W.; CHENG, J.; NIE, X.; YU, X.; ZHAO, Y.; WANG, W. **Microencapsulation of *Bacillus subtilis* B99-2 and its biocontrol efficiency against *Rhizoctonia solani* in tomato.** *Biological Control*, v. 90, p. 34-41, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.05.013>.

MAA, Y-F.; NGUYEN, P-A.; SIT, K.; HSU, C.C. **Spray-drying performance of a Bench-top spray dryer for protein aerosol powder preparation.** *Biotechnology and Bioengineering*, v. 60(3), p.301-309, 1998. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19981105\)60:3<301::AID-BIT5>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19981105)60:3<301::AID-BIT5>3.0.CO;2-L).

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M, K. **Thermophilic fungi: their physiology and enzymes.** *Microbiology and molecular biology reviews*. p. 461-488, 2000. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19981105\)60:3<301::AID-BIT5>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19981105)60:3<301::AID-BIT5>3.0.CO;2-L).

MUÑOZ-CELAYA, A. L.; et al. **Spray-drying microencapsulation of *Trichoderma harzianum* conidia in carbohydrate polymers matrices.** *Carbohydrate polymers*, v. 88, p. 1141-1148, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.12.030>.

REYES, V.; CHOTIKO, A.; CHOUJENKO, A.; CAMPBELL, V.; LIU, C.; THEEGALA, C.; SATHIVEL, S. **Influence of wall material on production of spray dried *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496 and its viability at different storage conditions.** In Press, p.1-11, 2018.

ROCKLAND, L. B.; BEUCHAT, L. R. **Water Activity: Theory and Applications to Food.** Marcel Dekker, New York, p. 404, 1987.

ROSENBER, M.; KOPELMAN, I. J.; TALMON, Y. **Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 38.



TRIBOLI, E. P. R. **Estudo e otimização de processo de secagem de iogurte por atomização com secador em escala piloto.** Tese de doutorado apresentada à Escola Politécnica da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências. São Paulo, 2014.

## CAPÍTULO 5: AVALIAÇÃO DO EFEITO DE ARMAZENAMENTO DE PÓS DE CONÍDIOS DE *Trichoderma asperellum* PRODUZIDOS POR *SPRAY DRYING*

### 5.1 Introdução

Atualmente, a soja processada é a maior fonte mundial de ração animal e a segunda maior fonte de óleo vegetal (MEADE et al., 2016; O'DONOGHUE et al., 2016; USDA, 2017). Porém, sementes e plantas de soja são altamente suscetíveis ao ataque de patógenos do solo em suas diversas fases de crescimento (PIRES et al., 2016; CAMPBELL, LI, BUCK, 2017; MENGISTU et al., 2018; DÍAZ-CRUZ, CASSONE, 2018). Assim, para proteger as sementes dos insetos e doenças, as sementes são frequentemente tratadas com pesticidas químicos (NETTLES et al., 2016; BUENO, CUNHA, SANTANA, 2017; ROBERTSON, SERRANO, REES, 2017) e biológicos (ZENG et al., 2012; DORIGHELLO et al., 2015), incluindo produtos à base de *Trichoderma spp.* (JOHN et al., 2010; ZHANG et al., 2016; ZHANG et al., 2017).

Mesmo com tantos benefícios do uso do *Trichoderma spp.* para o controle biológico de fitopatógenos e promoção de crescimento de plantas e com a grande quantidade de estudos realizados, são relatados na literatura problemas associados à produção industrial e comercialização de produtos à base de *Trichoderma spp.* (LÓPEZ-BUCIO, PELAGIO-FLORES, HERRERA-ESTRELLA, 2015; BAE et al., 2016; GAJERA et al., 2016; HIRPARA et al., 2017; EL-DEBAIKY, 2017; KIRIGA et al., 2018). Locatelli et al. (2018) relata que o maior problema existente é em relação ao uso de formulações ineficientes que não garantem a viabilidade do microrganismo e sua eficácia quando aplicado no campo. Outro problema também apontado é a vida de prateleira reduzida do produto quando comparado a produtos químicos (JIN, CUSTIS, 2011; MUÑOZ-CELAYA et al., 2012).

Alguns autores estudaram a aplicação de métodos de encapsulação para aumentar a vida útil de produtos à base de *Trichoderma harzianum* (JIN & CUSTIS, 2011; MUÑOZ-CELAYA et al., 2012; LOCATELLI et al., 2018). O método de microencapsulação por *spray drying* tem se mostrado uma alternativa interessante para obtenção de microrganismos em pó, devido à versatilidade do processo, baixo custo comparado com outros métodos, possibilidade de desidratação das células testando-se baixas temperaturas, além da adição de materiais de parede com intuito de proteger os microrganismos (LI et al., 2017; RODRÍGUEZ-RESTREPO 2017; WU et al., 2018). Além disso, produtos desidratados são desejáveis devido à sua maior estabilidade e praticidade de manuseio. Mesmo com as diversas vantagens do método, estudos discutem que produtos a base de *Trichoderma spp.* precisam possuir um maior tempo de vida

de prateleira para concorrer comercialmente com produtos químicos (ABADIAS et al., 2000). Dessa forma, estudos que avaliem a sobrevivência dos conídios após o processo de secagem e durante o armazenamento são requeridos.

Em estudos de secagem as isotermas de sorção de umidade apresentam dados termodinâmicos valiosos sobre o material, tais como elaboração de cálculos de processos de secagem, assim como a previsão da umidade de determinado produto após a desidratação (LANGRISH, 2009) e predição da estabilidade de armazenamento de produtos (TAPIA, ALZAMORA, & CHIRIFE, 2007). Por este motivo estudos envolvendo isotermas de sorção de umidade foram o ponto central de diversos trabalhos com produtos secos por *spray drying*, tais como suco de laranja (SORMOLI, LANGRISH, 2015), polpa de tamarillo (MUZAFFAR, KUMAR, 2016), proteína de ervilha recheada com gordura (DOMIAN et al, 2018).

O objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade ao longo do tempo das micropartículas de conídios de *Trichoderma asperellum* produzidos por *spray drying* utilizando maltodextrina DE20 (MD20) como material de parede em diferentes temperaturas de armazenamento. Aplicar os conídios livres e microencapsulados em sementes de soja, tratadas ou não quimicamente por fungicidas e inseticidas químicos. Além disso, aferir o ganho de umidade das amostras ao longo do tempo por meio do comportamento das isotermas de adsorção de umidade.

## 5.2 Material e métodos

### 5.2.1 Suspensão de conídios de *Trichoderma asperellum* e material de parede

As suspensões dos conídios de *Trichoderma asperellum*, obtidas por fermentação em estado sólido foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Biocontrole Farroupilha-Lallemand, localizado na cidade de Patos de Minas-MG-Brasil. Maltodextrina DE20 (Fornecedor: Galena) foi utilizada como material de parede na realização dos ensaios de microencapsulação dos conídios de *Trichoderma asperellum*.

### 5.2.2 Produção das micropartículas e material controle em pó

As amostras produzidas para a realização dos estudos propostos neste capítulo foram preparadas utilizando-se as condições operacionais definidas no estudo de otimização e validação (Capítulo 4). A suspensão de alimentação do *spray dryer* foi preparada misturando-se MD20 à suspensão de *Trichoderma asperellum* na proporção de 1:4,5 (massa seca de conídios de *Trichoderma asperellum*/massa seca de MD20) e alimentada ao secador com  $T_1$  do ar de secagem de 80°C. Amostras controle (sem adição de maltodextrina DE20) nas mesmas condições operacionais também foram produzidas para comparação dos resultados.

As suspensões foram caracterizadas antes de cada experimento em relação à: umidade, contagem da concentração de esporos, germinação e UFC. Após o processo de secagem os pós foram caracterizados quanto à: umidade, atividade de água, higroscopicidade, solubilidade em água, germinação e UFC.

Biofungicida comercial à base de *Trichoderma asperellum*, codificado por PCT, foi adquirido no comércio local para comparação dos resultados dos ensaios de vida de prateleira e tratamento de sementes. Este produto comercial apresentou em sua composição 13% de conídios de *Trichoderma spp.* A secagem do PCT para obtenção do produto comercial em pó foi realizada por circulação forçada de ar à 27°C durante aproximadamente 40 horas. Para garantir uma comparação adequada da vida de prateleira dos produtos biológicos adquiriu-se o PCT com o mesmo período de produção do produto microencapsulado e da amostra controle.

### 5.2.3 Análises físico-químicas e microbiológicas

A suspensão de conídios de *Trichoderma asperellum* foi caracterizada por contagem da concentração de esporos em câmara de Neubauer, germinação e unidades formadoras de colônia. As micropartículas, amostra controle e produto comercial foram caracterizadas quanto a umidade, contagem da concentração de esporos, germinação e unidades formadoras de

colônia. Conforme descrito nos itens 2.2.4.1, 2.2.4.5, 2.2.4.6 e 3.2.3.2, respectivamente, com objetivo principal de avaliar a quantidade de conídios viáveis (CV) e percentual de sobrevivência dos conídios (SP).

#### **5.2.4 Viabilidade dos conídios de *Trichoderma asperellum* antes e depois da secagem por *spray drying* e durante o período de armazenamento**

Para a realização da viabilidade dos conídios de *Trichoderma asperellum* foram selecionadas três amostras, os conídios microencapsulados, uma amostra controle (sem adição de material de parede) e um produto comercial (PCT) a base de *Trichoderma spp.*, para comparação dos resultados. A viabilidade celular dos conídios de *Trichoderma asperellum* após os processos de secagem em *spray drying* e durante o período de armazenamento foram avaliadas por meio de testes de germinação e UFC. Foram utilizadas duas temperaturas para armazenar as amostras, 4°C e 25°C. As amostras foram armazenadas em embalagens laminadas e acondicionadas em câmara B.O.D. (Ethiktechnology, Brasil) para posterior avaliação de 0 à 208 dias de armazenamento.

#### **5.2.5 Tratamento de sementes de soja: efeitos do armazenamento na viabilidade dos conídios microencapsulados**

Sementes de soja, gentilmente cedidas pelo Laboratório Farroupilha-Lallemand, foram empregadas para realização deste estudo. O produto químico utilizado foi o Standak Top (ST) (Composição: inseticida Fipronil do grupo pizarol (250 g L<sup>-1</sup>) e os fungicidas Piraclostrobina do grupo das estrubirulinas (25 g L<sup>-1</sup>) e Metil tiofanato do grupo dos benzimidazois (225 g L<sup>-1</sup>), inseticida e fungicida muito utilizado para tratamento de sementes de soja e outros importantes cultivos (FERREIRA et al., 2016; ARAUJO et al., 2017). Para o tratamento das sementes de soja foram utilizadas as doses recomendadas na bula do produto. Foram selecionadas duas amostras de *Trichoderma asperellum*, os conídios microencapsulados e um produto comercial, PCT para comparação dos resultados.

A fim de proporcionar o total recobrimento das sementes, as amostras de produtos químicos (Standak top - ST) e biológicos (microencapsulado e PCT) foram diluídas em água, formando uma calda, porém para comparar a estabilidade das micropartículas em presença de água foram feitos tratamentos com e sem adição de calda. Para o tratamento das sementes de soja foram realizados sete aplicações, conforme pode ser visualizado pelos dados da Tabela 5.1, sendo tratados 500 g de semente por tratamento.

**Tabela 5.1.** Tratamentos de sementes de soja.

Trat.	Descrição	Condição
T1	Semente testemunha	2mL de calda/kg de semente
T2	Microencapsulado (com calda)	$1 \times 10^{10}$ UFC kg <sup>-1</sup> de semente + 2mL de calda kg <sup>-1</sup> de semente
T3	Microencapsulado (sem calda)	$1 \times 10^{10}$ UFC kg <sup>-1</sup> de semente
T4	Microencapsulado (com calda) + ST	$1 \times 10^{10}$ UFC kg <sup>-1</sup> + 2mL de calda kg <sup>-1</sup> de semente + 1 mL de ST
T5	Microencapsulado (sem calda) + ST	$1 \times 10^{10}$ UFC kg <sup>-1</sup> de semente + 1 mL de ST
T6	PCT	$1 \times 10^{10}$ UFC Kg <sup>-1</sup> de semente
T7	PCT + ST	$1 \times 10^{10}$ UFC kg <sup>-1</sup> de semente + 1 mL de ST + 2mL de calda kg <sup>-1</sup> de semente

Foi realizada a mistura das sementes com a calda (quando o tratamento possuía calda) em béqueres de 4 L, seguindo a dosagem recomendada pelo fabricante com auxílio de pipeta volumétrica. As sementes foram agitadas vigorosamente com bastão de vidro durante o gotejamento e espalhamento dos produtos. O tempo médio de agitação foi de 5 minutos, objetivando a uniformidade dos tratamentos e da aplicação. Primeiramente, os grãos foram tratados com os produtos químicos e posteriormente com os biológicos. As sementes de cada tratamento foram divididas para futuras avaliações e armazenadas em embalagens de plástico, alocadas dentro de uma caixa de papelão, à temperatura ambiente, como pode ser visto na Figura 5.1.

**Figura 5. 1** Acondicionamento das sementes de soja em embalagens de plástico.

Para avaliar a estabilidade dos conídios de *Trichoderma asperellum* após o tratamento de sementes e durante o período de armazenamento foram realizadas a contagem de unidades formadoras de colônia ao 1°, 7°, 15°, 30°, 55°, 68°, 85°, 113° e 124° dias de armazenamento.

### **5.2.5.1 Unidades formadoras de colônia – Tratamento de semente (TS)**

Em câmara de fluxo lamilar, diluições seriadas foram realizadas nas sementes tratadas com o objetivo de se avaliar os valores de UFC de cada amostra. A primeira diluição consistiu em colocar 90 sementes tratadas de soja em erlenmeyers de 250 mL contendo 90 mL de água isotônica (NaCl 8,5%) com tween (2,5%). A solução foi agitada em mesa agitadora durante 15 minutos a 220 rpm (rotações por minuto). A segunda diluição consistiu em pegar uma alíquota de 1 mL da primeira diluição e transferi-lá para um tubo de falcon contendo 9 mL de água estéril. O procedimento foi executado até a quinta diluição. O plaqueamento das soluções foi feito em placas de petri estéreis contendo meio de cultura PDA com triton, mediante o espalhamento de alíquotas de 100 µL na superfície das mesmas. As placas foram incubadas em câmara B.O.D. com temperatura controlada de 25°C durante sete dias. As colônias formadas foram contadas manualmente após 48 horas de incubação.

### **5.2.6 Isotermas de adsorção**

As isotermas de adsorção de umidade foram determinadas pelo método gravimétrico estático. Sete soluções salinas saturadas foram utilizadas, LiCl, CH<sub>3</sub>COOK, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, KI, NaCl, KCl e BaCl<sub>2</sub>, com o intuito de fornecer valores de umidade relativa de 11,3%, 22,6%, 43,2%, 68,9%, 75,3%, 84,3% e 90,2%, respectivamente, na temperatura constante de 25°C (GREENSPAN, 1977). Aproximadamente 1 g dos conídios microencapsulados de *Trichoderma asperellum*, amostra controle e PCT foram colocados em cápsulas de porcelana e acondicionadas em dessecadores de vidro contendo as respectivas soluções saturadas até que o equilíbrio fosse atingido. Os dessecadores foram colocados na B.O.D. para controle da temperatura. Posteriormente, a umidade de equilíbrio, em base seca, das amostras foi determinada por método gravimétrico.

Os modelos de Brunauer-Emmentt-Teller (BET), Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB), Halsey, Oswin, Peleg e Smith foram ajustados aos dados experimentais, Equações, 1, 2, 3, 4, 5 e 6, respectivamente.

**Tabela 5.2.** Modelos matemáticos para o ajuste de isotermas de sorção de umidade.

<b>Modelo</b>	<b>Equação</b>
BET	$X_{eq} = \frac{X_m C a_w}{[(1 - a_w)(1 + (C - 1)a_w)]} \quad (1)$
GAB	$X_{eq} = \frac{(C - 1)K a_w X_m}{1 + (C - 1)K a_w} + \frac{K a_w X_m}{1 - K a_w} \quad (2)$
Halsey	$X = \left[ \frac{-A}{T \ln a_w} \right]^{\frac{1}{B}} \quad (3)$
Oswin	$X = A \left[ \frac{a_w}{(1 - a_w)} \right]^B \quad (4)$
Peleg	$X = K_1 a_w^{n_1} + K_2 a_w^{n_2} \quad (5)$
Smith	$X = A + B \log(1 - a_w) \quad (6)$

em que  $X_{eq}$  é a umidade de equilíbrio, em base seca (b.s),  $X_m$  (b.s) é o umidade na monocamada molecular,  $a_w$  é a atividade de água,  $n$  é o número de camadas moleculares,  $C$ ,  $K$ ,  $A$ ,  $B$ ,  $K_1$ ,  $K_2$ ,  $n_1$  e  $n_2$  são constantes de sorção dos modelos.

Utilizou-se o software MATLAB para estimar os parâmetros ajustando os modelos aos dados obtidos experimentalmente, por meio de regressão não-linear, utilizando o método estatístico dos mínimos quadrados. Nas avaliações dos modelos ajustados foram utilizados o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e o erro médio quadrático (RMSE) para verificar a adequação dos mesmos, além da distribuição dos pontos, de modo a verificar uma variância constante de erros.

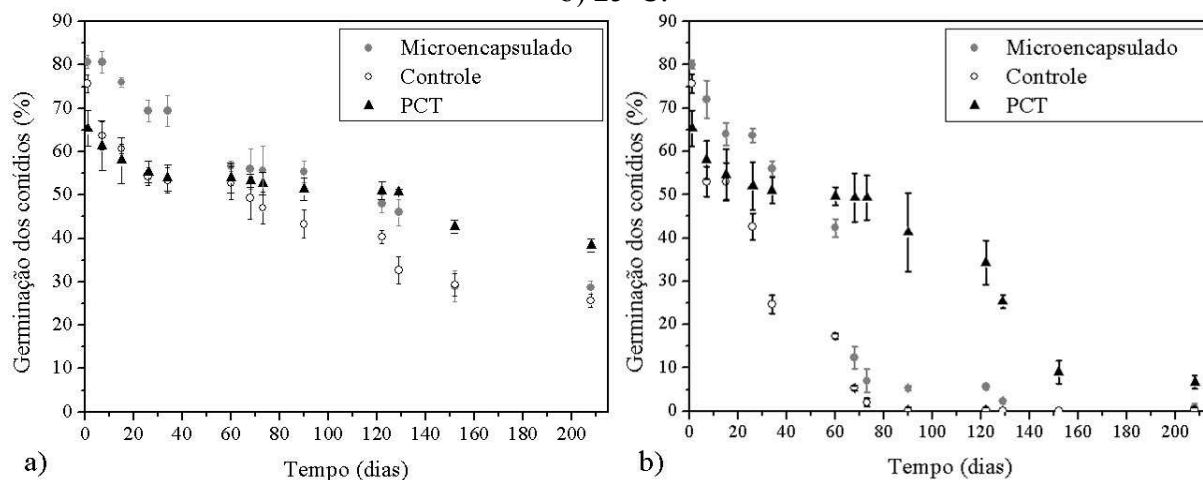
### 5.3 Resultados e discussão

#### 5.3.1 Viabilidade dos conídios de *Trichoderma asperellum* após secagem por *spray dryng* e durante o período de armazenamento

Na Figura 5.2 estão apresentadas as germinações dos conídios de *Trichoderma asperellum* (microencapsulados, controle e PCT) durante o período de armazenamento nas temperaturas de 4°C (Figura 1-a) e 25°C (Figura 1-b), respectivamente.



**Figura 5.2.** Germinação dos conídios de *Trichoderma asperellum* ao longo do tempo: a) 4°C b) 25°C.

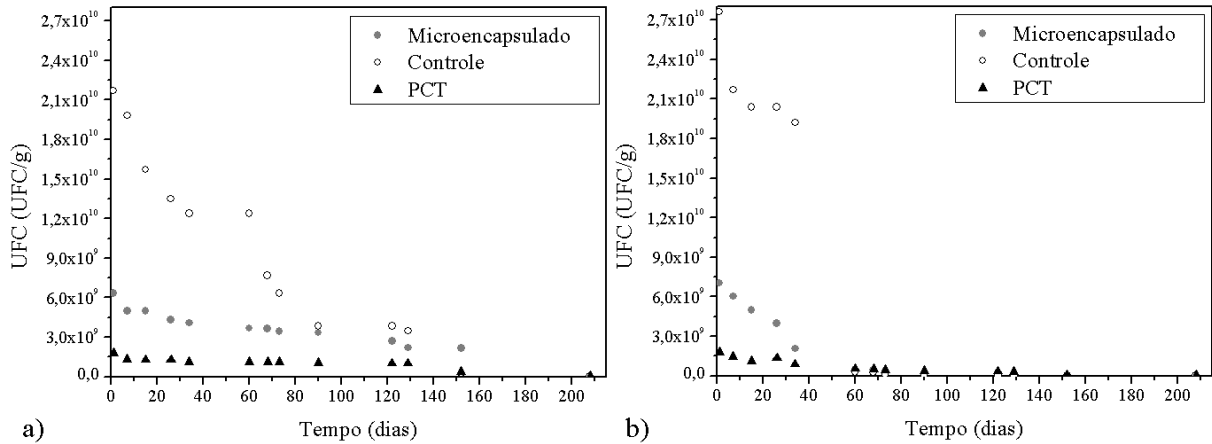


Após o período de 7 dias de armazenamento à 4°C (Figura 5.2-a) percebeu-se que a germinação dos conídios microencapsulados não teve redução significativa, passando-se de  $80,67\% \pm 1,53\%$  para  $80,64\% \pm 2,52\%$ . A redução de germinação da amostra controle (sem material de parede) e do produto comercial (PCT) foi maior,  $75,67\% \pm 2,08\%$  à  $63,67\% \pm 3,21\%$  e  $65,33\% \pm 4,16\%$  à  $61,33\% \pm 5,77\%$ , respectivamente. Aos 90 dias de armazenamento na temperatura de 4°C a germinação dos conídios microencapsulados, amostra controle e produto comercial (PCT) foram de  $55,33\% \pm 2,52\%$ ,  $43,33\% \pm 3,21$  e  $51,33\% \pm 2,52$ , respectivamente, tal fato confirma que a adição de MD20 ao processo de *spray drying* contribuiu para preservação e conseqüentemente na germinação dos conídios ao longo do tempo. Após 286 dias de armazenamento a germinação dos conídios foi de  $17,67 \pm 3,06\%$ ,  $6,67 \pm 1,15\%$  e  $30,33 \pm 2,52\%$  para as micropartículas, amostra controle e produto comercial, respectivamente.

Na temperatura de 25°C (Figura 1-b) a queda inicial de germinação dos conídios após 7 dias de armazenamento foi maior, de  $80,00\% \pm 1,00\%$  à  $72,00\% \pm 4,36$  (microencapsulado),  $75,67\% \pm 2,08$  à  $53,00\% \pm 3,46$  (controle) e  $65,33\% \pm 4,16\%$  à  $58,00\% \pm 4,36\%$  (produto comercial - PCT). É possível observar pela Figura 5.2-b que após 68 dias de armazenamento ocorreu uma queda brusca na germinação dos conídios microencapsulados e controle, enquanto que o produto comercial (PCT) se manteve mais estável. Acredita-se que isto ocorreu pelo fato do produto comercial possuir alguns estabilizantes, enquanto que o produto microencapsulado possui apenas o microrganismo revestido pela maltodextrina. Após 286 dias de armazenamento não houve germinação dos conídios microencapsulados (0%) e da amostra controle (0%), e o percentual do produto comercial também foi insignificante ( $1,33\% \pm 1,15\%$ ).

Na Figura 5.3 estão apresentadas as unidades formadoras de colônia dos conídios de *Trichoderma asperellum* microencapsulados, controle e produto comercial (PCT) durante o período de armazenamento nas temperaturas de 4°C e 25°C, respectivamente.

**Figura 5.3.** UFC dos conídios de *Trichoderma asperellum* ao longo do tempo. a) 4°C b) 25°C.



À 4°C os conídios de *Trichoderma asperellum* microencapsulados, a amostra controle e o PCT tiveram uma contagem de colônias inicial de  $6,32 \times 10^9$ ,  $2,17 \times 10^{10}$  e  $1,78 \times 10^9$  log CFU  $g^{-1}$ , respectivamente. Aos 60° dia de armazenamento a viabilidade dos pós diminuiu aproximadamente 2,69, 3,5 e 0,66 log UFC  $g^{-1}$ , respectivamente. Aos 152 dias de armazenamento a porcentagem de unidades formadoras de colônia viáveis em relação ao valor inicial foi de aproximadamente 34,44% ( $2,17 \times 10^9$ ), 1,20% ( $2,61 \times 10^8$ ) e 20,62% ( $3,67 \times 10^8$  UFC  $g^{-1}$ ), para os conídios microencapsulados, controle e produto comercial (PCT), respectivamente. Após 208 dias de armazenamento a vida de prateleira dos conídios reduziu consideravelmente, apresentando valores de CFU  $g^{-1}$  de  $1,93 \times 10^7$  CFU  $g^{-1}$ ,  $1,59 \times 10^6$  CFU  $g^{-1}$  e  $2,83 \times 10^7$  CFU  $g^{-1}$  para o produto microencapsulado, controle e produto comercial (PCT), respectivamente.

Avaliando-se as unidades formadoras de colônia dos conídios armazenados a 25°C é notável que a redução de viabilidade foi muito maior do que quando armazenados à 4°C. Aos 60 dias de armazenamento à porcentagem de unidades formadoras de colônia à 25°C para os conídios microencapsulados, controle e produto comercial (PCT) foram de 7,01% ( $4,93 \times 10^8$  CFU  $g^{-1}$ ), 0,97% ( $2,69 \times 10^8$  CFU  $g^{-1}$ ) e 31,46% ( $5,37 \times 10^8$  CFU  $g^{-1}$ ) e aos 152 dias de armazenamento foram de 0,27% ( $1,93 \times 10^7$  CFU  $g^{-1}$ ), 0,0058% ( $1,59 \times 10^6$  CFU  $g^{-1}$ ) e 1,59% ( $2,83 \times 10^7$  CFU  $g^{-1}$ ), respectivamente. Após 208 dias de armazenamento a vida de prateleira dos conídios reduziu consideravelmente, apresentando valores de CFU  $g^{-1}$  de  $1,59 \times 10^7$  CFU  $g^{-1}$ ,  $1,03 \times 10^6$  CFU  $g^{-1}$  e  $2,55 \times 10^7$  CFU  $g^{-1}$  para o produto microencapsulado, controle e produto

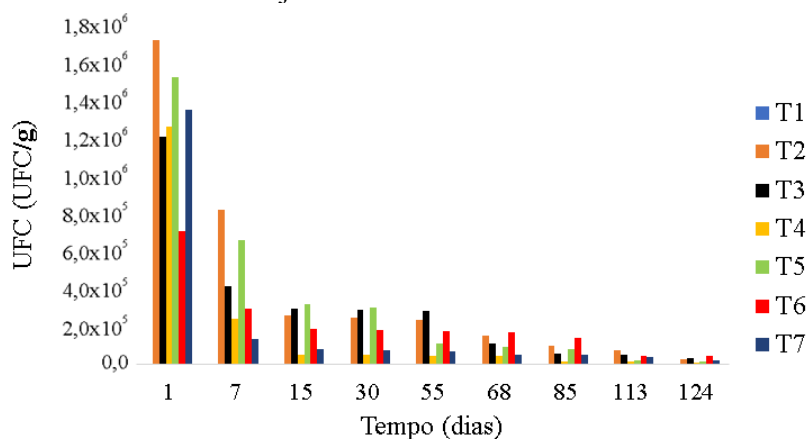
comercial (PCT), respectivamente. Estas verificações corroboram com outros estudos realizados de avaliação da sobrevivência de microrganismos secos por *spray drying* em diferentes temperaturas de armazenamento (PAEZ et al., 2012; BARBOSA, BORGES, TEIXEIRA, 2016; REYES et al., 2018).

Semyonov et al. (2011) avaliaram o efeito do armazenamento na estabilidade de micropartículas de *Lactobacillus casei subsp. paracasei* produzidas por *spray drying* e armazenadas em diferentes temperaturas, 4, 25 e 37°C, sendo compostas por matrizes de maltodextrina e equivalentes de dextrose (DE5 e DE19) e uma mistura de maltodextrina-trealose. Os autores concluíram que temperaturas de armazenamento mais altas afetaram a sobrevivência dos microrganismos de forma muito significativa, após 7 e 28 dias, a sobrevivência foi consideravelmente perdida nas temperaturas de 37 e 25°C, enquanto que quando armazenado em 4°C a viabilidade alcançada foi acima de 70% por mais de 40 dias de armazenamento. Outro fator externo que influenciou na sobrevivência probiótica foi o oxigênio, amostras armazenadas com nitrogênio mantiveram maior viabilidade do que as amostras armazenadas com ar, à 25 °C, segundo os autores. Tal fato pode ser explicado pela oxidação de lipídios da membrana, que podem causar a produção de hidroperóxidos, podendo acarretar danos ao DNA do microrganismo (AKASAKA, 1986; MUÑOZ-CELAYA). Chavez e Ledebuer (2007) também relataram alta viabilidade celular utilizando baixos níveis de oxigênio durante o armazenamento de microrganismos probióticos.

### **5.3.2 Tratamento de sementes de soja: efeitos do armazenamento na viabilidade dos conídios microencapsulados**

Na Figura 5.4 está apresentado o número de unidades formadoras de colônia ao longo do tempo de armazenamento para os tratamentos de sementes de soja.

**Figura 5.4.** UFC dos conídios de *Trichoderma asperellum* dos tratamentos ao longo do tempo após o tratamento das sementes de soja.



Alguns trabalhos têm sido reportados na literatura estudando a integração de métodos químicos e biológicos para controle de patógenos causadores de doenças em plantas, sendo um dos objetivos principais reduzir ou eliminar o uso de pesticidas nas lavouras, almejando uma agricultura sustentável (WRIGHT, VERKERK, 1995; HU et al., 2016). Entretanto, tal prática requer precaução, pois a associação de microrganismos conjuntamente com produtos químicos pode causar perda de viabilidade dos mesmos (MUIÑO et al., 2001; PANDOLFO, 2007).

Como pode ser observado, a semente testemunha (T1) não estava contaminada no período inicial do ensaio e se manteve sem contaminação durante o decorrer do experimento. Comparando-se os tratamentos com os conídios microencapsulados com calda (T2) e sem calda (T3) foi verificado que a redução no número de UFC foi maior para o tratamento com calda, que inicialmente estava com  $1,69 \times 10^6$  CFU  $g^{-1}$  de semente e após 30 dias reduziu para  $2,41 \times 10^5$  UFC  $g^{-1}$  de semente, enquanto que o tratamento sem calda (T3) inicialmente estava com  $1,19 \times 10^6$  UFC  $g^{-1}$  de semente e após 30 dias reduziu para  $2,82 \times 10^5$  CFU  $g^{-1}$  de semente.

Comparando-se os tratamentos T4, T5 e T7, que tiveram integração entre os agentes biológicos e produto químico, percebe-se que o tratamento T5, contendo os conídios de *Trichoderma asperellum* microencapsulados (sem calda) obteve o maior percentual de sobrevivência dos conídios após 30 dias de armazenamento das sementes, sendo de 20,8%, 3,79% e 5,59%, respectivamente. Ainda para T4 (microencapsulado com calda e químico), T5 (microencapsulado sem calda e químico) e T7 (produto comercial à base de *Trichoderma* – PCT e químico), após 85 dias de armazenamento as contagens de unidades formadoras de colônia obtidas foram de aproximadamente  $1,32 \times 10^4$  CFU  $g^{-1}$ ,  $7,83 \times 10^4$  CFU  $g^{-1}$  e  $4,70 \times 10^4$  CFU  $g^{-1}$ , respectivamente.

Em relação aos tratamentos que não sofreram integração com o produto químico (T2, T3 e T6) também foi observado perda de viabilidade ao longo do tempo, provalvemente devido aos efeitos da temperatura de armazenamento e de oxidação pela presença de ar nas embalagens plásticas.

Não foram encontrados na literatura trabalhos que avaliaram a viabilidade de microrganismos microencapsulados ao longo do tempo aplicados em sementes com ou sem interação de tratamento químico para comparação dos resultados.

### 5.3.3 Isotermas de adsorção do pó dos conídios microencapsulados por *spray drying*

Os dados de umidade de equilíbrio dos pós de conídios de *Trichoderma asperellum* microencapsulados por *spray drying* que foram armazenados em diferentes umidades relativas, estão apresentados na Tabela 5.3.

Foi observado que o tempo para alcançar o equilíbrio variou entre as amostras de acordo com a solução salina em que estavam inseridas. De forma geral, o tempo necessário para entrarem em equilíbrio aumentou conforme a redução da umidade relativa do ambiente em que as amostras estavam inseridas. Além disso, foi observado que o tempo para atingir o equilíbrio apresentou variações entre as amostras avaliadas, fato que pode ser justificado pelas diferentes composições dos produtos.

**Tabela 5.3.** Umidades de equilíbrio dos pós dos conídios de *Trichoderma asperellum* produzidos pelo processo de *spray drying* utilizando MD20 como material de parede, da amostra controle e do PCT.

$a_w$	Umidade de equilíbrio (g água g sólidos secos <sup>-1</sup> )		
	Microencapsulado	Controle	PCT
0,113	0,0011 ± 0,000	0,0450 ± 0,002	0,0138 ± 0,002
0,226	0,0023 ± 0,001	0,0509 ± 0,001	0,0191 ± 0,000
0,432	0,0043 ± 0,002	0,1834 ± 0,001	0,0317 ± 0,000
0,529	0,0053 ± 0,002	0,1786 ± 0,001	0,0346 ± 0,001
0,689	0,0069 ± 0,005	0,1847 ± 0,001	0,0326 ± 0,001
0,753	0,0075 ± 0,002	0,2284 ± 0,003	0,0408 ± 0,003
0,843	0,0084 ± 0,004	0,3821 ± 0,001	0,0458 ± 0,001
0,902	0,0090 ± 0,006	0,4003 ± 0,003	0,0530 ± 0,002

Na Tabela 5.4 estão apresentados os parâmetros ajustados dos modelos de BET, GAB, Halsey, Peleg e Smith. O modelo de Smith apresentou alguns resultados negativos de umidade de equilíbrio para as amostras, por esse motivo este modelo foi descartado da avaliação.

**Tabela 5.4.** Parâmetros estimados pelos modelos de BET, GAB, Halsey e Peleg para os pós dos conídios de *Trichoderma asperellum*.

Modelo	Amostras			
	Microencapsulado	Controle	PCT	
<b>BET</b>	$X_m$ (b.s)	0,059	0,049	0,007
	C	480,200	$1,97 \times 10^4$	1726
	$R^2$	0,989	0,738	0,267
	RMSE	0,030	0,073	0,016
	<b>GAB</b>	$X_m$ (b.s)	0,057	0,105
C		2719	6,835	16,86
K		1,005	0,839	0,605
$R^2$		0,978	0,927	0,947
RMSE		0,033	0,042	0,003
<b>Halsey</b>	A	16,890	6,835	0,913
	B	1,154	1,784	0,098
	$R^2$	0,968	0,906	0,777
	RMSE	0,036	0,044	0,042
<b>Peleg</b>	$k_1$	-6,679	-10,34	-0,040
	$n_1$	3,871	165,100	0,432
	$k_2$	7,515	0,434	0,090
	$n_2$	3,884	1,434	0,530
	$R^2$	0,839	0,883	0,918
	RMSE	0,098	0,060	0,005
<b>Oswin</b>	A	0,11	0,152	0,030
	B	0,754	0,46	0,267
	$R^2$	0,951	0,923	0,943
	RMSE	0,044	0,04	0,003

De acordo com a Tabela 5.4, o modelo de BET se ajustou melhor aos dados experimentais, comparado com o modelo de GAB, com valores maiores do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,989 e menores de RMSE de 0,021 para as amostras dos conídios microencapsulados em pó. O modelo de GAB apresentou o segundo melhor ajuste em comparação aos demais, ( $R^2$ ) de 0,978 e RMSE de 0,033 para os conídios microencapsulados. Entretanto, comparando as amostras controle e PCT o modelo de GAB se ajustou melhor aos dados em comparação com BET. A partir da equação de BET, duas constantes são estimadas, o valor de umidade da monocamada ( $X_m$ ) e a constante de energia (C) (TIMMERMANN, CHIRIFE, IGLESIAS, 2001).

Os modelos de GAB e BET apresentam o conceito da monocamada molecular ( $X_m$ ) (ZOU et al., 2016), que atua como um indicativo de valor confiável para a estabilidade de produtos em pó (RAHMAN, 2008). Ajustes realizados para obtenção das isotermas permitem um entendimento físico da teoria da adsorção, sendo possível avaliar o conteúdo de umidade da monocamada ( $X_m$ ) das amostras (ANDRADE, LUMES, PÉREZ, 2011). Segundo Muzaffar e Kumar (2016) o  $X_m$  mede a disponibilidade de locais de sorção ativos, e o parâmetro C determina a força de ligação das moléculas de água as regiões de ligação primária na superfície do produto, quanto maior o valor de C mais fortes serão as ligações.

Os valores estimados da monocamada molecular ( $X_m$ ) para os conídios de *Trichoderma asperellum* microencapsulados com MD20 ficaram próximos a 0,057 g água g<sup>-1</sup> sólidos secos (5,7%) utilizando o modelo GAB e de 0,059 g água g<sup>-1</sup> sólidos secos (5,9%) utilizando o modelo de BET, esses valores indicam a quantidade de água que foi fortemente adsorvida em locais do produto em pó, em g água/g sólidos secos. Os valores de  $X_m$  estimados para os conídios secos por *spray drying* sem utilização de maltodextrina ficaram próximos de 0,049 g água g<sup>-1</sup> sólidos secos (4,9%) utilizando o modelo de BET e de 0,105 g água g<sup>-1</sup> sólidos secos (10,5%) aplicando o modelo de GAB e de 0,007 para o produto comercial a base de *Trichoderma asperellum* utilizando o modelo de BET e de 0,024 g água g<sup>-1</sup> sólidos secos (2,40%) fazendo uso do modelo de GAB.

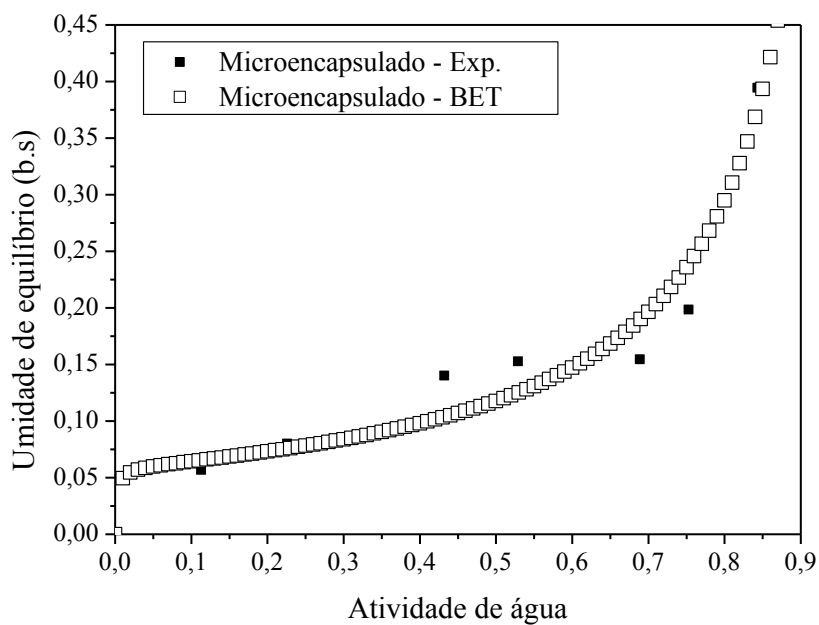
No trabalho de Ying et al. (2010) foi observado o valor da monocamada ( $X_m$ ) de  $2,93 \pm 0,06\%$  (g de água 100 g<sup>-1</sup> de massa seca) para pós de *Lactobacillus rhamnosus* utilizando proteína de soro e amido resistente na formulação de microencapsulação, ambos os trabalhos utilizaram o processo de *spray drying*. Segundo Ying et al. (2010) conteúdo de água acima do valor da monocamada pode tornar um produto propenso a sofrer deterioração. Timmermann (2003) aborda que a equação de GAB é superior à BET, por apresentar um intervalo de atividade de água muito maior. Segundo Andrade et al. (2011) o modelo de BET é aconselhável para atividades de água de 0,05 a 0,45, entretanto neste estudo foram encontrados bons resultados de ajuste para a equação de BET em toda a faixa de atividade de água utilizada para os conídios de *Trichoderma asperellum* microencapsulados, além disso foi o modelo que obteve o melhor ajuste em comparação a todos os demais para os conídios microencapsulados. Para as outras amostras o modelo de GAB apresentou melhores ajustes.

Ao se comparar o modelo de Peleg com os demais, verificou-se que este apresentou o pior ajuste para a amostra microencapsulada ( $R^2$  de 0,839) e os maiores valores de RMSE para as micropartículas de conídios de *Trichoderma asperellum* e PCT. No entanto, nenhuma das

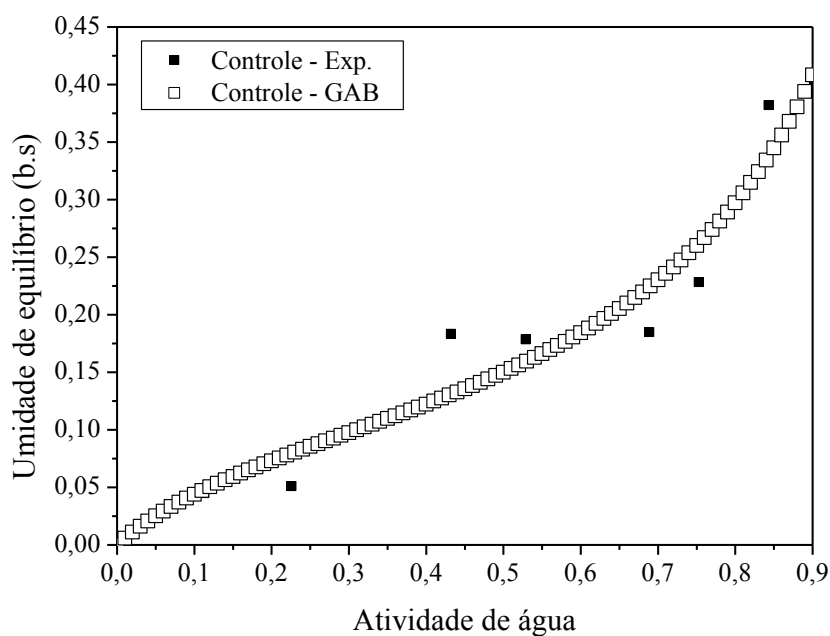
amostras está de acordo com a condição de restrição do uso do modelo,  $n_1 > 1$  e  $n_2 < 1$  (ANDRADE et al., 2011). Para a amostra controle e PCT os modelos que apresentaram os melhores ajustes foram os de GAB e Oswin. Embora existam na literatura trabalhos sobre microencapsulação de *Trichoderma spp.* por *spray drying* não foram encontrados estudos sobre as isothermas de absorção de umidade. Nas Figuras de 5.5 a 5.7 são apresentadas as isothermas de adsorção de umidade dos pós de conídios de *Trichoderma asperellum*, amostra controle e PCT para os modelos que melhor se ajustaram aos dados. Os resultados experimentais são representados pela média da triplicata realizada.



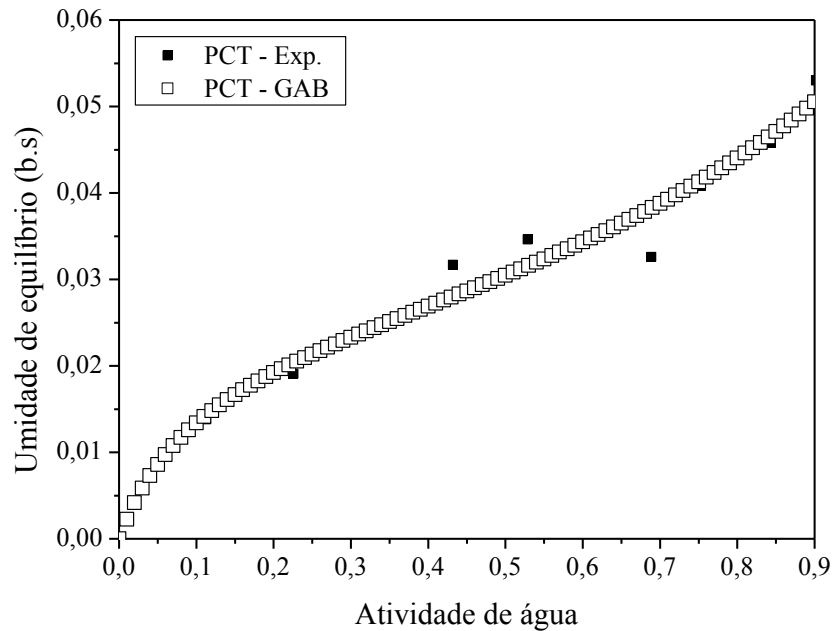
**Figura 5.5.** Modelo de BET para as isotermas de adsorção à 25°C para o pó dos conídios de *Trichoderma asperellum* microencapsulados por *spray drying* utilizando MD20 como material de parede.



**Figura 5.6.** Modelo de GAB para as isotermas de adsorção à 25°C para a amostra controle.



**Figura 5.7.** Modelo de GAB para as isotermas de adsorção à 25°C para o PCT.



As isotermas de sorção mostram na forma gráfica a variação da umidade de equilíbrio de uma amostra presente em uma determinada temperatura estabelecida em função da atividade de água (KUDRA, MUJUMDAR, 2009), podendo ser classificadas em cinco tipos (I, II, III, IV e V) (BRUNAUER et al., 1938). Nesse estudo, observa-se que as isotermas obtidas para os conídios microencapsulados com MD20 apresentam uma configuração um comportamento semelhante de adsorção de umidade e configuração do tipo III, conhecidas como isotermas de Flory-Huggins, segundo Brunauer (NIKITAS, 1984; RIZVI, 1995). Esse comportamento significa a adsorção de um solvente acima da temperatura de transição vítrea (BHANDARI, ADHIKARI, 2008). As isotermas obtidas por Hoobin et al. (2003) para a microencapsulação de *Lactobacillus rhamnosus* por *freeze* também foram do tipo III. Segundo Al-Muhtaseb et al. (2002) isotermas do tipo III são mais características para açúcares, e nos três estudos informados foi utilizado maltodextrina na formulação dos produtos antes do processo de secagem.

Pela Figura 5.5 é possível avaliar que até a umidade relativa de 52,9%, a adsorção de umidade dos conídios microencapsulados com maltodextrina apresentaram um comportamento semelhante. Visualmente foi observado que as amostras presentes em umidades relativas mais baixas, de até 52,9%, apresentaram aspecto duro e compacto. Nas umidades relativas

intermediárias, 68,9% à 75,3%, foi verificado a formação de *caking* e estrutura rígida, além de mudança na coloração. Segundo Aguilera, Del Valle e Karel (1995) o estado rígido é devido a compactação, estágio presente na aglomeração de partículas, em consequência da perda de integridade do sistema, como redução dos espaços e deformação de aglomerados. Em umidades relativas mais altas, de 84,3% e 90,2%, o material apresentou-se úmido e pastoso para os conídios de *Trichoderma asperellum* microencapsulados e controle. Tal fato foi justificado pela alta umidade das amostras, estágio final do processo de aglutinação, onde ocorre solubilização de frações com baixo peso molecular e adsorção de umidade (AGUILERA, DEL VALLE e KAREL, 1995).

Pela avaliação da Figura 5.7 observou-se que o produto comercial mesmo inserido em soluções com umidade relativa mais altas se manteve estável. Porém, ressalta-se que o produto comercial estudado apresenta em sua composição agentes estabilizantes e adjuvantes para melhorar suas propriedades durante o período de armazenamento. Os adjuvantes são componentes adicionados na formulação de produtos biológicos que são capazes de aprimorar a eficácia dos ingredientes ativos e melhorar o desempenho do produto quando aplicado (SICA et al., 2016; BASTOS et al., 2017; TODERO et al., 2018).

#### 5.4 Considerações finais

Pode-se concluir que a técnica de microencapsulação por *spray drying* utilizando MD20 foi capaz de estender a vida de prateleira dos conídios de *Trichoderma asperellum*, comparado com a amostra controle durante o período de armazenamento, e dentre as temperaturas avaliadas a que forneceu maior sobrevivência dos conídios foi 4°C. Em relação ao ensaio de tratamento de sementes pode-se concluir que a melhor forma de aplicação dos conídios microencapsulados é sem calda, pois a presença de água promoveu o rompimento das paredes das micropartículas, que deixaram os conídios livres para sofrerem degradações físicas e químicas.

Os valores experimentais das isotermas dos conídios microencapsulados demonstraram que as propriedades adsorptivas do pó foram significativamente afetadas pela presença de MD20 na formulação. Além de apresentar cristalização, devido às suas especificações composicionais. Os equilíbrios de umidade foram atingidos com tempos mínimos de 7 e máximos de 42 dias.

Mesmo com os resultados satisfatório do uso de MD20, pode-se concluir que este material utilizado de forma isolada não é capaz de garantir estabilidade do produto durante o armazenamento em temperatura ambiente ao longo do tempo, sendo necessário o estudo de novas formulações. Além disso, pelas características avaliadas pelas isotermas é necessário o uso e estudo de embalagens adequadas, atmosfera modificada, armazenamento em temperatura e UR (umidade relativa) apropriadas para manter a estabilidade do produto.

## 5.5 Referências

ABADIAS, M.; TEIXIDÓ, N.; USALL, J.; VIÑAS, I.; MAGAN, N. **Solute stresses affect growth patterns, endogenous water potentials and accumulation of sugars and sugar alcohols in cells of the biocontrol yeast *Candida sake***. Journal of Applied Microbiology, v. 89 (6), p.1009-1017, 2000. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01207.x>.

AGUILERA, M.J.; DEL VALLE, J.M.; KAREL, M. **Caking phenomena in amorphous food powder**. Trends in Food Science & Technology, v.6(5), p.149–155, 1995. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)89023-8](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)89023-8).

ANDRADE, R.D.; LUMES, R.; PÉREZ, C.E. **Models of sorption isotherms for food** : uses and limitations. Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica, v.18, p.325-334, 2011.

AKASAKA, S. **Inactivation of transforming activity of plasmid DNA by lipid peroxidation**. Biochimica and Biophysica Acta, v. 867(4), p. 201-208, 1986. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(86\)90035-7](https://doi.org/10.1016/0167-4781(86)90035-7).

AL-MUHTASEB, A. H., MCMINN, W. A. M.; MAGEE, T. R. A. **Moisture sorption isotherm characteristics of food products: a review**. Chemical Engineering Research and Design, v. 80, p.118-128, 2002.

ARAUJO, R. S.; CRUZ, S. P.; SOUCHIE, E. L.; MARTIN, T. N.; NAKATANI, A. S.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. **Preinoculation of soybean seeds treated with agrichemicals up to 30 days before sowing: technological innovation for large-scale agriculture**. International Journal of Microbiology, p.1-11, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/5914786>.

BAE, S.J.; MOHANTA, T.K.; CHUNG, J.Y.; RYA, M.; PARK, G.; SHIM, S.; HONG, S.B.; SEO, H.; BAE, D.W.; BAE, I.; KIM, J.J.; BAE, H. ***Trichoderma* metabolites as biological control agents against *Phytophthora* pathogens**. Biological Control, v. 92, January 2016, p. 128-138, 2016.

BARBOSA, J.; BORGES, S.; TEIXEIRA, P. **Effect of Different Conditions of Growth and Storage on the Cell Counts of Two Lactic Acid Bacteria After Spray Drying in Orange Juice**. *Beverages*, v. 2(2), p.1-12, 2016. <https://doi.org/10.3390/beverages2020008>.

BHANDARI, B.R.; ADHIKARI, B. **Water activity in food processing and preservation In Drying Technologies in Food Processing**, Edited by Chen, X.D., Mujundar, A.S. John Wiley & Sons Ltd.

BENSEBIA, O.; ALLIA, K. **Analysis of adsorption–desorption moisture isotherms of rosemary leaves**. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, v. 3(3), p. 79-86, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2016.01.005>.

BRUNAUER, S.; EMMETT, P.H.; TELLER, E. **Adsorption of gases in multimolecular layers**. *Journal of the American Chemists’ Society*, v.60, p.309-319, 1938. <https://doi.org/10.1021/ja01269a023>.

BUENO, M.R.; CUNHA, J.P.A.R.; SANTANA, D.G. **Assessment of spray drift from pesticide applications in soybean crops**. *Biosystems Engineering*, v.154, p. 35-45, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2016.10.017>.

BUSTAMANTE, M.; Oomah, B.D.; RUBILAR, M.; SHENE, C. **Effective *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium infantis* encapsulation with chia seed (*Salvia hispanica L.*) and flaxseed (*Linum usitatissimum L.*) mucilage and soluble protein by spray drying**. *Food Chemistry*, v. 216, p.97-105, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.019>.

CAMPBELL, M.A.; LI, Z. ; BUCK, J.W. **Development of southern stem canker disease on soybean seedlings in the greenhouse using a modified toothpick inoculation assay**. *Crop Protection*, v. 100, October 2017, p. 57-64, 2017.

CHAVEZ, B.; LEDEBOER, A. **Drying of Probiotics: Optimization of formulation and process to enhance storage survival**. *Drying Technology*, v. 25(7–8), p. 1193–1201, 2007. <https://doi.org/10.1080/07373930701438576>.

DÍAZ-CRUZ, F.A.; CASSONE, B.J. A tale of survival: **Molecular defense mechanisms of soybean to overcome Soybean mosaic virus infection**. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 102, p. 79-87, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2017.11.006>.

DOMIAN, E.; BRYNDA-KOPYTOWSKA, A.; CIEŚLA, J.; GÓRSKA, A. **Effect of carbohydrate type on the DVS isotherm-induced phase transitions in spray-dried fat-filled pea protein-based powders**. *Journal of Food Engineering*, v. 222, p. 115-125, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.11.012>.

EL-DEBAIKY, S.A. **Antagonistic studies and hyphal interactions of the new antagonist *Aspergillus piperis* against some phytopathogenic fungi in vitro in comparison with *Trichoderma harzianum***. *Microbial Pathogenesis*, v. 113, p. 135-143, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.10.041>.

FARAHNAKY, A.; ANSARI, S.; MAJZOABI, M. **Effect of glycerol on the moisture sorption isotherms of figs**. *Journal of Food Engineering*, v. 93(4), p.468-473, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.02.014>.

FERNÁNDEZ-SANDOVAL, M.T.; ORTIZ-GARCÍA, M.; GALINDO, E.; SERRANO-CARREÓN, L. **Cellular damage during drying and storage of *Trichoderma harzianum* spores**. *Process Biochemistry*, v.47(2), p.186-194, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.10.006>.

FERREIRA, T.F.; OLIVEIRA, J.A.; CARVALHO, R.A.; RESENDE, L.S.; LOPES, C.G.M.; FERREIRA, V.F. **Quality of soybean seeds treated with fungicides and insecticides before and after storage**. *Journal of Seed Science*, v.38(4), p.278-286, 2016. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v38n4161760>.

GAJERA, H.P.; HIRPARA, D.G.; KATAKPARA, Z.A.; PATEL, S.V.; GOLAKIYA, B.A. **Molecular evolution and phylogenetic analysis of biocontrol genes acquired from SCoT polymorphism of mycoparasitic *Trichoderma koningii* inhibiting phytopathogen *Rhizoctonia solani* Kuhn**. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 45, p. 383-392, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.09.026>.

GARCÍA-PEREZ, J. V., C ÁRCEL, J. A., CLEMENTE, G., & MULET, A. **Water sorption isotherms for lemon peel at different temperatures and isosteric heats.** LWT - Food Science and Technology, v. 41(1), p. p. 18-25, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.02.010>.

GHORBANPOUR, A.; SALIMI, A.; TAJICKGHANBARY, M.A.; PIRDASHTI, H.; DEHESTANI, A. **The effect of *Trichoderma harzianum* in mitigating low temperature stress in tomato (*Solanum lycopersicum L.*) plants.** Scientia Horticulturae, v. 230, p.134-141, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.11.028>.

GREENSPAN, L. **Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions.** Journal of Research of the National Bureau of Standards – Physics and Chemistry, v.81(1), p.89-96, 1977.

HIRPARA, D.G.; GAJERA, H.P.; HIRAPARA, J.G.; GOLAKIYA, B.A. **Inhibition coefficient and molecular diversity of multi stress tolerant *Trichoderma* as potential biocontrol agent against *Sclerotium rolfsii Sacc.*** Infection, Genetics and Evolution, v. 55, p.75-92, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.08.029>.

HOOBIN, P.; BURGAR, I.; ZHU, S.C.; YING, D.Y.; SANGUANSRI, L.; AUGUSTIN, M.A. **Water sorption properties, molecular mobility and probiotic survival in freeze dried protein–carbohydrate matrices.** Food & Function, 2013. DOI: 10.1039/c3fo60112a. <https://doi.org/10.1039/c3fo60112a>.

HU, X.; ROBERTS, D.P.; XIE, L.; YU, C.; LI, Y.; QIN, L.; HU, L.; ZHANG, Y.; LIAO, X. **Use of formulated *Trichoderma spp.* Tri-1 in combination with reduced rates of chemical pesticide for control of *Sclerotinia sclerotiorum* on oilseed rape.** Crop Protection, v. 79, p. 124-127, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2017.08.015>.

HUMBER, R.A. **Seeking stability for research and applied uses of entomopathogenic fungi as biological control agents.** Journal of Asia-Pacific Entomology, v.19 (4), p.1019-1025, 2016.

IMOULAN, A.; HUSSAIN, M.; KIRK, P.M.; MEZIANE, A.E.; YAO, Y.J. **Entomopathogenic fungus *Beauveria*: Host specificity, ecology and significance of**



**morpho-molecular characterization in accurate taxonomic classification.** Journal of Asia-Pacific Entomology, v. 20, p.1204-1212, 2017.

JIN, X.; CUSTIS, D. **Microencapsulating aerial conidia of *Trichoderma harzianum* through spray drying at elevated temperatures.** Biological control, v. 56, p. 202-208, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.11.008>.

JOHN, R.P.; TYAGI, R.D. ; PRÉVOST, D. ; BRAR, S.K. ; POULEURB, S.; SURAMPALLI, R.Y. **Mycoparasitic *Trichoderma viride* as a biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. adzuki and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of soybean.** Crop Protection, v. 29 (12), p. 1452-1459, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.08.004>.

KIRIGA, A.W.; HAUKELAND, S.; KARIUKI, G.M.; COYNE, D.L.; BEEK, N.V. **Effect of *Trichoderma spp.* and *Purpureocillium lilacinum* on *Meloidogyne javanica* in commercial pineapple production in Kenya.** Biological Control, v.119, p.27-32, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.01.005>.

KUDRA, T.; MUJUMDAR, A.S. **Advanced drying Technologies.** CRC, Press, 2009. <https://doi.org/10.1201/9781420073898>.

LANGRISH, T. A. G. **Multi-scale mathematical modelling of spray dryers.** Journal of Food Engineering, v. 93(2), p. 218-228, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.01.019>.

LI, Y.; TANG, B.; CHEN, J.; LAI, P. **Microencapsulation of plum (*Prunus salicina* Lindl.) phenolics by spray drying technology and storage stability.** Food Science and Technology, 2017. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.09817>.

LOCATELLI, F.O.; SANTOS, G.F.; BOTELHO, P.S.; FINKLER, C.L.L.; BUENO, L.A. **Development of *Trichoderma sp.* formulations in encapsulated granules (CG) and evaluation of conidia shelf-life.** Biological Control, v. 117, p. 21-29, 2018. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.09817>.

LÓPEZ-BUCIO, J.; PELAGIO-FLORES, R.; HERRERA-ESTRELLA, A. ***Trichoderma* as biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus**. *Scientia Horticulturae*, v.196, p.109-123, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.043>.

MARNETT, L. J., HURD, H. K., HOLLSTEIN, M. C., LEVIN, D. E., ESTERBAUER, H., & AMES, B. N. **Naturally-occurring carbonyl-compounds are mutagens in *Salmonella* tester strain Ta104**. *Mutation Research*, v.148, p. 25-34, 1985. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(85\)90204-0](https://doi.org/10.1016/0027-5107(85)90204-0).

MEADE, B.; PURICELLI, E.; BRIDE, W.M.; VALDES, C.; HOFFMAN, L.; FOREMAN, L.; DOHLMAN, E. **Corn and Soybean Production Costs and Export Competitiveness in Argentina, Brazil, and the United States**, EIB-154, U.S. Department of Agriculture, Economic Research Service, 52p., 2016.

MENDOZA-MENDOZA, A.; ZAID, R.; LAWRY, R.; HERMOSA, R.; MONTE, E.; HORWITZ, B.A.; MUKHERJEE, P.K. **Molecular dialogues between *Trichoderma* and roots: Role of the fungal secretome**. *Fungal Biology Reviews*, p.1-24, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2017.12.001>.

MENGISTU, A.; RAY, J.D.; SMITH, J.R.; ARELLI, P.R.; BELLALLOUI, N.; CHEN, P.; SHANNON, G.; BOYKIN, D. **Effect of charcoal rot on selected putative drought tolerant soybean genotypes and yield**. *Crop Protection*, v.105, p. 90-101, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.11.012>.

MUIÑO, B.L.; SÁENZ, M.; STEFANOVA, M.; PORRAS, A.; DIAZ, I. **Compatibilidad de *Trichoderma* spp. con plaguicidas y fertilizantes en el cultivo del tabaco**. *Fitossanidad*, v.5(2), p.3-9, 2001. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.12.030>.

MUÑOZ-CELAYA, A. L.; et al. **Spray-drying microencapsulation of *Trichoderma harzianum* conidia in carbohydrate polymers matrices**. *Carbohydrate polymers*, v. 88, p. 1141-1148, 2012.

MUZAFFAR, K.; KUMAR, P. **Moisture sorption isotherms and storage study of spray dried tamarind pulp powder**. *Powder Technology*, v. 291, p. 322-327, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2015.12.046>.

NETTLES, R.; WATKINS, J.; RICKS, K.; BOYER, M.; LICHT, M.; ATWOOD, L.W.; PEOPLES, M.; SMITH, R.G.; MORTENSEN, D.A.; KOIDE, R. T. **Influence of pesticide seed treatments on rhizosphere fungal and bacterial communities and leaf fungal endophyte communities in maize and soybean.** Applied Soil Ecology, v. 102, p.61-69, 2016. NIKITAS, P. **Generalized Flory-Huggins Isotherms for Adsorption from Solution.** Journal of the Chemical Society, p.3901-4366, 1984.

NIKITAS, P. **Generalized Flory-Huggins Isotherms for Adsorption from Solution.** Journal of the Chemical Society, p.3901-4366, 1984.

O'DONOGHUE, E.J.; HUNGERFORD, A.E.; COOPER, J.C.; WORTH, T.; ASH, M. **The 2014 Farm Act Agriculture Risk Coverage, Price Loss Coverage, and Supplemental Coverage Option Programs' Effects on Crop Revenue, ERR-204,** U.S. Department of Agriculture, Economic Research Service, 59 p., 2016.

PAEZ, R.; LAVARI, L.; VINDEROLA, G.; AUDERO, G.; CUATRIN, A.; ZARITZKY, N.; REINHEIMER, J. **Effect of heat treatment and spray drying on *Lactobacilli* viability and resistance to simulated gastrointestinal digestion.** Food Research International, v. 48(2), p. 748–754, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.06.018>.

PANDOLFO, J.D. **Associação de *Trichoderma spp.* e fungicidas no controle de *Fusarium oxysporum s.sp phaseoli*.** Mestrado em Fitotecnia (Dissertação). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 79 p., 2007.

PEDRESCHI, F.; AGUILERA, J.M. **Viability of dry *Trichoderma harzianum* spores under storage.** Bioprocess Engineering, v. 17 (3), p.177-183, 1997. <https://doi.org/10.1007/PL00008963>.

PIRES, R.D.L.; GONÇALVES, D.N.; ORUÊ, J.P.M.; KANASHIRO, W.E.S.; RODRIGUES JR. J.F.; MACHADO, B.B.; GONÇALVES, W.N. **Local descriptors for soybean disease recognition.** Computers and Electronics in Agriculture, v. 125, p. 48-55, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2016.04.032>.

POIDATZ, J.; PLANTEY, R.L.; THIÉRY, D. **Indigenous strains of *Beauveria* and *Metharizium* as potential biological control agents against the invasive hornet *Vespa velutina*.** Journal of Invertebrate Pathology, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.02.021>.

RAHMAN, S. **Food Properties Handbook**. CRC Press, 2008.

RAMOS, Y.; PORTAL, O.; LYSOE, E.; MEYLING, N.V.; KLINGEN, I. **Diversity and abundance of *Beauveria bassiana* in soils, stink bugs and plant tissues of common bean from organic and conventional fields**. Journal of Invertebrate Pathology, v. 50, p. 114-120, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.10.003>.

REYES, V.; CHOTIKO, A.; CHOUJENKO, A.; CAMPBELL, V.; LIU, C.; THEEGALA, C.; SATHIVEL, S. **Influence of wall material on production of spray dried *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496 and its viability at different storage conditions**. In Press, p.1-11,2018.

RIZVI, S.S.H. **Thermodynamic properties of food in dehydration**. In: Engineering properties of foods, edited by Rao, M. A., Rizvi, S.S.H., Datta, A. K. (3 ed.) CRC Press, Boca Raton Fl, 1995.

ROBERTSON, A; SERRANO, M; REES, M. **Effects of commercial seed treatments on soybean emergence and yield**, Farm Progress Reports: v. 2016(1), Article 138, 2017.

RODRÍGUEZ-RESTREPO, Y. A.; GIRALDO, F. I.; RODRÍGUEZ-BARONA, S. **Solubility as a fundamental variable in the characterization of wall material by spray drying of food components: Application to microencapsulation of *Bifidobacterium animalis subsp. lactis***. Journal of Food Process Engineering, p. 1-8, 2017. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12557>.

SAWANT, I.S.; WADKAR, P.N.; GHULE, S.B.; RAJFURU, Y.R.; SALUNKHE, V.P.; SAWANT, S.D. **Enhanced biological control of powdery mildew in vineyards by integrating a strain of *Trichoderma afroharzianum* with Sulphur**. Biological Control, v. 114, p. 133-143, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.08.011>.

SEMYONOV, D.; RAMON, O.; SHIMONI, E. **Using ultrasonic vacuum spray dryer to produce highly viable dry probiotics**. LWT – Food Science Technology, v. 44(9), p. 1844–1852, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.03.021>.

SORMOLI, M.E; LANGRISH, T. A. G. **Moisture sorption isotherms and net isosteric heat of sorption for spray-dried pure orange juice powder**. LWT - Food Science and Technology, v. 62(1), p. 875-882, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.09.064>.

SZCZECH, M.; NAWROCKA, J.; FELCZYŃSKI, K.; MALOLEPSZA, U.; SOBOLEWSKI, J.; KOWALSKA, B.; MACIOROWSKI, R.; JAS, K.; KANCELISTA, A. ***Trichoderma atroviride* TRS25 isolate reduces downy mildew and induces systemic defence responses in cucumber in field conditions**. Scientia Horticulturae, v. 224, p.17-26, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.05.035>.

TAPIA, M. S., ALZAMORA, S. M., & CHIRIFE, J. **Effects of water activity (aw) on microbial stability: as a hurdle in food preservation**. In G. V. Barbosa-Canovas, A. J. Fontana, Jr., S. J. Schmidt, & T. P. Labuza (Eds.), Water activity in foods - Fundamentals and applications (pp. 239e255). John Wiley & Sons, 2007. <https://doi.org/10.1002/9780470376454.ch10>.

TIMMERMANN, E.O.; CHIRIFE, J.; IGLESIAS, H.A. **Water sorption isotherms of foods and foodstuffs: BET or GAB parameters?** Journal of Food Engineering, v. 48(1), p.19-31, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(00\)00139-4](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(00)00139-4).

TIMMERMANN, E.O. **Multilayer sorption parameters: BET or GAB values?** Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, v. 220, 30 June 2003, p. 235-260, 2003.

TODERO, I.; CONFORTIN, T.C.; LUFT, L.; BRUN, T.; UGALDE, G.A.; ALMEDA, T.C.; ARNEMANN, J.A.; ZABOT, G, I.; MAZUTTI, M.A. **Formulation of a bioherbicide with metabolites from *Phoma* sp.** Scientia Horticulturae, v. 241, p. 285-292, 2018.

USDA Agricultural Projections to 2026. **Office of the Chief Economist, World Agricultural Outlook Board, U.S.** Department of Agriculture. Prepared by the Interagency Agricultural Projections Committee. Long-term Projections Report OCE-2017-1, 106 p., 2017.

VINODKUMAR, S.; T INDUMATHI, T.; S NAKKEERAN, S. ***Trichoderma asperellum* (NVTa2) as a potential antagonist for the management of stem rot in carnation under protected cultivation**. Biological Control, v. 113, p. 58-64, 2017.

WIDIASTUTI, A.; YOSHINO, M.; SAITO, H.; MAEJIMA, K.; ZHOU, S.; ODANI, H.; NARISAWA, K.; HASEGAWA, M.; NITTA, Y.; SATO, T. **Heat shock-induced resistance in strawberry against crown rot fungus *Colletotrichum gloeosporioides***. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 84, p. 86-91, 2013.

WRIGHT, D.J.; VERKERK, R.H.J. **Integration of Chemical and Biological Control Systems for Arthropods: Evaluation in a Multitrophic Context**. *Pest Science*. v. 44, p. 207-218, 1995.

WU, H.G.; SUN, L.L.; LIU, F.; WANG, Z.Y.; CAO, C.W. **Preparation of dry flowable formulations of *Clonostachys rosea* by spray drying and application for *Sclerotinia sclerotiorum* control**. *Journal of Integrative Agriculture*, v. 17, p. 613-620, 2018.

YING, D.Y.; PHOON, M.C.; SANGUANSRI, L.; WEERAKKODY, R.; BURGAR, I.; AUGUSTIN, M.A. **Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG powders: relationship of powder physical properties to probiotic survival during storage**. *Journal of Food Science*, v. 75(9), p. 88-95, 2010. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01838.x.

ZENG, W.; KIRK, W.; HAO, J. **Field management of *Sclerotinia stem* rot of soybean using biological control agents**. *Biological Control*, v. 60(2), p. 141-147, 2012.

ZHANG, F.; GUO, N.; WANG, Y.; CHEN, L.; JI, X.; LI, C. **Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloe against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean**. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 100, p.64-74, 2016.

ZHANG, F.; CHEN, C.; ZHANG, F.; GAO, L.; LIU, J.; CHEN, L.; FAN, X.; LIU, C.; ZHANG, K.; HE, Y.; CHEN, C.; JI, X. ***Trichoderma harzianum* containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase and chitinase improved growth and diminished adverse effect caused by *Fusarium oxysporum* in soybean**. *Journal of Plant Physiology*, v. 210, March 2017, p. 84-94, 2017.

ZHANG, S.; XU, B.; ZHANG, J.; GAN, Y. **Identification of the antifungal activity of *Trichoderma longibrachiatum* T6 and assessment of bioactive substances in controlling phytopathogens.** In Press, 2018.

ZOU, L.; GONG, L.; XU, P.; FENG, G.; LIU, H. **Modified GAB model for correlating multilayer adsorption equilibrium data.** Separation and Purification Technology, v. 161, p. 38-43, 2016.

## CONCLUSÃO

A aplicação de sacarose, maltodextrina DE20, goma arábica, soro de leite e lactose como materiais de parede promoveu a formação de micropartículas de conídios de *Trichoderma asperellum* por *spray drying*, porém o que apresentou os melhores resultados de CV (%) e PS (%) para os conídios foi a maltodextrina DE20.

Com os resultados obtidos no PCC ficou evidente que a temperatura do ar de entrada, tanto os termos lineares quanto quadráticos, afetam de forma significativa a sobrevivência dos conídios, causando efeito negativo nos percentuais de conídios viáveis e percentual de sobrevivência quanto aumentada acima de 100 °C, ainda que com alta concentração de maltodextrina DE20 como agente protetor, nas faixas experimentais estudadas. A utilização das superfícies de resposta para a otimização do processo se mostrou adequada para encontrar a região ótima. Os valores otimizados pelo PCC são de 80°C e 1:4,5 MS CTA/MS MS MD20, respectivamente. Na condição de otimização obteve-se experimentalmente rendimento de secagem de  $63,85 \pm 0,86\%$ , umidade de  $4,92 \pm 0,07\%$ , conídios viáveis de  $87,10 \pm 1,16\%$  e percentual de sobrevivência de  $85,78 \pm 2,88\%$ , valores muito bons se comparados com estudos de microencapsulação de microrganismos. De acordo com a avaliação morfológica do teste de validação não foi observado fissuras ou fissuras aparentes na parede das micropartículas, o que colaborou para proteção dos conídios.

Os conídios de *Trichoderma asperellum* microencapsulados com MD20 apresentaram alta viabilidade após 150 dias de armazenamento à 4 °C, exibindo aproximadamente  $2,17 \times 10^9$  CFU g<sup>-1</sup>.

Apesar do tratamento químico e biológico de sementes de soja ter sido amplamente estudado por vários autores, não tem sido avaliada a viabilidade de microrganismos microencapsulados após a integração deste método durante o armazenamento de sementes. Por tal razão, os resultados obtidos com este estudo apresentam-se inovadores e promissores, demonstrando que os conídios de *Trichoderma asperellum* microencapsulados podem ser uma alternativa para alcançar maior compatibilidade com produtos químicos durante o armazenamento de sementes, almejando assim obter metodologias para a agricultura sustentável e proteção ao meio ambiente.

Os valores experimentais das isotermas dos conídios microencapsulados demonstraram que as propriedades adsorptivas do pó foram significativamente afetadas pela presença de MD20 na formulação. Além disso, pode-se concluir que este material utilizado de



forma isolada não é capaz de garantir estabilidade do produto durante o armazenamento em temperatura ambiente ao longo do tempo, sendo necessário o estudo de novas formulações.

## PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar a aplicação de agentes estabilizantes na formulação das micropartículas para avaliação da vida de prateleira do produto;
- Comparar o processo de microencapsulação por *spray drying* com secagem por liofilização;
- Avaliar outros métodos de microencapsulação para proteção dos conídios de *Trichoderma asperellum*.