



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**VIRNA LUIZA DE FARIAS**

**ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE SECAGEM POR ATOMIZAÇÃO DE CONÍDIOS  
DE *Trichoderma harzianum* LCB47**

**FORTALEZA  
2009**

**VIRNA LUIZA DE FARIAS**

**ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE SECAGEM POR ATOMIZAÇÃO DE CONÍDIOS  
DE *Trichoderma harzianum* LCB47**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos e Bioquímicos

Orientador: Pesquisador Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto

Co-orientador: Professor Dr. Fabiano André Narciso Fernandes

**FORTALEZA  
2009**

F238v Farias, Virna Luiza de  
Estudo das condições de secagem por atomização de conídios de  
*Trichoderma harzianum* LCB47 / Virna Luiza de Farias, 2009.  
75 f. ; il. color. enc.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto

Co-orientador: Prof. Dr. Fabiano André Narciso Fernandes

Área de concentração: Desenvolvimento de processos químicos e  
bioquímicos

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de  
Tecnologia. Depto. de Engenharia Química, Fortaleza, 2009.

1. *Spray dryer* 2. Microencapsulação 3. Maltodextrina 4. Controle  
biológico I. Pinto, Gustavo Adolfo Saavedra (orient.) II. Fernandes, Fabiano  
André Narciso (co-orient.) III. Universidade Federal do Ceará – Programa  
de Pós-Graduação em Engenharia Química IV. Título

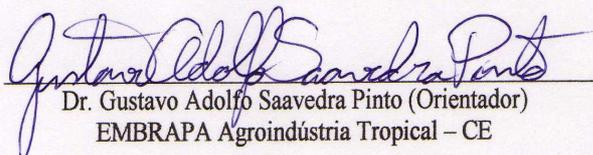
CDD 660

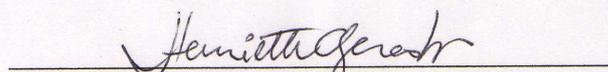
**VIRNA LUIZA DE FARIAS**

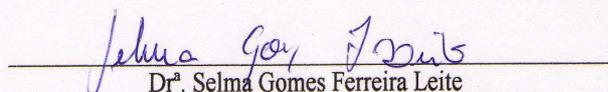
Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em: 16/02/2009.

BANCA EXAMINADORA

  
Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto (Orientador)  
EMBRAPA Agroindústria Tropical – CE

  
Dr.<sup>a</sup> Henriette Monteiro Cordeiro de Azeredo  
EMBRAPA Agroindústria Tropical – CE

  
Dr.<sup>a</sup> Selma Gomes Ferreira Leite  
Universidade Federal do Rio de Janeiro - EQ/UFRJ

Aos meus Pais, José Magalhães de Farias e  
Francisca Esmeralda de Freitas Farias.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre presente na minha vida iluminando meus caminhos, por ter me permitido essa experiência.

Aos meus pais, por toda a dedicação empregada nos meus estudos, e pelo apoio e incentivo sempre.

À minha família, pelo apoio.

Ao pesquisador da Embrapa Dr. Gustavo Saavedra, por ter prontamente aceitado ser meu orientador, pela amizade, confiança no meu trabalho e conhecimentos repassados, de grande importância para a minha vida acadêmica.

Ao professor Dr. Fabiano Fernandes, por ter aceitado a co-orientação deste trabalho, pela atenção sempre dispensada, contribuição intelectual e conhecimento compartilhado durante o mestrado.

À pesquisadora da Embrapa Dr<sup>a</sup> Henriette Azeredo, a Ette, pela amizade, atenção, crença no meu trabalho, e constante apoio e incentivo na minha vida acadêmica. Agradeço pelo estágio na Embrapa durante minha graduação, oportunidade na qual adquiri muitos conhecimentos úteis para a realização deste trabalho.

À professora Dr<sup>a</sup>. Selma Gomes Ferreira Leite, por ter aceitado participar da minha banca de defesa, contribuindo para a melhoria da dissertação.

À pesquisadora da Embrapa Deborah Garruti, pelo incentivo e atenção sempre dispensados.

Aos professores do mestrado da Engenharia Química, pela atenção dispensada e pelos conhecimentos repassados.

À Maria, secretária do programa de pós-graduação em Engenharia Química pela paciência e atenção sempre dispensadas aos alunos do programa.

Aos amigos da Embrapa Arthur e Manoel, pela amizade e contribuição intelectual desde a época dos trabalhos da graduação.

Aos amigos do laboratório de Bioprocessos, com os quais compartilhei momentos de alegria durante o período dos meus experimentos: Adriana, Andréa, Cyntia, Genilton, Janaína, Karina, Leise, Manuella, Millena, Myrella, Monique, Natália Freitas, Natália Lima, Renata Débora, Rosa, Ruann e Tatiane. Todos foram importantes, contribuindo para deixar o ambiente de trabalho mais animado e agradável. Agradeço em especial à Natália Lima e à Tatiane por terem ajudado diretamente em partes dos experimentos.

À amiga Renata Beltrão, pela amizade, gentileza e carinho sempre demonstrados, e que mesmo não fazendo mais parte do laboratório, se disponibilizou a me ensinar os primeiros passos da fermentação no meu primeiro dia no Bioprocessos.

À minha amiga Milena Coelho, pela amizade, apoio, incentivo e companheirismo durante todos esses 11 anos.

À Ana Carla, Caroline Maria, Jerusa, Milena Coelho, Noemi e Samara; amigas desde a época do colégio, mas sempre presentes, mesmo que às vezes um pouco distantes. Obrigada pelos momentos de distração proporcionados nos nossos encontros durante esses dois anos.

Às amigas da Engenharia de Alimentos: Ana Lúcia, Cláudia e Talita, pela amizade, companheirismo e pelas boas lembranças da época da graduação.

À amiga de Embrapa Mirela Araújo, pelo apoio, pelas risadas e pelos bons momentos na Embrapa.

Aos colegas do mestrado Alexandre Pacheco, Duarte (do Timor Leste), Edílson, Eveline, Francielle, Kelly, Louise e Rogério; pelo companheirismo, principalmente durante os momentos mais difíceis do mestrado.

Ao departamento de Engenharia Química da UFC pela oportunidade.

À Embrapa Agroindústria Tropical, por ceder suas instalações e equipamentos para a realização da parte experimental da minha dissertação.

Aos Moinhos Cearense e M. Dias Branco por terem cedido o farelo de trigo para a realização das fermentações.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

“É a possibilidade de realizar um sonho que torna a vida interessante. E quando você quer alguma coisa, todo o Universo conspira para que você realize seu desejo.”

(Paulo Coelho)

## RESUMO

Nos últimos anos, tem-se notado uma crescente preocupação, em todo o mundo, com os problemas ambientais decorrentes das diversas atividades humanas, incluindo a agricultura. Nesse contexto, o controle biológico constitui alternativa cada vez mais importante aos defensivos agrícolas químicos. O controle biológico consiste no emprego de um organismo (predador, parasita ou patógeno) que ataca outro que esteja causando danos econômicos às lavouras. Espécies de *Trichoderma* são reconhecidas como agentes de controle biológico de doenças de plantas causadas por fungos fitopatogênicos, sendo a espécie *T. harzianum* uma das mais utilizadas. Os conídios são os micropropágulos preferíveis para uso no controle biológico. Para a comercialização de produtos de biocontrole, o produto formulado deve ser estável ao armazenamento e manter a viabilidade dos esporos durante este período. A desidratação dos esporos permite a preservação do inoculo por um longo período de tempo, com alta viabilidade; e um dos métodos utilizados para a secagem é a atomização (“spray dryer”). Este trabalho teve como objetivo determinar as condições mais adequadas de secagem de esporos de *Trichoderma harzianum* LCB47 em “spray dryer”, de forma a preservar sua capacidade germinativa no produto desidratado. Conduziram-se experimentos para avaliar a necessidade do uso de encapsulante na secagem dos esporos. Estudaram-se, preliminarmente, as variáveis temperatura de entrada e de saída do ar para avaliação dos seus efeitos no nível de sobrevivência dos esporos e na umidade do pó final. Testou-se a influência de diferentes materiais usados como encapsulantes, por meio da avaliação da sua capacidade calorífica ( $C_p$ ) e através do nível de sobrevivência resultante da secagem utilizando cada material. Estudaram-se os parâmetros temperatura de entrada e de saída do ar, por meio de planejamento experimental, para avaliação da sua influência no nível de sobrevivência dos esporos e na umidade e atividade de água do pó final. Realizou-se uma avaliação da estocagem dos esporos com relação à retenção da sua viabilidade. Verificou-se que é necessário a adição de um encapsulante para a secagem dos esporos por atomização. O aumento da diferença entre a temperatura de entrada e de saída do ar no processamento levou à elevação da umidade do produto final, devido à necessidade do aumento da vazão de alimentação da suspensão. Menores temperaturas de saída foram melhores quanto ao nível de sobrevivência dos esporos, sendo a de 55°C a que permitiu os melhores resultados. A goma arábica foi o encapsulante que apresentou maior capacidade calorífica, e foi o melhor com relação à proteção dos esporos do calor do ar durante a secagem. O teor de encapsulante é o principal fator que afeta o nível de sobrevivência dos esporos, enquanto a umidade e a atividade de água do produto em pó são fortemente influenciadas pela temperatura de entrada. Os esporos mantiveram sua viabilidade durante um mês quando armazenados sob refrigeração. A melhor condição de secagem de esporos de *T. harzianum* LCB47 foi 140/55°C de temperatura de entrada e de saída, respectivamente, utilizando maltodextrina como encapsulante. Nesta condição o nível de sobrevivência médio foi de 96%.

Palavras-chave: “spray dryer”, microencapsulação, maltodextrina, controle biológico.

## ABSTRACT

In recent years, the world is having a growing concern regarding human activity towards the environment, including the problems related to agriculture. Biological control is, nowadays, a viable and important alternative to chemical defensives. Biological control consists of the used of a living organism (predator, parasite or pathogen) that attacks other unwanted organism without causing damages to the crops. *Trichoderma* species are known as biological control agents to plant diseases caused by phytopathogenic fungi. *T. harzianum* is the most applied agent. Conidia are the preferred micropropagules for biological control. For commercialization, biological control products should be stable during storage and should maintain its viability during this period. Drying of the spores allows the preservation of the inoculums for a long period of time maintaining high viability. One of the most used methods for drying spores is spray drying. This work aims to determine the best operating conditions to dry *Trichoderma harzianum* LCB47 spores, using spray drying, to keep the germinative capacity of the dehydrated product. Experiments were carried out to evaluate the need for encapsulates during drying of the spores. Initially, the inlet and outlet air temperatures in the spray drier were evaluated concerning the survival of the spores and the final dried product moisture content. Several raw materials were tested as encapsulates by means of evaluating their heat capacity ( $C_p$ ) and by evaluating the level of survival after drying the spores. The inlet and outlet air temperature were evaluated using a factorial design. An evaluation of the viability of the spores during storages was also carried out. The results show the need of the addition of encapsulates for drying spores using spray-drying. The increase between the inlet and outlet air temperatures in the spray-drier resulted in an increase in the final moisture content of the product because of the need to increase the feed flow rate in the spray-drier. Lower outlet air temperatures resulted in higher levels of survival of the spores, and the temperature of 55°C allowed the best results. Arabic gum was the encapsulate that presented the highest heat capacity and that resulted in the highest protection of the spores during drying. The amount of encapsulate was the most significant factor that influenced in the survival of the spores, while the final moisture content and the water activity were most significantly influenced by the inlet temperature of the air. The spores maintained their viability for a month under refrigeration. The best operating condition to dry spores of *T. harzianum* LCB47 was obtained applying inlet and outlet air temperatures of respectively 140 and 55°C, and using maltodextrin as encapsulate. Under this condition, the mean level of survival of the spores was 96%.

Keywords: spray-dryer, microencapsulation, maltodextrin, biological control.

## LISTA DE FIGURAS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Figura 1</b> - Desenho esquemático do “spray dryer” com fluxo de secagem concorrente -----  | <b>27</b> |
| <b>Figura 2</b> - Mini Spray Dryer Büchi B-290-----  | <b>39</b> |
| <b>Figura 3</b> - Preparo dos esporos para a secagem em “spray dryer”: 1- Agar inclinado, 2- Inóculo, 3- Produção de esporos em maior escala, 4- suspensão de esporos, 5- atomização -----   | <b>40</b> |
| <b>Figura 4</b> - Sistema utilizado para a realização do experimento para avaliação da capacidade calorífica dos encapsulantes -----   | <b>45</b> |
| <b>Figura 5</b> - Visualização dos esporos em meio WA com corante azul de anilina-----   | <b>48</b> |
| <b>Figura 6</b> - Nível de sobrevivência dos esporos encapsulados com diferentes agentes encapsulantes -----   | <b>56</b> |
| <b>Figura 7</b> - Produtos em pó obtido dos experimentos com os diferentes tipos de encapsulante -----   | <b>56</b> |
| <b>Figura 8</b> - Curva da variação da temperatura das soluções com 10, 30 e 50% de encapsulante, com o tempo. Os encapsulantes são maltodextrina DE 10 (MD), goma arábica (GA) e amido solúvel (AM) -----   | <b>57</b> |
| <b>Figura 9</b> - Curvas de contorno referentes ao nível de sobrevivência dos esporos após a secagem da suspensão, com relação à variação da temperatura de entrada do ar de secagem e do teor de encapsulante -----   | <b>60</b> |
| <b>Figura 10</b> - Curvas de contorno referentes à umidade do pó obtido após a secagem da suspensão, com relação à variação da temperatura de entrada do ar de secagem e do teor de encapsulante-----  | <b>62</b> |
| <b>Figura 11</b> - Curvas de contorno referentes à atividade de água do pó obtido após a secagem da suspensão, com relação a variação da temperatura de entrada do ar de secagem e do teor de encapsulante -----   | <b>63</b> |
| <b>Figura 12</b> - Retenção da viabilidade dos esporos armazenados durante um mês nas seguintes condições: TA100: Temperatura de secagem de 100/55°C e armazenamento em temperatura ambiente, TR100: Temperatura de secagem de 100/55°C e armazenamento sob refrigeração ----- | <b>64</b> |

## LISTA DE TABELAS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Tabela 1</b> - Fungos entomopatogênicos e seus hospedeiros-----  | <b>21</b> |
| <b>Tabela 2</b> - Temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) e peso molecular de diferentes materiais---   | <b>29</b> |
| <b>Tabela 3</b> - Valores de solubilidade para maltodextrina em função da DE -----  | <b>33</b> |
| <b>Tabela 4</b> - Condições de secagem dos experimentos iniciais para obtenção de altos níveis de sobrevivência. -----  | <b>41</b> |
| <b>Tabela 5</b> - Condições de secagem dos experimentos para avaliação do efeito da temperatura de saída do ar no nível de sobrevivência dos esporos e na umidade do pó. -----  | <b>42</b> |
| <b>Tabela 6</b> - Condições de secagem dos experimentos para avaliação do efeito da temperatura de entrada do ar no nível de sobrevivência dos esporos e na umidade do pó.----- | <b>42</b> |
| <b>Tabela 7</b> - Valores de cada nível do planejamento experimental-----   | <b>46</b> |
| <b>Tabela 8</b> - Valores dos parâmetros de cada experimento do planejamento -----  | <b>46</b> |
| <b>Tabela 9</b> - Nível de sobrevivência dos esporos e umidade do pó resultante dos experimentos iniciais -----   | <b>53</b> |
| <b>Tabela 10</b> - Nível de sobrevivência dos esporos e umidade do pó resultante dos experimentos para avaliação do efeito da temperatura de saída do ar-----                   | <b>54</b> |
| <b>Tabela 11</b> - Nível de sobrevivência dos esporos e umidade do pó resultante dos experimentos para avaliação do efeito da temperatura de entrada do ar -----                | <b>54</b> |
| <b>Tabela 12</b> - Nível de sobrevivência dos esporos, e umidade e atividade de água do pó resultante das condições de secagem do planejamento experimental -----               | <b>59</b> |
| <b>Tabela 13</b> - Dados estatísticos com relação ao nível de sobrevivência dos esporos -----   | <b>60</b> |
| <b>Tabela 14</b> - Dados estatísticos com relação à umidade do produto final -----  | <b>61</b> |
| <b>Tabela 15</b> - Dados estatísticos com relação à atividade de água do produto final -----  | <b>63</b> |

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>  | 15 |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>   | 19 |
| <b>2.1. Controle biológico</b>  | 19 |
| 2.1.1. Fungos como agentes de controle biológico  | 20 |
| 2.1.2. Fungos do gênero <i>Trichoderma</i>  | 22 |
| <b>2.2. Produção do agente fúngico por fermentação semi-sólida</b>  | 24 |
| <b>2.3. O processo de secagem</b>   | 26 |
| 2.3.1. Secagem por “spray drying”   | 27 |
| 2.3.2. Adjuvantes de secagem  | 28 |
| <b>2.4. Microencapsulação</b>   | 30 |
| 2.4.1. Maltodextrina  | 32 |
| <b>2.5. Secagem de agentes fúngicos por “spray-drying”</b>  | 33 |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>  | 37 |
| <b>3.1. Microrganismo e manutenção</b>  | 37 |
| <b>3.2. Preparo do inóculo</b>  | 37 |
| <b>3.3. Produção e recuperação dos esporos</b>  | 38 |
| <b>3.4. Secagem em “spray dryer”</b>  | 38 |
| 3.4.1. Equipamento  | 38 |
| 3.4.2. Preparo da suspensão de esporos  | 39 |
| 3.4.3. Experimento preliminar   | 40 |
| 3.4.4. Determinação das condições de atomização   | 40 |
| a) Adição de maltodextrina DE10 como encapsulante   | 40 |
| b) Avaliação das temperaturas de entrada e saída  | 41 |
| c) Avaliação do tipo de encapsulante utilizado na secagem   | 43 |
| d) Estudo da temperatura de entrada e do teor de encapsulante no nível de sobrevivência dos esporos, e na umidade e atividade de água do pó resultante do processo de secagem | 45 |
| <b>3.5 Avaliação preliminar da estabilidade dos esporos</b>   | 47 |
| <b>3.6. Métodos analíticos</b>  | 47 |
| 3.6.1. Contagem total de esporos  | 47 |
| 3.6.2. Viabilidade  | 47 |
| 3.6.3. Atividade de água  | 48 |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.6.4. Umidade .....  | 48        |
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>  | <b>51</b> |
| <b>4.1. Avaliação da necessidade do uso de encapsulantes .....</b>  | <b>51</b> |
| <b>4.2. Avaliação do efeito das temperaturas de entrada e de saída do ar na umidade do pó e no nível de sobrevivência dos esporos .....</b>                                   | <b>52</b> |
| <b>4.3. Avaliação da eficiência de agentes encapsulantes na secagem de <i>T. harzianum</i> LCB47 .....</b>  | <b>55</b> |
| <b>4.4. Influência da concentração de encapsulante e da temperatura de entrada no nível de sobrevivência dos esporos, na umidade e na atividade de água do pó final .....</b> | <b>58</b> |
| <b>4.5. Teste de estabilidade dos esporos à estocagem .....</b>   | <b>64</b> |
| <b>5. CONCLUSÕES .....</b>  | <b>66</b> |
| <b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>   | <b>67</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>  | <b>68</b> |
| <b>ANEXOS .....</b>   | <b>74</b> |

---

# 1. INTRODUÇÃO

---

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem-se notado uma crescente preocupação, em todo o mundo, com os problemas ambientais decorrentes das diversas atividades humanas, incluindo a agricultura. Essa preocupação vem resultando na busca por tecnologias de produção rentáveis, socialmente justas e com um enfoque ecológico. Nesse contexto, o controle biológico constitui alternativa cada vez mais importante (SILVA; MELLO, 2007).

O controle biológico consiste no emprego de um organismo (predador, parasita ou patógeno) que ataca outro que esteja causando danos econômicos às lavouras. Trata-se de uma estratégia utilizada em sistemas agroecológicos, assim como na agricultura convencional que se vale do Manejo Integrado de Pragas (MIP). No Brasil, embora o uso do controle biológico não seja uma prática generalizada entre os agricultores, há avanços significativos em alguns cultivos, devido aos esforços de órgãos estaduais de pesquisa e da Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (PLANETA, 2007). Na natureza há interações contínuas entre os potenciais patógenos e seus antagonistas, onde o controle biológico funciona naturalmente (SILVA; MELLO, 2007). Espécies de *Trichoderma* são reconhecidas como agentes de controle biológico de doenças de plantas (HARMAN *et al.*, 2004), sendo as espécies *T. harzianum*, *T. virens*, e *T. viride* as mais utilizadas (SILVA; MELLO, 2007).

*Trichoderma* é um agente de controle biológico por ser antagonista a vários fungos fitopatogênicos, podendo exercer o controle, indiretamente, por meio de indução de resistência e de tolerância ao estresse às plantas ou, diretamente, competindo por espaço e nutrientes, produzindo substâncias antimicrobianas, inativando as enzimas do patógeno e mediante o micoparasitismo, sendo a ação das enzimas hidrolíticas sobre os fitopatógenos considerado o principal mecanismo envolvendo o processo desse antagonista (SILVA; MELLO, 2007).

Vários diferentes estágios do ciclo de vida do fungo (conídio, fragmentos miceliais ou blastosporos) são candidatos potenciais para biofungicidas. Como o conídio aéreo é a unidade infecciosa e de disseminação, e devido ao aumento na eficiência da sua produção, por meio de sistemas de cultura em estado sólido, os conídios aéreos são os propágulos de escolha para o desenvolvimento de um biofungicida (HORACZEK; VIERNSTEIN, 2004).

A tecnologia atualmente disponível para a produção comercial de biofungicidas só permite a obtenção de uma formulação em pó-molhável (PM), contendo fragmentos de

micélios e conídios, com baixa viabilidade, elevado teor de umidade e conídios aderidos uns aos outros em grumos de diferentes tamanhos. Tal mistura contém, comumente, uma quantidade desconhecida de fragmentos do substrato sólido, contaminantes e outras partículas (GAVA, 2006).

No Brasil, a produção massal de fungos para controle biológico é tradicionalmente realizada com o emprego de arroz cozido como substrato. Após a colonização do arroz pelo microrganismo, a mistura "arroz + fungo" é triturada e comercializada na forma de pó-molhável. Alternativamente, a mistura "arroz + fungo" é vendida sem trituração, ficando a cargo dos produtores rurais a tarefa de lavar o substrato com água para remoção dos esporos (FARIA; MAGALHÃES, 2007).

O maior obstáculo na comercialização de produtos de biocontrole é o desenvolvimento de um produto formulado, estável ao armazenamento, que retenha eficiência similar àquela das células frescas do agente. Alguns métodos de preservação de culturas são baseados principalmente na redução da taxa metabólica dos organismos pela remoção da água disponível. A desidratação do produto permite a preservação do inóculo por um longo período de tempo com alta viabilidade (LARENA *et al.*, 2003; LARENA; MELGAREJO; DE CAL, 2003). A desidratação pode ser realizada por vários meios, incluindo a liofilização, secagem em sílica gel, spray dryer e leito fluidizado (LARENA; MELGAREJO; DE CAL, 2003).

A técnica de secagem por atomização ("spray-drying") é rápida, de única etapa, conveniente, possui flexibilidade de uso em grande escala, e pouco influenciada pelos parâmetros de solubilidade da fase interna e do polímero usado como encapsulante (BARROS; STRINGHETA, 2006), e pode ser usada para vários materiais termosensíveis por causa das baixas temperaturas que o material ativo atinge (MADENE *et al.*, 2006). Isso ocorre porque a evaporação do líquido da gota é tão rápida, que o núcleo não atinge temperaturas superiores a 100°C (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007; LEITE, 2001).

Além disso, a atomização é a técnica mais comum e barata para a produção de produtos microencapsulados, sendo os custos de produção menores que na maioria dos outros métodos de microencapsulação. Em comparação com a liofilização, o custo do método de "spray-drying" é 30 a 50 vezes mais barato. (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007).

De um ponto de vista industrial, há crescentes necessidades para prever e controlar a estabilidade de fungos desidratados para biocontrole, porque seu uso está constantemente crescendo devido à sua compatibilidade ambiental, comparada aos fungicidas tradicionais (HORACZEK; VIERNSTEIN, 2004). A preparação de uma formulação que mantenha a viabilidade do agente biológico, o desenvolvimento de um processo de produção

econômico e a otimização do desempenho no campo são considerações importantes para agentes de biocontrole (FROYD, 1997).

Neste sentido, este trabalho teve como objetivo geral determinar as condições mais adequadas de secagem de esporos de *Trichoderma harzianum* LCB47 em “spray dryer”, de forma a preservar sua capacidade germinativa no produto desidratado. Os objetivos específicos foram: estabelecer as condições mais adequadas dos parâmetros para a secagem dos esporos de *Trichoderma harzianum* LCB47 em “spray dryer”; avaliar a capacidade germinativa dos esporos antes e após a secagem; avaliar o efeito do teor e tipo de alguns encapsulantes comumente utilizados em processos de desidratação, durante a secagem dos esporos; e avaliar a estabilidade dos esporos em diferentes condições de estocagem.

---

---

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

---

---

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Controle biológico

Apesar de os defensivos agrícolas terem uma alta e rápida eficiência, são necessárias aplicações repetidas desses produtos, representando grandes quantidades lançadas no ambiente. Esses produtos químicos propiciam uma alta produtividade, mas têm efeitos negativos sobre o solo, o clima, a vegetação, as águas, os animais e o homem. Provocam a seleção de mutantes resistentes e seu tempo de degradação no ambiente é da ordem de décadas, o que provoca uma concentração elevada dessas substâncias na cadeia alimentar (FRANCESCHINI *et al.*, 2001).

Nesse contexto, o controle biológico é uma alternativa viável para o combate de pragas e patógenos, e vantajosa em relação ao controle químico, especialmente quanto ao impacto ambiental, ao custo, à especificidade e ao desenvolvimento de resistência (FRANCESCHINI *et al.*, 2001). Utilizado de forma complementar na agricultura convencional, contribui para a redução do uso de agrotóxicos, enquanto na agricultura orgânica, insere-se em substituição a esses produtos (SILVA; MELLO, 2007). O controle biológico, ou biocontrole, envolve a introdução de determinados microrganismos, sejam naturais ou geneticamente modificados, em um ecossistema agrícola para reduzir os efeitos de organismos indesejáveis ou favorecer a sobrevivência de organismos que são benéficos aos humanos (TSENG *et al.*, 2008).

Um produto de biocontrole para aplicação na agricultura deve ser fácil de preparar e de aplicar, produzir propágulos viáveis com longa vida-de-prateleira, mantendo sua eficiência, e ter preço compatível. A vida-de-prateleira de um produto de biocontrole é o período de tempo em que os propágulos do microrganismo permanecem viáveis e eficientes. Este período pode variar de várias semanas a anos. A maior parte do tempo de duração do produto é perdida na estocagem (tempo entre a manufatura e seu uso no campo). O produto biológico deve ter uma vida-de-prateleira de pelo menos 12 a 18 meses sem refrigeração para ser comercialmente aceitável (LARENA; DE CAL; MELGAREJO, 2007).

Entre os microrganismos patogênicos com aplicação potencial em controle biológico destacam-se os fungos filamentosos. Quando comparados a outros sistemas utilizados em controle biológico, como bactérias produtoras de toxinas, protozoários e vírus,

os fungos apresentam como vantagem um mecanismo especializado de infecção, que ocorre pela sua penetração ativa nos hospedeiros, não dependendo, assim, da sua ingestão para que se inicie o processo de infecção (FRANCESCHINI *et al.*, 2001).

Os conídios são os propágulos preferidos para agentes de biocontrole fúngico de muitas doenças em plantas, decorrentes de ataques microbianos (YE *et al.*, 2006). Micropropágulos de *Trichoderma* spp. na forma de conídios são preferíveis aos clamidiósporos e à biomassa micelial por causa da viabilidade e estabilidade na aplicação no campo (CAVALCANTE *et al.*, 2008).

### 2.1.1. Fungos como agentes de controle biológico

Os fungos apresentam grande importância agrícola e ecológica, pois são responsáveis por manterem ecossistemas em equilíbrio, decompondo restos vegetais, degradando substâncias tóxicas, auxiliando as plantas a crescerem e se protegerem contra inimigos patogênicos, insetos-pragas da agricultura ou herbívoros (AZEVEDO, 1997).

Assim como os fungos podem eventualmente causar doenças em plantas e mamíferos, os insetos podem ser atacados por certos fungos. Se usados convenientemente, eles podem ser empregados no controle de insetos-pragas de plantas cultivadas ou mesmo de insetos vetores de doenças. O Brasil, possuindo um clima tropical em grande parte de seu território e com vastas áreas cultivadas, tem dificuldades na utilização do controle químico de insetos, tornando-se inviável e antieconômico em certas condições, além de causar desequilíbrios biológicos e problemas de intoxicação. A solução é então o uso e aplicação de técnicas na produção de “inseticidas microbianos” que possam, se não substituir, pelo menos diminuir o uso de agroquímicos, com vantagens econômicas e de preservação do ambiente (AZEVEDO, 1997).

Entre os fungos entomopatogênicos, os mais empregados no controle de pragas são *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* (ATHAYDE; FERREIRA; LIMA, 2001). A Tabela 1 mostra exemplos de fungos entomopatogênicos e seus respectivos hospedeiros.

Tabela 1 - Fungos entomopatogênicos e seus hospedeiros.

| Microrganismo                 | Inseto controlado   |
|-------------------------------|---|
| <i>Aspergillus flavus</i>     | Larvas de <i>Culex</i> sp   |
| <i>Beauveria bassiana</i>     | Larvas de mosquitos e moscas                                      |
| <i>Beauveria brongniartii</i> | Baratas   |
|                               | Cigarrinha da cana-de-açúcar: <i>Mahanarva posticata</i>          |
| <i>Metarhizium anisopliae</i> | Cigarrinha das pastagens: <i>Deois zulia</i>                      |
|                               | Broca da cana: <i>Diatraea saccharalis</i>                        |
|                               | Percevejos da soja: <i>Nezara</i> sp e <i>Piezodorus</i> sp       |
|                               | Reduviídeos: insetos da família <i>Reduviidae</i>                 |
| <i>Nomuraea rileyi</i>        | Ordens <i>Coleoptera</i> , <i>Lepidoptera</i> e <i>Orthoptera</i> |
| <i>Paecilomyces fumorosus</i> | Larvas de mosquitos e moscas                                      |

Fonte: Moretti (2008).

Como no caso do controle biológico de insetos por fungos, existem também exemplos de fungos que atuam como controladores de doenças de plantas causadas por ataque de microrganismos fitopatogênicos. O emprego racional dos mesmos pode, além de prevenir doenças, colaborar na redução da aplicação abusiva de fungicidas químicos (AZEVEDO, 1997).

Dentre os vários microrganismos antagonistas utilizados contra fungos fitopatogênicos, podem ser citados: *Dicyma pulvinata* no controle do mal-da-seringueira, *Gliocadium* no controle de *Phytophthora*, e *Trichoderma harzianum* no controle de vassoura-de-bruxa do cacauero (SILVA; MELLO, 2007).

Em 90% dos antagonistas utilizados, há participação de diferentes espécies do gênero *Trichoderma* (SILVA; MELLO, 2007). Este gênero destaca-se entre os fungos agentes de controle de fitopatógenos, sendo o que mais tem despertado o interesse dos agricultores (MELO; COSTA; 2005).

### 2.1.2. Fungos do gênero *Trichoderma*

Dentre os fungos filamentosos, os do gênero *Trichoderma* são reconhecidamente os hiperparasitas dos fitopatógenos mais importantes e mais estudados, pois exibem variabilidade entre as linhagens com relação à atividade de biocontrole, espectro de ação contra hospedeiros, propriedades fisiológicas e bioquímicas, como também, adaptabilidade ecológica e ambiental (SILVA; MELLO, 2007). Atacam hifas e estruturas de esporulação dos patógenos das plantas no campo, reduzindo a infecção e o inóculo patogênico (BLAKEMAN; FOKKEMA, 1982).

*Trichoderma* é um grupo complexo de fungos com importantes aplicações na agricultura e medicina. As espécies deste gênero são caracterizadas pelo rápido crescimento de colônias chegando ao diâmetro entre 2 a 9 cm depois de 4 dias de crescimento a 20°C (RIBEIRO, 2000).

O gênero é amplamente distribuído por todo o mundo e ocorre em quase todos os solos e outros habitats naturais, especialmente nos ambientes contendo material orgânico. É também encontrado nas superfícies de raízes de várias plantas, em cascas em decomposição especialmente quando danificada ou contaminada por outros fungos. Como *Trichoderma* é um fungo cosmopolita, é capaz de crescer em uma faixa ampla de diferentes condições ambientais e substratos. Esta característica confere a este gênero a possibilidade de ser utilizado em muitas situações de interesse biotecnológico. *T. harzianum* é o organismo mais comum encontrado em regiões de clima temperado (RIBEIRO, 2000).

*Trichoderma* produz grandes quantidades de celulases e outras enzimas hidrolíticas. Entre as enzimas mais importantes que *Trichoderma* produz estão aquelas envolvidas em micoparasitismo, as quais degradam quitina. Espécies de *Trichoderma* têm sido usadas em preparações comerciais de produtos para controle biológico de plantas infectadas por fungos, reduzindo assim a necessidade de utilização de compostos químicos poluentes. *T. harzianum* é o agente ativo do produto comercial Trichodex, o qual é usado nas raízes da macieira para protegê-la de fungos nocivos, e é combinado com *T. polysporum* no produto Binab-T, o qual é usado para controlar rachaduras que causam a decomposição da madeira (RIBEIRO, 2000).

O mecanismo pelo qual espécies de *Trichoderma* reconhecem e atacam fungos fitopatogênicos é desconhecido, apesar de alguns determinantes desses mecanismos já terem

sido identificados. Segundo Silva e Mello (2007), esses mecanismos podem ser representados pelos efeitos diretos e indiretos causados pelo agente de biocontrole no fitopatógeno.

- **Efeitos diretos:**

Antibiose: Muitas espécies de *Trichoderma* são conhecidas produtoras de metabólitos secundários, voláteis e não-voláteis, com amplo espectro de atividade microbiana, e podem secretar diversas substâncias antifúngicas, como pironas, isocianatos, tricotecenos, dentre outros.

Competição pelos nutrientes e espaço físico: As espécies de *Trichoderma* são geralmente consideradas competidoras agressivas, apresentando rápido crescimento e colonização, o que resulta em deslocamento dos patógenos por impedir a germinação de propágulos ou a sua infecção.

Micoparasitismo: Esse mecanismo consiste na utilização do fitopatógeno como alimento para seu antagonista. *Trichoderma* spp. cresce em direção ao outro fungo, se enrola nas hifas do fungo alvo em uma reação mediada por lecitinas e degrada sua parede celular pela secreção de enzimas líticas, limitando o crescimento e atividade do fitopatógeno. As enzimas hidrolíticas extracelulares produzidas por *Trichoderma* são consideradas de importância determinante na capacidade antagonista desse fungo. São elas: quitinases, celulases, glucanases e proteases, que degradam as estruturas dos fungos parasitados.

Inativação das enzimas do fitopatógeno: As enzimas de alguns fitopatógenos são responsáveis pela hidrólise dos componentes pécticos da parede celular das plantas. Quando presente, o *T. harzianum*, por exemplo, secreta proteases sobre a superfície da planta que inibem a ação das enzimas hidrolíticas desses fitopatógenos.

- **Efeitos indiretos:**

Indução de resistência: Linhagens de fungos do gênero *Trichoderma* colonizam e penetram os tecidos da raiz da planta, iniciando uma série de alterações morfológicas e bioquímicas na planta, consideradas como parte de defesa da planta e que, no final, leva a mesma a induzir uma resistência sistêmica adquirida (do inglês: Systemic Acquired Resistance - SAR). A SAR é uma resposta imune, que as plantas são capazes de produzir, após uma primeira infecção por patógenos.

Tolerância ao estresse: *Trichoderma* spp. é um colonizador benéfico de raízes de plantas que possui a capacidade de melhorar seu crescimento e sua produtividade (HARMAN *et al.*, 2004), bem como a solubilização e absorção de nutriente inorgânicos pela planta.

*T. harzianum* vem sendo aceito como um dos agentes de biocontrole mais potentes contra doenças de plantas, e vem sendo usado com um antagonista contra vários fungos fitopatogênicos do solo nos últimos anos (TSENG *et al.*, 2008).

Perelló *et al.* (2008) mostraram que *T. harzianum* pode ser usado como tratamento não-químico alternativo contra mancha bronzeada do trigo causado por *Pyrenophora tritici-repentis*. *T. harzianum* também é eficiente no combate ao *Botrytis cinérea*, responsável pela podridão cinzenta em pepino (ELAD *et al.*, 1993; ELAD; KAPAT, 1999), e como agente de biocontrole contra *Bipolaris oryzae*, causador da mancha parda em arroz (ABDEL-FATTAH *et al.*, 2007).

## **2.2. Produção do agente fúngico por fermentação semi-sólida**

O material utilizado em fermentação no estado sólido é geralmente fragmentado e de natureza granular ou fibrosa que permite a retenção de água por higroscopia ou capilaridade. A quantidade de água presente varia consideravelmente de acordo com o material utilizado. Os substratos amiláceos (arroz, trigo, centeio, cevada, milho, mandioca) são geralmente fermentados entre 25 e 60% de umidade inicial enquanto os substratos celulósicos (palhas, cascas, bagaço, farelos e outros) permitem trabalhar com teores de umidade mais elevados, 60 a 80% sem o aparecimento de água livre (SPIER, 2005).

A seleção adequada do substrato é de fundamental importância para o sucesso de qualquer tipo de fermentação. Para o caso do processo de fermentação em estado sólido (FES), os substratos sólidos são constituídos basicamente de macromoléculas orgânicas, que se caracterizam pela insolubilidade em água e pela capacidade de promover o crescimento microbiano, mesmo sem a adição de nutrientes suplementares. Os resíduos de origem agroindustrial são os substratos mais utilizados neste processo, tais como: polpa de café, farelo de cereais, palhas, bagaço de cana, cascas de frutas processadas, batata, farinha de cereais, mandioca, entre outros (SPIER, 2005).

Os resíduos agroindustriais são geralmente considerados os melhores substratos para os processos em meio sólido. O uso destes materiais agroindustriais deve-se ao fato de apresentarem as seguintes características: são recursos renováveis, sua produção depende de outra atividade produtiva, muitas vezes são subprodutos ou produtos secundários, são produzidos em grande quantidade e normalmente constituem um problema localizado, quando

considerados rejeitos ou descartes industriais, que necessitam de algum tratamento ou alguma aplicação (SPIER, 2005).

Dentre os vários grupos de microrganismos, os fungos filamentosos são os mais explorados por causa da sua capacidade de crescer em substratos sólidos complexos e de produzir conidiósporos (BHANU PRAKASH; PADMAJA; SIVA KIRAN, 2008). A fermentação semi-sólida permite a produção de conídios aéreos, similares àqueles produzidos naturalmente na superfície de cadáveres de insetos (no caso de fungos entomopatogênicos) e superiores aos micélios e blastóporos produzidos por fermentação submersa. Micélios e blastóporos submersos possuem parede celular muito fina para tolerar estresses ambientais, como dessecação após a fermentação e radiação solar após aplicação no campo (YE *et al.*, 2006).

Os meios sólidos se assemelham aos ambientes naturais de desenvolvimento dos fungos filamentosos e suas formas de desenvolvimento vegetativo são constituídas por hifas aéreas ramificadas. Elas são propícias a colonização de matrizes sólidas porosas. A matriz porosa pode ser constituída de um substrato úmido ou de um suporte inerte capaz de absorver os nutrientes presentes em uma solução. A umidade relativa depende da capacidade de retenção de água de um material utilizado como substrato ou suporte, suportando também pressões osmóticas elevadas (SPIER, 2005).

A produção de esporos fúngicos para biocontrole é bem relatada (GUIJARRO *et al.*, 2006; JONES *et al.*, 2004; LARENA *et al.*, 2003; LARENA; MELGAREJO; DE CAL, 2003), entretanto a maioria utiliza meio líquido para a produção de fungos do gênero *Trichoderma* sp (GALLETTI *et al.*, 2008; VERMA *et al.*, 2006; VERMA *et al.*, 2007).

Cavalcante *et al.* (2008) testaram o efeito da umidade do meio de cultura na produção de conídios de diferentes espécies de *Trichoderma* por fermentação semi-sólida. As espécies em estudo foram *T. harzianum* sp, *T. viride* sp, *T. koningii* sp e *T. polysporum* sp., e os meios semi-sólidos testados foram arroz e farelos de trigo e de milho. O farelo de trigo foi o substrato mais adequado para a produção de esporos das quatro espécies, sendo o aumento da produção extremamente maior para o *T. harzianum* e *T. viride*.

### 2.3. O processo de secagem

A secagem tem a finalidade de eliminar um líquido volátil contido num corpo não volátil, através da evaporação, levando à diminuição da atividade de água do produto. O tipo de secagem a ser utilizado depende, dentre outros fatores, do produto a ser desidratado, da sua constituição química e das características físicas do produto final desejado (ALONSO, 2001).

Os produtos em geral são muito diferentes entre si devido a sua forma, estrutura e suas dimensões, além de as condições de secagem serem muito diversas de acordo com as propriedades do ar de secagem e com a forma com que se faz o contato ar-produto. Uma vez que o produto é colocado em contato com ar quente, ocorre uma transferência do calor do ar para o produto sob o efeito da diferença de temperatura existente entre eles. Simultaneamente, a diferença de pressão parcial de vapor de água existente entre o ar e a superfície do produto determina transferência de vapor para o ar. Uma parte do calor que chega ao produto é utilizada para vaporizar a água e a outra, para elevar a temperatura da mistura (ALONSO, 2001).

Quando um material é colocado em um secador, existe um curto período de estabilização, em que a superfície é aquecida até a temperatura de bulbo úmido. Inicia-se, então, a secagem, e enquanto a água se movimentar do interior do material na mesma taxa em que é evaporada da superfície, esta permanece úmida. Este período é conhecido como o “período de taxa constante”, que continua até que um teor de umidade crítico é alcançado. De forma geral, a taxa de secagem diminui gradualmente ao final do período da taxa constante. Quando o teor de umidade do material cai além do teor crítico, a taxa de secagem decresce lentamente até se aproximar de zero no teor de umidade de equilíbrio (o material fica em equilíbrio com o ar de secagem). Esse período é conhecido com período de taxa decrescente de secagem. Nesse período, a taxa de movimento de água do interior para a superfície do produto torna-se menor do que a taxa na qual a água evapora para o ar circundante; portanto, a superfície seca (assumindo que a temperatura, a umidade e a velocidade do ar permanecem constantes). Se a mesma quantidade de calor é fornecida pelo ar, a temperatura da superfície aumenta até alcançar a temperatura de bulbo seco do ar de secagem (FELLOWS, 2006).

### 2.3.1. Secagem por “spray drying”

“Spray drying”, ou atomização, é uma operação unitária pela qual um produto líquido é microdisperso na forma de gotículas (daí o termo “atomização”) em direção a uma corrente de gás aquecido para instantaneamente se obter um pó. O gás geralmente usado é ar, ou mais raramente, um gás inerte como nitrogênio. O líquido inicial alimentando o atomizador pode ser uma solução, uma emulsão ou uma suspensão. A Figura 1 esquematiza um “spray dryer”. O objetivo da atomização é criar a máxima transferência de calor, na superfície da gotícula, entre o ar seco e o líquido, para otimizar a transferência de calor e de massa. O contato das gotículas com o ar ocorre durante a atomização, iniciando-se o estágio da secagem (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007).

De acordo com o posicionamento do bico atomizador, comparado com o fluxo de ar quente, o processo de secagem é concorrente ou contracorrente. No processo concorrente, o líquido é pulverizado na mesma direção do fluxo de ar quente. Ao contato das gotas com o ar quente, os balanços de temperatura e pressão parcial de vapor são estabelecidos entre as fases líquida e gasosa. Desta forma, a transferência de calor é conduzida do ar em direção ao produto, como resultado da diferença de temperatura, enquanto a transferência de água ocorre na direção oposta, devido à diferença de pressão de vapor. A separação do produto seco do ar úmido é realizada através de um ciclone (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007).

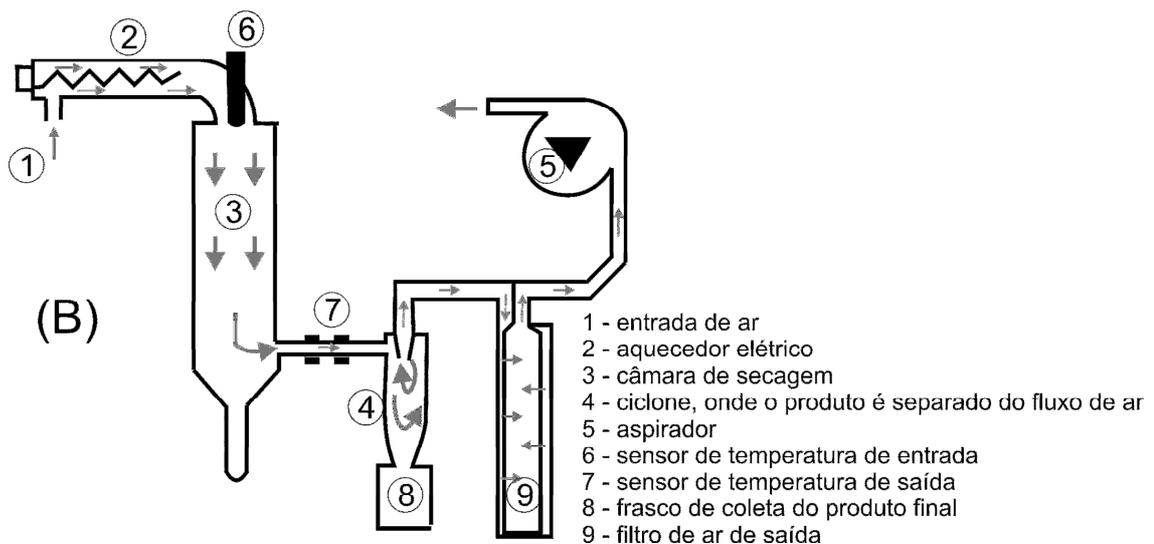


Figura 1 - Desenho esquemático do “spray dryer” com fluxo de secagem concorrente.

A desidratação por atomização é viável para a maioria dos produtos em suspensão ou solução, com concentração mínima de sólidos de 20%. Sua utilização é uma questão de custo e disponibilidade (DAIÚTO; CEREDA, 2003).

As vantagens desta técnica incluem: o fato de o processo ser contínuo e de fácil operação, sendo possível adaptação ao controle totalmente automático; e à disponibilidade de ampla faixa de modelos de secadores adaptáveis a uma variedade de aplicações, especialmente para a desidrataação de materiais temolábeis (VEGA; ROOS, 2006).

As temperaturas de entrada e de saída no atomizador são, usualmente, as principais variáveis que controlam a umidade no produto desidratado (DAIÚTO; CEREDA, 2003).

A operação de produzir pó em “spray dryer” a partir da alimentação de um líquido é frequentemente limitada pelos fluxos de deposição de parede, o que resulta na deposição de pó nas paredes internas do equipamento (LANGRISH; CHAN; KOTA, 2007). Isso se deve à rápida remoção de água que ocorre no atomizador, levando à produção de materiais amorfos. Nesse contexto, a pegajosidade da superfície da gota durante a secagem pode ser prevista por meio de vários enfoques, como a temperatura de transição vítrea (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007).

A pegajosidade do pó pode ser descrita em termos de coesão (pegajosidade partícula-partícula) e adesão (pegajosidade partícula-parede da superfície). A coesão é uma propriedade interna do pó e é uma medida das forças que mantêm as partículas unidas, enquanto a adesão é uma propriedade interfacial e é uma medida das forças que mantêm as partículas na superfície de outro material (BOONYAI; BHANDARI; HOWES, 2004)

Pesquisadores têm adicionado adjuvantes de secagem, ou carreadores, para reduzir a pegajosidade do material e reduzir os problemas de deposição. Muitos destes possuem alto peso molecular (LANGRISH; CHAN; KOTA, 2007).

### 2.3.2. Adjuvantes de secagem

Alguns dos adjuvantes usados para introduzir alterações físicas no produto permitem reduzir a deposição nas paredes e facilitam a manipulação dos produtos. Entre os adjuvantes estão incluídos o ar, gases comprimidos, espumas, alginatos, proteína de soja, mono-esterato de glicerol, gomas naturais, sacarose, xaropes de amido e dextrinas. Destes, os

mais importantes são os suportes, que podem ser usados em até 80% do volume total de material a ser desidratado, de forma que as características e qualidade do produto são fortemente influenciadas pelo tipo de material usado. Entre os suportes, os mais importantes são os amidos e derivados, em função de seus preços, desempenho e disponibilidade (DAIÚTO; CEREDA, 2003).

Um suporte tem por objetivo facilitar o processo de secagem, melhorar a qualidade do produto final e reduzir os custos do processo. A seleção do melhor suporte deve levar em consideração uma série de fatores, que envolvem a qualidade do produto, o preço do suporte e o desempenho no processo (DAIÚTO; CEREDA, 2003).

Tabela 2 - Temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) e peso molecular de diferentes materiais.

| Materiais             | Peso molecular (g/mol) | $T_g$ (°C) |
|-----------------------|------------------------|------------|
| Frutose               | 180                    | 5          |
| Glicose               | 180                    | 31         |
| Galactose             | 180                    | 32         |
| Sacarose              | 342                    | 62         |
| Maltose               | 342                    | 87         |
| Lactose               | 342                    | 101        |
| <i>Maltodextrinas</i> |                        |            |
| DE 36                 | 500                    | 100        |
| DE 25                 | 720                    | 121        |
| DE 20                 | 900                    | 141        |
| DE 10                 | 1800                   | 160        |
| DE 5                  | 3600                   | 188        |
| Amido                 | -                      | 243        |

Fonte: Bhandari e Howes (1999)

Quando diferentes açúcares tais como frutose, glicose, sacarose, lactose, maltose, xaropes de glicose e maltodextrinas, são comparados em seus desempenhos como suporte para atomização, os melhores são os produtos com maiores temperaturas de transição vítrea ( $T_g$ ) e de fusão ( $T_m$ ). Esses parâmetros são relacionados com o comprimento das cadeias dos

carboidratos (DAIÚTO; CEREDA, 2003). Substâncias com baixo peso molecular (por exemplo, dissacarídeos, como sacarose) e dissacarídeos (como frutose e glicose) na sua forma pura têm baixa temperatura de transição vítrea, enquanto moléculas com longas cadeias têm maior temperatura de transição vítrea (BHANDARI; HOWES, 1999) (Tabela 2).

Um vidro é definido como um sólido amorfo, não cristalino, que pode ser formado pelo super resfriamento rápido do líquido, conhecido como vitrificação, até uma viscosidade de  $10^{10}$ - $10^{14}$ Pa.s ou pela rápida remoção do solvente líquido, por exemplo, evaporação da água durante o processo de desidratação. A transição vítrea representa uma mudança de calor específico, específica para cada material, de um estado gomoso para um estado sólido vítreo, ou de um estado vítreo para um estado líquido viscoso gomoso, que é capaz de escoar. A temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), uma propriedade específica de um material amorfo, é definida como uma temperatura na qual a transição vítrea ocorre (BOONYAI; BHANDARI; HOWES, 2004).

#### 2.4. Microencapsulação

Uma das aplicações muito valorizadas no uso de suporte é a microencapsulação. No entanto a capacidade de encapsular não é característica de todo tipo de suporte, alguns servindo apenas de auxiliares no processo de secagem sem função de encapsular princípios ativos (DAIÚTO; CEREDA, 2003). A microencapsulação é definida como um processo no qual partículas finas ou gotas são rodeadas por uma cobertura, ou embebidas em uma matriz, para dar origem a pequenas cápsulas com várias propriedades úteis (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007).

É uma técnica relativamente recente que vem se desenvolvendo em ritmo acelerado. O conceito básico é de um agente ativo aprisionado em invólucro protetor, semelhante a uma cobertura, para ser liberado em determinado momento programado. A liberação vai depender do material empregado na confecção do envelope, ou da parede protetora e das condições físicas vigentes (DAIÚTO; CEREDA, 2003).

A encapsulação por atomização envolve três etapas básicas. A primeira é a preparação da dispersão ou emulsão a ser processada, a segunda é a homogeneização da dispersão; e, finalmente, a atomização da massa no interior da câmara de secagem (BARROS; STRINGHETA, 2006; GHARSALLAOUI *et al.*, 2007). A principal vantagem da

encapsulação por atomização é a possibilidade de trabalhar com materiais termolábeis (AZEREDO, 2005). Daiúto e Cereda (2003) citam ainda como vantagens o fato de o processo ser econômico e flexível, o uso de equipamentos já disponíveis e a produção de microcápsulas de boa qualidade.

O calor, umidade e oxidação podem afetar adversamente alguns compostos durante o processamento ou na estocagem. As formulações microencapsuladas podem ter sua liberação controlada, suspensa ou postergada, e ter seus agentes ativos sensíveis ao oxigênio protegidos no processo e na fase de estocagem (DAIÚTO; CEREDA, 2003). A microencapsulação pode ainda proporcionar uma barreira física entre o composto ativo e os outros componentes do produto (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007).

Daiúto e Cereda (2003) citam as classes às quais pertencem os diversos tipos de materiais usados como agentes encapsulantes:

Gomas: goma arábica, agar, carragena, alginato de sódio;

Carboidratos: amido, maltodextrina, amidos modificados, ciclodextrina, xaropes de amido;

Celulose: carboximetilcelulose, etilcelulose, metilcelulose, acetilcelulose, nitrocelulose;

Lipídeos: cera parafina, triestearina, ácido esteárico, óleos, gorduras, monoglicerídeos, diglicerídeos e óleos hidrogenados;

Proteínas: glúten, caseína, gelatina, albumina, hemoglobina, peptídeos.

A escolha do encapsulante para a microencapsulação por “spray-drying” é muito importante para a eficiência da encapsulação e para a estabilidade da microcápsula. A eficiência da microencapsulação pode ser melhorada aumentando a concentração de encapsulante, o que pode estar relacionado ao efeito da concentração dos sólidos do encapsulante na formação da superfície no núcleo antes da formação da crosta em volta das gotas secas (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007).

O encapsulante ideal deve apresentar propriedades emulsificantes, ser capaz de formar filmes, ter baixa viscosidade e altos níveis de sólidos, exibir baixa higroscopicidade e ser de baixo custo. Goma arábica, amidos modificados e hidrolisados são os agentes encapsulantes mais frequentemente usados para uso no processo de “spray drying” (COLLARES, 2001).

### 2.4.1. Maltodextrina

As maltodextrinas são, por definição, hidrolisados de amido que consistem de unidade de  $\alpha$ -D-glicose ligadas principalmente por ligações glicosídicas (1  $\rightarrow$  4) com uma fórmula geral igual a  $[(C_6H_{10}O_5)_nH_2O]$ . Maltodextrina, portanto, é o nome comum para oligossacarídeos de glicose, formados durante a decomposição parcial do amido (COLLARES, 2001).

Teoricamente, as maltodextrinas podem ser produzidas pela hidrólise enzimática ( $\alpha$ -amilase) ou ácida (ácido clorídrico). Na prática, entretanto, a hidrólise ácida produz excesso de glicose livre junto com as maltodextrinas, resultando em um produto que tem uma grande tendência à retrogradação, resultando na formação de soluções turvas. A nível comercial, as maltodextrinas são invariavelmente preparadas pela hidrólise enzimática controlada do amido (COLLARES, 2001).

Assim, as dextrinas, ou maltodextrinas, são produzidas pelo aquecimento do amido (gelatinização) seguido de uma leve hidrólise enzimática, obtendo-se oligômeros de glicose com comprimento médio da cadeia de 5 a 10 unidades de glicose por molécula (COLLARES, 2001; DAIÚTO; CEREDA, 2003). O grau de decomposição química fica entre aquele do amido e do xarope de amido, com um DE (dextrose equivalente) entre 2 e 20 (COLLARES, 2001). O termo dextrose equivalente é definido como o poder redutor percentual de um composto, quando comparado ao da glicose (dextrose), na mesma base de peso seco (AZEREDO, 2005), e é usado para descrever o grau de hidrólise do amido e o peso molecular médio da molécula (LANGRISH; CHAN; KOTA, 2007).

Usualmente esses compostos são produzidos na forma de pó, e seu conteúdo de umidade varia de 3,0 a 5,0%. Na forma seca são brancos, têm boa escoabilidade (*free-flowing*), com sabor muito suave, e com pouca ou nenhuma doçura. Por serem pouco higroscópicos, têm aplicação em produtos onde ganhos significantes de umidade são indesejáveis (COLLARES, 2001).

A variação das propriedades das maltodextrinas está ligada ao valor de dextrose equivalente (DE) (COLLARES, 2001). Existe alta correlação entre o DE de um amido hidrolisado e a estabilidade oxidativa conferida ao núcleo. Com o aumento do DE, aumenta a barreira ao oxigênio e, portanto, a estabilidade oxidativa. Por outro lado, quanto maior o DE, menor a temperatura de transição vítrea (Tabela 2), aumentando a probabilidade de aglomeração (*caking*) do pó obtido (AZEREDO, 2005). Além disso, as maltodextrinas de

menores valores de DE têm menor tendência para absorver umidade do ar (COLLARES, 2001). A solubilidade destes compostos também varia com o valor de DE (Tabela 3).

Tabela 3 - Valores de solubilidade para maltodextrina em função da DE

| Faixa de DE | Solubilidade aproximada em água à temperatura ambiente (%) |
|-------------|--|
| 9 – 12      | 40   |
| 13 – 17     | 60   |
| 17 - 20     | 70   |

Fonte: Collares (2001)

Segundo Gharsallaoui *et al.* (2007), as maltodextrinas com dextrose equivalente entre 10 e 20 são adequadas para uso como encapsulante.

O uso de maltodextrina com adjuvante de secagem tem dado bons resultados em termos de minimização da deposição nas paredes do equipamento na secagem em “spray dryer” (LANGRISH; CHAN; KOTA, 2007).

## 2.5. Secagem de agentes fúngicos por “spray-drying”

A falta de formulações adequadas de fungos para controle de fitopatógenos tem sido um sério entrave na comercialização de agentes de controle biológico (MELO; COSTA, 2005).

Para controle biológico, é importante guardar a unidade ativa em um estágio infeccioso, contudo dormente, seguro e fácil para aplicação. A chave para prolongar sua sobrevivência é parar a germinação e reduzir o metabolismo o máximo possível. Uma possibilidade para a estabilização é a desidratação (HORACZEK; VIERNSTEIN, 2004).

A secagem em “spray dryer” tem sido reportada como eficiente para secagem de conídios, uma vez que diminui a perda durante o processo de secagem e melhora a estabilidade do fungo durante seu armazenamento (GAVA, 2006). A rapidez obtida na desidratação por “spray drying” é resultante do fato de que nesta técnica uma suspensão aquosa ou solução é reduzida a uma névoa na qual as partículas têm uma área superficial excessivamente grande (MAZUR; WESTON, 1956).

O benefício da secagem de conídios é a redução da sua atividade metabólica, que minimiza a perda das reservas de armazenamento e a produção de metabólitos tóxicos

(GUIJARRO *et al.*, 2006). A secagem do produto permite a preservação do inóculo por um longo período de tempo, mantendo alta viabilidade, e tem a vantagem de não requerer baixa temperatura durante os processos de armazenamento e distribuição, além de tornar o produto mais econômico. Além disso, a utilização de um produto desidratado poderia ser um passo em direção à formulação de agentes microbianos que poderiam ser utilizados em canais normais de distribuição e estocagem (LARENA *et al.*, 2003; LARENA; MELGAREJO; DE CAL, 2003). Segundo Larena, De Cal e Melgarejo (2007), uma função importante das formulações de agentes de biocontrole é a regulação da disponibilidade de água dos microrganismos.

Dessecação limitada e tolerância de temperatura são as restrições mais importantes para o processamento de fungo de biocontrole por métodos de secagem comumente utilizados (HORACZEK; VIERNSTEIN, 2004). Para a proteção de microrganismos e componentes termolábeis é desejável a secagem com ar a baixa temperatura (LARENA *et al.*, 2003; LARENA; MELGAREJO; DE CAL, 2003).

Seguem exemplos de trabalhos envolvendo a secagem em “spray dryer” de conídios de fungos utilizados no controle biológico.

Jones *et al.* (2004) realizaram a secagem de conídios de *Coniothyrium minutans*, em “spray dryer”, utilizando temperatura de entrada do ar de secagem de 70°C, e de saída, de aproximadamente 50°C. Os esporos desidratados foram estocados a 5°C por 6 meses. Nesse estudo, os conídios de *C. minutans* produzidos por fermentação semi-sólida mostraram-se capazes de resistir às condições de secagem por “spray drying” e de reter sua habilidade de parasitar seu hospedeiro após o período de estocagem, apesar de terem necessitado de maior tempo para germinar.

Na secagem de conídios de *Penicillium frequentans*, Guijarro *et al.* (2006) utilizaram temperatura de entrada de 150°C, e de saída, maior que 84°C. Foram adicionadas às suspensões de esporos, leite em pó desnatado reconstituído e MgSO<sub>4</sub>, ambos na concentração de 10% (p/v), que foram utilizados como protetores. A viabilidade inicial dos esporos foi de 95% e decresceu para menos de 27%, na secagem sem os protetores; e para menos de 1% quando os mesmos foram adicionados.

Larena *et al.* (2003), utilizando condições semelhantes à de Guijarro *et al.* (2006) para a desidratação de esporos de *Epicoccum nigrum*, obtiveram como resultado viabilidade dos esporos menor que 10% após a secagem.

Conídios de *Penicillium oxalicum* foram desidratados sob condições de temperatura de entrada de 150°C, e de saída, maior que 80°C. Foram adicionados à suspensão, para uso como protetores, leite em pó desnatado reconstituído, MgSO<sub>4</sub>,

combinação de ambos, e  $K_2SO_4$ , na concentração de 10% (p/v) para todos os casos. A viabilidade dos esporos após a secagem foi menor que 20% (LARENA; MELGAREJO; DE CAL, 2003).

Guijarro *et al.* (2006), Larena *et al.* (2003), Larena, Melgarejo e De Cal (2003) atribuíram as baixas viabilidades dos esporos após a desidratação, às altas temperaturas do ar empregadas na secagem.

---

---

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

---

---

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Microrganismo e manutenção

O microrganismo utilizado neste estudo foi uma linhagem de fungo *Trichoderma harzianum* LCB47, gentilmente cedido pelo Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Semi-Árido, Petrolina/PE.

A cultura estoque, na forma de esporos, foi mantida em tubos contendo solo estéril a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

Para ativação da linhagem foi utilizado o ágar batata dextrose (Anexo A), ou BDA, marca HiMedia. O meio de cultura foi preparado diluindo 39 g do ágar em 1 L de água destilada. 10 mL de meio de cultura foram adicionados a tubos de 20 ml, e em seguida foram autoclavados a  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 min. Após a esterilização, o ágar foi solidificado na posição inclinada. Os meios inoculados foram incubados a  $30^{\circ}\text{C}$  por 7 dias, e conservados a  $4^{\circ}\text{C}$  por até 3 meses.

#### 3.2. Preparo do inóculo

Os esporos foram desprendidos da superfície do ágar através da adição de aproximadamente 6 ml de solução estéril de Tween 80 (Vetec) (0,3%, v/v) ao tubo e com auxílio de alça de platina. 1 mL da suspensão recuperada foi inoculada em Erlenmeyers de 125 mL, contendo 4,6 g de meio de produção de inóculo (Anexo A), previamente autoclavados a  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 min. Os meios foram incubados em estufa biológica, marca Tecnal, a  $30^{\circ}\text{C}$  por 5 a 7 dias, e conservados a  $4^{\circ}\text{C}$  por até 3 meses.

Ao frasco contendo o inóculo, adicionou-se 50 mL de solução estéril de Tween 80 (Vetec) (0,3%v/v) e agitou-se mecanicamente para o desprendimento dos esporos do material sólido. A suspensão obtida foi transferida assepticamente para recipiente coletor, usando gaze estéril como meio para reter partículas sólidas.

A concentração de esporos na suspensão foi determinada pela contagem em Câmara de Neubauer usando microscópio ótico Olympus CBA com magnificação de 400 $\times$  (BIER; SPLITTSTOESSER; TORTORELLO, 2001).

### 3.3. Produção e recuperação dos esporos

Para produção de esporos de *Trichoderma harzianum* em maior escala utilizou-se meio de farelo de trigo (Anexo A), conforme descrito por Cavalcante *et al.* (2008).

O meio de cultura foi preparado adicionando-se 80 mL de água destilada em 40 g de farelo de trigo. Foram pesados 40 g do meio de cultura em Erlenmeyers de boca larga (aproximadamente 5cm de diâmetro) com capacidade de 500 mL, e em seguida os meios de cultura foram autoclavados a 121°C por 15 min. Após resfriados, foram inoculados com  $1 \times 10^6$  conídios/g de meio. Os meios de cultura foram incubados em estufa biológica a 30°C por 5 a 8 dias, sendo mantidos na incubadora até o momento de serem utilizados para o processamento em atomizador.

Os esporos foram removidos dos meios fermentados através de duas extrações consecutivas com 50 mL de água destilada estéril e filtração em gaze. As suspensões obtidas foram coletadas em recipiente estéril e homogeneizadas suavemente. Amostras foram retiradas para determinação de sólidos solúveis totais, contagem total de esporos e viabilidade celular.

### 3.4. Secagem em “spray dryer”

#### 3.4.1. Equipamento

A secagem por atomização foi conduzida em Mini Spray Dryer Büchi B-290 (Figura 2), com capacidade máxima de secagem de 1,0 L de água por hora e bico atomizador integrado de duplo fluido com 0,7 mm de diâmetro. O atomizador de secagem Büchi B-290 funciona segundo o princípio da corrente de ar e de produto em sentido concorrente (BÜCHI, 2005).



Figura 2 - Mini Spray Dryer Büchi B-290.

#### 3.4.2. Preparo da suspensão de esporos

Mediu-se o volume da suspensão com o auxílio de proveta de plástico de 1000 mL, adicionou-se o encapsulante, e então a suspensão contendo encapsulante foi homogeneizada em homogeneizador de tecidos Ação Científica, modelo AC 620/2 por aproximadamente 1 minuto. Em seguida, foi filtrada em malha de poliamida (nylon) para garantir tamanho de partículas na suspensão menor que o diâmetro do orifício do bico atomizador do “spray dryer”, evitando seu entupimento. A Figura 3 ilustra as etapas até a atomização dos esporos.

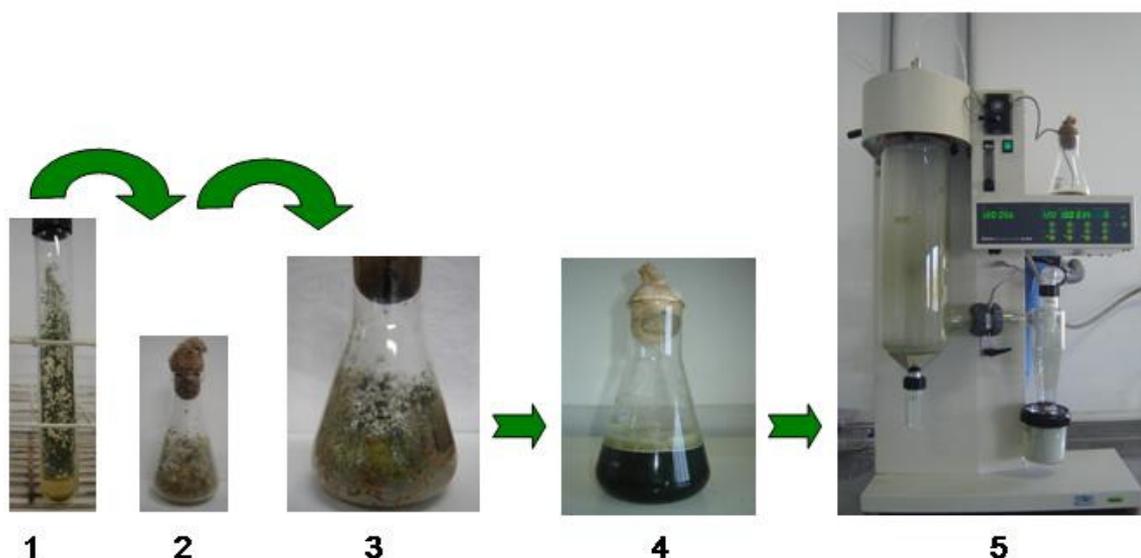


Figura 3 - Preparo dos esporos para a secagem em “spray dryer”: 1- Agar inclinado, 2- Inóculo, 3- Produção de esporos em maior escala, 4- suspensão de esporos, 5- atomização.

### 3.4.3. Experimento preliminar

Foi realizado, como experimento inicial, a injeção de suspensão de esporos fúngicos sem presença de encapsulante, com temperatura de entrada e de saída do ar de 190 e 90°C, respectivamente.

### 3.4.4. Determinação das condições de atomização

#### a) Adição de maltodextrina DE10 como encapsulante

Nesta etapa, foi avaliada a necessidade de utilização de encapsulante para recuperação do material sólido. Para tanto foi utilizado maltodextrina DE10, adicionada em uma quantidade correspondente a quatro vezes o teor de sólidos solúveis totais da suspensão de esporos.

As condições de secagem foram:

Temperatura de entrada do ar de secagem: 190°C

Temperatura de saída do ar: 90°C

Vazão de ar comprimido para a atomização: 742 L.h<sup>-1</sup>

Aspiração: 90%

Vazão de alimentação da suspensão: 50%

#### b) Avaliação das temperaturas de entrada e saída

Visando buscar as melhores condições de temperatura de entrada e de saída do ar de secagem, para os quais se obtivessem os maiores valores de nível de sobrevivência dos esporos, realizaram-se experimentos variando-se ambos os parâmetros (Tabela 4).

Tabela 4 - Condições de secagem dos experimentos iniciais para obtenção de altos níveis de sobrevivência.

| Temperatura (°C) |       | Vazão de alimentação da suspensão (%) <sup>a</sup> | Aspiração (%) <sup>b</sup> | Vazão de ar comprimido (L.h <sup>-1</sup> ) |
|------------------|-------|--|----------------------------|---|
| Entrada          | Saída |  |                            |   |
| 100              | 55    | 20   | 100                        | 742   |
| 120              | 65    | 20   | 100                        | 742   |
| 140              | 70    | 40   | 95                         | 742   |
| 170              | 70    | 50   | 90                         | 742   |
| 90               | 90    | 50   | 90                         | 742   |

a - correlação entre os valores percentuais indicados e a vazão de alimentação, em mL.h<sup>-1</sup> para água destilada está indicada no Anexo B.

b - correlação entre os valores percentuais indicados e o fluxo de volume, em m<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup> está indicada no Anexo C.

Fixou-se, então, a temperatura de entrada e variou-se a de saída para avaliação do efeito da temperatura de saída, tanto na viabilidade dos esporos quanto no teor de umidade no pó obtido (Tabela 5).

Tabela 5 - Condições de secagem dos experimentos para avaliação do efeito da temperatura de saída do ar no nível de sobrevivência dos esporos e na umidade do pó.

| Temperatura (°C) |       | Vazão de alimentação da suspensão (%) <sup>a</sup> | Aspiração (%) <sup>b</sup> | Vazão de ar comprimido (L.h <sup>-1</sup> ) |
|------------------|-------|--|----------------------------|---|
| Entrada          | Saída |  |                            |   |
| 120              | 55    | 40   | 100                        | 742   |
| 120              | 60    | 25   | 100                        | 742   |
| 120              | 65    | 20   | 100                        | 742   |

a - correlação entre os valores percentuais indicados e a vazão de alimentação, em mL.h<sup>-1</sup> para água destilada está indicada no Anexo B.

b - correlação entre os valores percentuais indicados e o fluxo de volume, em m<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup> está indicada no Anexo C.

Para avaliação do efeito da temperatura de entrada na viabilidade dos esporos e no teor de umidade do material seco resultante, fixou-se a temperatura de saída do ar e variou-se a temperatura de entrada (Tabela 6).

Tabela 6 - Condições de secagem dos experimentos para avaliação do efeito da temperatura de entrada do ar no nível de sobrevivência dos esporos e na umidade do pó.

| Temperatura (°C) |       | Vazão de alimentação da suspensão (%) <sup>a</sup> | Aspiração (%) <sup>b</sup> | Vazão de ar comprimido (L.h <sup>-1</sup> ) |
|------------------|-------|--|----------------------------|---|
| Entrada          | Saída |  |                            |   |
| 100              | 55    | 20   | 100                        | 742   |
| 110              | 55    | 27   | 100                        | 742   |
| 120              | 55    | 40   | 100                        | 742   |
| 140              | 55    | 55   | 100                        | 742   |
| 160              | 55    | 60   | 95                         | 742   |

a - correlação entre os valores percentuais indicados e a vazão de alimentação, em mL.h<sup>-1</sup> para água destilada está indicada no Anexo B.

b - correlação entre os valores percentuais indicados e o fluxo de volume, em m<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup> está indicada no Anexo C.

O encapsulante utilizado foi maltodextrina DE10, que foi adicionado à suspensão de esporos em uma quantidade correspondente a 4 vezes o teor de sólidos solúveis totais da suspensão. A vazão de ar comprimido para a atomização foi de 742 L.h<sup>-1</sup>, a temperatura de entrada foi fixada manualmente, enquanto a temperatura de saída do produto foi ajustada através da vazão de alimentação da suspensão e da velocidade de aspiração.

Amostras da suspensão de esporos, antes do processo de secagem, como no pó resultante do processamento, foram retiradas para determinação do nível de sobrevivência dos esporos, por meio da análise de viabilidade.

O nível de sobrevivência dos esporos é dado pelo quociente dos conídios germinados antes (viabilidade antes) e após (viabilidade depois) o processo de secagem (HORACZEK; VIERNSTEIN, 2004).

### c) Avaliação do tipo de encapsulante utilizado na secagem

Foram realizados experimentos a fim de se avaliar a eficiência de alguns materiais comumente utilizados como agente encapsulante em processos de secagem por atomização: amido solúvel P.A. (Vetec), goma arábica, leite em pó integral (La Sereníssima), maltodextrina (ED 10) e polivinilpirrolidona (PVP – 40T, Sigma).

Todos os agentes encapsulantes foram testados nas seguintes condições:

- Temperatura de entrada do ar de secagem: 100°C
- Temperatura de saída do produto: 55°C
- Vazão de ar comprimido para a atomização: 742 L.h<sup>-1</sup>
- Aspiração: 100%
- Vazão de alimentação da suspensão: 20%

Teor de encapsulante adicionado à suspensão de esporos: 4 vezes o teor de sólidos solúveis totais da suspensão.

Realizou-se análise de viabilidade tanto na suspensão de esporos antes do processo de secagem, como no pó resultante do processamento, para estimação do nível de sobrevivência dos esporos.

Foi realizado um experimento para a avaliar a capacidade calorífica dos encapsulantes, e verificar uma possível relação entre seus  $C_p$ s e a capacidade desses encapsulantes de proteger os esporos do calor durante a secagem. A capacidade calorífica é dada por:

$$C_p = Q/(T_a - T_s) \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: Q é a quantidade de calor ( $\text{cal} \cdot \text{s}^{-1}$  ou  $\text{J} \cdot \text{s}^{-1}$ )

$T_a$  é a temperatura do ambiente ( $^{\circ}\text{C}$  ou K)

$T_s$  é a temperatura do agente encapsulante ( $^{\circ}\text{C}$  ou K)

Aquele que apresenta maior diferença entre  $T_a$  e  $T_s$ , ou seja, que se aquece rapidamente, apresenta menor  $C_p$ , uma vez que este é inversamente proporcional à diferença ( $T_a - T_s$ ), considerando-se Q constante em todos os experimentos.

Foram avaliados os seguintes encapsulantes: amido solúvel, maltodextrina DE 10 e goma arábica. Utilizando-se béquer de vidro de 250 mL, foram preparados 100 mL de solução de cada encapsulante nas concentrações de 10, 30 e 50%. Após completa solubilização da solução, o béquer foi colocado em um banho termostático; e através de um termômetro de mercúrio inserido aproximadamente no ponto frio da solução (posição correspondente ao terço inferior do volume de solução), realizou-se a medição da sua temperatura com o tempo. A figura 4 mostra o aparato utilizado para a realização do experimento.

A temperatura do banho termostático foi fixada em  $65^{\circ}\text{C}$ , e todos os experimentos foram realizados com a temperatura inicial da solução de encapsulante igual a  $30^{\circ}\text{C}$ . Somente as soluções de amido, antes do início do experimento, foram submetidas a aquecimento, a aproximadamente  $85^{\circ}\text{C}$  para sua completa solubilização, e em seguida foram resfriadas até atingirem  $30^{\circ}\text{C}$ .

Realizou-se o acompanhamento da temperatura das soluções durante 30 minutos, verificando-se o valor marcado no termômetro a cada minuto, nos 10 primeiros minutos, e a cada 5 minutos, nos 20 minutos restantes.

Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata.



Figura 4 - Sistema utilizado para a realização do experimento para avaliação da capacidade calorífica dos encapsulantes.

d) Estudo da temperatura de entrada e do teor de encapsulante no nível de sobrevivência dos esporos, e na umidade e atividade de água do pó resultante do processo de secagem.

Para analisar o efeito das variáveis temperatura de entrada do ar de secagem e teor de encapsulante adicionado à suspensão de esporos, foi montado um delineamento composto central rotacional. Utilizou-se maltodextrina DE10 como encapsulante, a temperatura de saída foi fixada em 55°C, enquanto o teor de sólidos solúveis totais da suspensão ficou estabelecido em 2,0°Brix, para padronizar a concentração de maltodextrina a ser adicionada à suspensão.

O planejamento consistiu de um fatorial  $2^2$ , incluindo 4 pontos axiais e dois ensaios no ponto central. A temperatura de entrada foi fixada de acordo com cada experimento, enquanto a velocidade do aspirador (100%) e a vazão de ar comprimido para a atomização ( $742 \text{ L.h}^{-1}$ ) foram constantes em todos os experimentos do planejamento. A vazão de alimentação da suspensão foi ajustada de forma a se estabelecer a temperatura de saída do pó de 55°C. As tabelas 7 e 8 mostram as condições utilizadas.

As amostras obtidas foram analisadas com relação à umidade, atividade de água e viabilidade dos esporos. A viabilidade dos esporos após a secagem foi relacionada com a viabilidade dos esporos na suspensão para avaliação do seu nível de sobrevivência.

Tabela 7 - Valores de cada nível do planejamento experimental

| Variáveis                      | Nível        |          |          |           |               |
|--------------------------------|--------------|----------|----------|-----------|---------------|
|                                | -1,4142      | -1       | 0        | +1        | +1,4142       |
| Temperatura de entrada<br>(°C) | 112          | 120      | 140      | 160       | 168           |
| Teor de encapsulante           | 2,6x (5,2%)* | 3x (6%)* | 4x (8%)* | 5x (10%)* | 5,4x (10,8%)* |

\* - A quantidade de encapsulante adicionada foi proporcional ao teor de sólidos solúveis totais (SST) da suspensão de esporos. Desta forma, teor de SST foi fixado em 2,0°Brix para todos os experimentos do planejamento, padronizando o percentual (p/v) de encapsulante adicionado para cada proporção indicada.

Tabela 8 - Valores dos parâmetros de cada experimento do planejamento

| Temperatura (°C) |       | Teor de encapsulante (%) | Vazão de alimentação da suspensão (%) <sup>a</sup> | Aspiração (%) <sup>b</sup> | Vazão de ar comprimido (L.h <sup>-1</sup> ) |
|------------------|-------|--------------------------|--|----------------------------|---|
| Entrada          | Saída |                          |  |                            |   |
| 120              | 55    | 6,0                      | 37   | 100                        | 742   |
| 120              | 55    | 10,0                     | 35   | 100                        | 742   |
| 160              | 55    | 6,0                      | 73   | 100                        | 742   |
| 160              | 55    | 10,0                     | 75   | 100                        | 742   |
| 112              | 55    | 8,0                      | 30   | 100                        | 742   |
| 168              | 55    | 8,0                      | 65   | 100                        | 742   |
| 140              | 55    | 5,2                      | 47   | 100                        | 742   |
| 140              | 55    | 10,8                     | 47   | 100                        | 742   |
| 140              | 55    | 8,0                      | 55   | 100                        | 742   |
| 140              | 55    | 8,0                      | 54   | 100                        | 742   |

a - correlação entre os valores percentuais indicados e a vazão de alimentação, em mL.h<sup>-1</sup> para água destilada está indicada no Anexo B.

b - correlação entre os valores percentuais indicados e o fluxo de volume, em m<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup> está indicada no Anexo C.

### **3.5 Avaliação preliminar da estabilidade dos esporos**

O material em pó obtido da condição 100/55°C (Tabela 4) foi submetido a um teste de estabilidade da viabilidade dos esporos desidratados. 1g de pó foi acondicionado em frascos de vidro âmbar rosqueados, com tampa de plástico vedados com parafilme. Armazenou-se uma amostra em geladeira e uma a temperatura ambiente. A cada semana, durante quatro semanas, retirou-se uma amostra de cada condição de estocagem, diluiu-se o pó em água destilada estéril e determinou-se a viabilidade dos esporos. Os experimentos foram conduzidos em duplicata.

Realizou-se análise de viabilidade tanto na suspensão de esporos antes do processo de secagem, como no pó resultante do processamento, para estimação do nível de sobrevivência dos esporos.

### **3.6. Métodos analíticos**

#### **3.6.1. Contagem total de esporos**

Contagem de esporos foi realizada em Câmara de Neubauer com auxílio de microscópio ótico da marca Olympus, modelo CBA, com magnificação de 400×. Foi feita contagem total dos esporos na suspensão, antes da secagem; e no pó resultante da secagem. Para contagem no produto em pó, diluiu-se 1 g do mesmo em 49 mL de água destilada estéril.

#### **3.6.2. Viabilidade**

A viabilidade foi determinada pela quantidade de esporos germinados e não germinados em placas de Petri contendo meio ágar água (WA) (Anexo A), após 24 horas de incubação a 21°C no escuro, segundo Horaczek e Viernstein (2004) com modificações quanto ao meio de cultura e o corante utilizados. Adicionou-se 0,1 mL da suspensão nas placas, e

após o tempo de incubação, aproximadamente 1 mL de solução lacto-glicérica de azul de anilina foi adicionado e espalhado delicadamente por toda a superfície das placas.

Com auxílio de microscópio ótico (magnificação de 400×) observaram-se 100 esporos ( Figura 5). Foram considerados germinados os esporos com hifas iguais ou maiores que seu tamanho (HORACZEK; VIERNSTEIN, 2004). Para análise de viabilidade no produto desidratado, 1 g do pó foi completamente diluído em 49 mL de água destilada estéril para inoculação na placa de Petri.

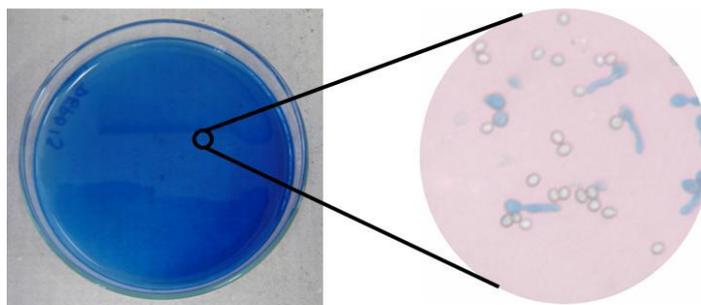


Figura 5 - Visualização dos esporos em meio WA com corante azul de anilina.

### 3.6.3. Atividade de água

A atividade de água ( $A_w$ ) expressa o teor de água livre em um produto; e é dada pela relação entre a pressão parcial de vapor da água contida no produto e a pressão de vapor da água pura a uma certa temperatura (ALONSO, 2001; AZEREDO *et al.*, 2004). O valor máximo de atividade de água é 1, para a água pura (ALONSO, 2001).

A atividade de água foi determinada no produto em pó por leitura direta em aparelho Aqualab modelo CX-2 – Decagon.

### 3.6.4. Umidade

A umidade em base úmida de um produto é a proporção direta entre a massa de água presente no material e a sua massa total. É a quantidade de água que pode ser removida do material sem alteração da estrutura molecular do sólido (ALONSO, 2001).

A umidade foi determinada no produto em pó segundo metodologia 012/IV (IAL, 2004). Foi utilizado um método de determinação direto, uma vez que a amostra foi removida e pesada, até peso constante, após seu aquecimento a 105°C em estufa de circulação de ar da marca Quimis.

---

---

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

---

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiramente foi avaliada a necessidade do uso de encapsulante na secagem por “spray dryer” de esporos de *T. harzianum* LCB47, através de um experimento inicial, sem adição de encapsulante. Posteriormente, já utilizando maltodextrina, foram analisados os dados com relação ao estudo de condições de secagem para obtenção de esporos viáveis após esse processo, e quanto ao efeito das temperaturas de saída e de entrada do ar na viabilidade final dos esporos e na umidade do pó obtido.

Seguem então os dados das secagens dos esporos fúngicos utilizando vários tipos de agentes encapsulantes. Aqueles que foram capazes de reter maiores viabilidades foram avaliados quanto a sua capacidade calorífica. Maltodextrina é então escolhida para ser usada como encapsulante nos experimentos para avaliação do efeito da temperatura de entrada e do teor de encapsulante no nível de sobrevivência dos esporos, e na umidade e atividade de água do produto final. Por último, foi avaliada a retenção da viabilidade dos esporos durante um mês de estocagem.

### 4.1. Avaliação da necessidade do uso de encapsulantes

Na secagem da suspensão de esporos sem a utilização de encapsulantes não foi possível recolher um pó seco no coletor, pois o material injetado ficou aderido às paredes da câmara de secagem e ao ciclone. O material resultante da secagem, que estava aderido às paredes do ciclone, foi removido com dificuldade, e apresentava aspecto gomoso e possuía alto teor de umidade. Com adição de maltodextrina, foi possível recolher um material em pó no coletor, com mais facilidade de ser removido, com menor umidade e mais fluido. Desta forma, estes experimentos apontaram a necessidade do uso de um encapsulante.

Boonyai, Bhandari e Howes (2004) comentam que a pegajosidade tem sido considerada o maior problema que afeta a qualidade e rendimento do produto na forma de pó durante as operações de processamento, especialmente durante a secagem e no manuseio do pó. Quando partículas insuficientemente secas aderem-se umas às outras ou às paredes do equipamento de secagem, ocorre redução na recuperação do produto, e degradação da sua qualidade.

Fato semelhante foi observado por Quek, Chok e Swedlund (2006), após secagem de suco de melancia em “spray dryer”, uma vez que a ausência de encapsulante não permitiu a recuperação do produto. Com a adição de maltodextrina as características do produto resultante melhoraram, e neste caso, ela atuou como adjuvante na secagem em “spray dryer”, uma vez que aumentou o rendimento do produto final. Os autores comentam que a adição de maltodextrina pode aumentar o conteúdo de sólidos totais na alimentação e desta forma, reduzir o conteúdo de umidade do produto.

Langrish, Chan e Kota (2007) também citam a adição de maltodextrina para prevenir a aderência de quantidades excessivas de produto em pó nas paredes do “spray dryer”. A aderência observada pode estar relacionada à formação de materiais amorfos acima de sua temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ). A presença de carboidratos de peso molecular mais alto, como maltodextrina, gomas e outros materiais encapsulantes, contribuem para auxiliar na estabilidade do sistema aumentando sua temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) (VALDUGA *et al.*, 2008). Segundo Bhandari e Howes (1999), uma alternativa para a secagem evitando-se tal fenômeno, é através da adição de aditivos de alto peso molecular, uma vez que estes possuem o efeito de aumentar a temperatura de transição vítrea do sistema.

#### **4.2. Avaliação do efeito das temperaturas de entrada e de saída do ar na umidade do pó e no nível de sobrevivência dos esporos**

A maior dificuldade com relação à secagem de esporos fúngicos se deve à obtenção de um material em pó com características de umidade desejáveis e, simultaneamente, a manutenção da viabilidade dos esporos após o processo de secagem e durante o seu período de estocagem.

Na secagem por “spray dryer”, altas temperaturas de entrada do ar são requeridas para a obtenção de um produto final na forma de pó com baixo teor de umidade, o que segundo Moore *et al.* (1996 apud HORACZEK; VIERNSTEIN, 2004, p.69), é mais adequado para estocagem prolongada dos esporos. Estes autores também recomendam valores de umidade de 4–5%. Em contrapartida, Horaczek e Viernstein (2004) e Hutter (1995 apud LARENA; MELGAREJO; DE CAL, 2004, p.605) afirmam que baixas temperaturas de saída do ar são necessárias para obtenção de altos níveis de sobrevivência dos esporos, uma vez

que, esta é conhecidamente o principal parâmetro na secagem de compostos termossensíveis, onde também podem ser incluídos os esporos fúngicos.

Desta forma, foram testadas diferentes combinações de temperatura de entrada e de saída do ar de secagem, para neste primeiro momento, estabelecer condições iniciais que permitissem obter material com teor de umidade baixo e com esporos viáveis. Os dados obtidos para os diferentes experimentos estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Nível de sobrevivência dos esporos e umidade do pó resultante dos experimentos iniciais.

| Temperatura (°C) |            | Viabilidade (%) |         | *Umidade | Nível de sobrevivência(%) <sup>a</sup> |
|------------------|------------|-----------------|---------|----------|--|
| Entrada (°C)     | Saída (°C) | *Antes          | *Depois |          |  |
| 100              | 55         | 29,4            | 23,2    | 7,18     | 79                                     |
| 120              | 65         | 42,6            | 18,1    | 6,62     | 42                                     |
| 140              | 70         | 39,8            | 7,8     | 5,62     | 20                                     |
| 170              | 70         | 25,3            | 5,0     | 5,65     | 20                                     |
| 190              | 90         | 72,7            | 0,0     | 4,86     | 0                                      |

\* Média dos experimentos conduzidos em triplicata

a - Quociente dos conídios germinados antes (viabilidade antes) e após (viabilidade depois) o processo de secagem (HORACZEK; VIERNSTEIN, 2004)

Apesar de a melhor condição de processo com relação à remoção da massa de água ter sido a 190/90°C de temperatura de entrada e de saída, respectivamente, a que proporcionou maior nível de sobrevivência dos esporos foi a condição 100/55°C .

Os experimentos 140/70°C e 170/70°C de temperatura de entrada e de saída, respectivamente, originaram pós com umidade semelhante e mesmo nível de sobrevivência dos esporos, sugerindo uma relação entre a temperatura de saída do produto com o nível de sobrevivência dos esporos.

Diante disto, foram conduzidos experimentos com a temperatura de entrada do ar fixa em 120°C, variando-se as temperaturas de saída (Tabela 10), a fim de avaliar o efeito da temperatura de saída na umidade do produto final e no nível de sobrevivência dos esporos.

Tabela 10 - Nível de sobrevivência dos esporos e umidade do pó resultante dos experimentos para avaliação do efeito da temperatura de saída do ar.

| Temperatura (°C) |            | Viabilidade (%) |         | *Umidade | Nível de sobrevivência(%) <sup>a</sup> |
|------------------|------------|-----------------|---------|----------|--|
| Entrada (°C)     | Saída (°C) | *Antes          | *Depois |          |  |
| 120              | 55         | 28,2            | 26,2    | 7,70     | 93                                     |
| 120              | 60         | 33,0            | 19,7    | 6,82     | 60                                     |
| 120              | 65         | 42,6            | 18,1    | 6,62     | 42                                     |

\* Média dos experimentos conduzidos em triplicata

a - Quociente dos conídios germinados antes (viabilidade antes) e após (viabilidade depois) o processo de secagem (HORACZEK; VIERNSTEIN, 2004)

Pelos dados obtidos, verificou-se que tanto a umidade dos produtos da secagem quanto a viabilidade dos esporos apresentaram uma relação inversa com a temperatura de saída. Este fato está de acordo com Horaczek e Viernstein (2004), que em seu trabalho também relataram que a temperatura de saída foi fundamental para a obtenção de esporos viáveis de *Beauveria brongniartii* e *Metarhizium anisopliae*.

O melhor resultado com relação ao nível de sobrevivência foi o do teste conduzido com temperatura de saída do ar de 55°C, a qual foi escolhida para os experimentos seguintes.

Para a avaliação do efeito da temperatura de entrada na umidade do pó obtido após a secagem e no nível de sobrevivência dos esporos, realizaram-se experimentos variando-se a temperatura de entrada do ar de secagem e mantendo a temperatura de saída do ar fixa em 55°C, para todos os testes (Tabela 11).

Tabela 11 - Nível de sobrevivência dos esporos e umidade do pó resultante dos experimentos para avaliação do efeito da temperatura de entrada do ar.

| Temperatura (°C) |            | Viabilidade (%) |         | *Umidade | Nível de sobrevivência(%) <sup>a</sup> |
|------------------|------------|-----------------|---------|----------|--|
| Entrada (°C)     | Saída (°C) | *Antes          | *Depois |          |  |
| 100              | 55         | 29,4            | 23,2    | 7,18     | 79                                     |
| 110              | 55         | 59,7            | 48,0    | 7,42     | 80                                     |
| 120              | 55         | 28,2            | 26,2    | 7,70     | 93                                     |
| 140              | 55         | 22,8            | 21,8    | 9,04     | 96                                     |
| 160              | 55         | 52,0            | 33,1    | 11,31    | 64                                     |

\* Média dos experimentos conduzidos em triplicata

a - Quociente dos conídios germinados antes (viabilidade antes) e após (viabilidade depois) o processo de secagem (HORACZEK; VIERNSTEIN, 2004)

Com a elevação da temperatura de entrada do ar de 100 a 160°C, observou-se aumento do teor de umidade dos pós resultantes. Nesse caso, a vazão de alimentação da suspensão foi um parâmetro determinante na umidade do pó. Isso ocorreu devido à necessidade de se aumentar a vazão, com a elevação da temperatura de entrada, para a manutenção da temperatura de saída em 55°C. Büchi (2007) explica que quanto maior a alimentação de solução, maior é a energia necessária para evaporar a água das gotas transformando-as em partículas. Dessa forma, o aumento da umidade residual dos pós pode ser explicado pelo fato de o aumento da temperatura de entrada não ter sido proporcional ao aumento da vazão de alimentação, em termos de fornecimento de energia para remoção de água das gotas da suspensão.

Do experimento com temperatura de entrada de 100 até o de 140°C, observou-se relação direta entre a umidade do material final da secagem e o nível de sobrevivência dos esporos, enquanto no de 160°C, apesar da umidade elevada do pó, o nível de sobrevivência foi menor. Provavelmente, para essa temperatura de entrada, a quantidade de encapsulante adicionada não foi suficiente para proteger os esporos do ar quente durante a secagem.

#### **4.3. Avaliação da eficiência de agentes encapsulantes na secagem de *T. harzianum* LCB47**

Trabalhando-se com as mesmas condições de secagem, maltodextrina, amido e goma arábica foram os encapsulantes mais eficientes com relação a manutenção da viabilidade dos esporos de *T. harzianum* durante a secagem por “spray dryer”, resultando em níveis de sobrevivência de 79, 86 e 93%, respectivamente (Figura 6).

O melhor resultado foi obtido com a goma arábica, com nível de sobrevivência dos esporos de 93%, contra 47% obtido utilizando-se polivinilpirrolidona 40T, seguido de leite em pó integral (48%), que apresentaram-se como os encapsulantes menos adequados com relação a manutenção da viabilidade inicial dos esporos de *T. harzianum* LCB47 (Figura 6).

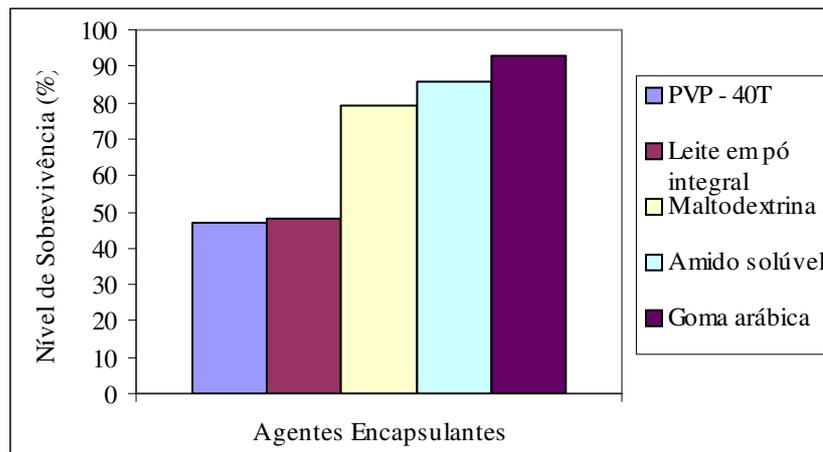


Figura 6 - Nível de sobrevivência dos esporos encapsulados com diferentes agentes encapsulantes.

Este resultado foi semelhante aos de Krishnan, Bhosale e Singhal (2005) e Kanakdande, Bhosale e Singhal (2007), que ao trabalharem com microencapsulação de oleorresina de cardamomo e de cominho, respectivamente, observaram que goma arábica foi o melhor agente encapsulante quando comparado com maltodextrina e amido modificado.

A Figura 7 ilustra as amostras resultantes de cada experimento.

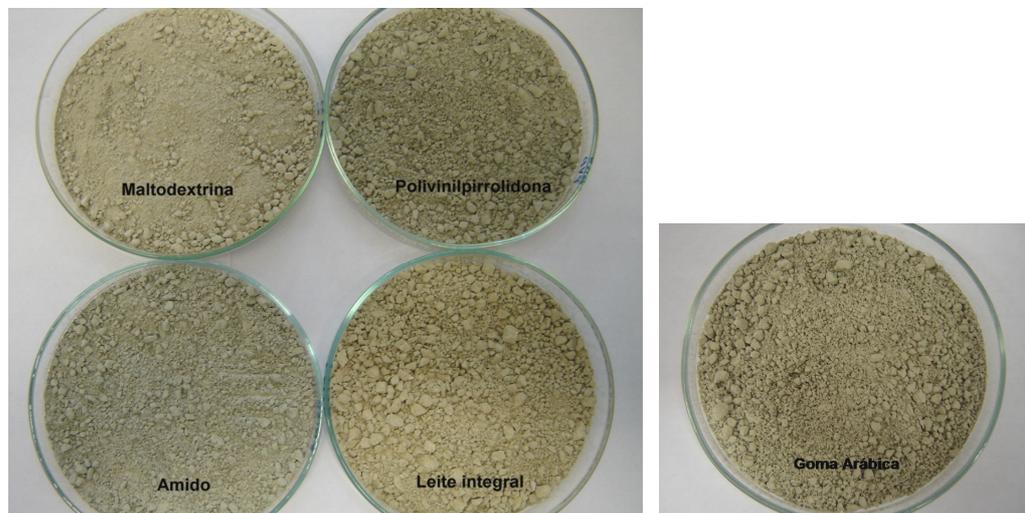


Figura 7 - Produtos em pó obtido dos experimentos com os diferentes tipos de encapsulante.

Como maltodextrina, amido e goma arábica se apresentaram como os melhores encapsulantes, realizou-se um teste para avaliar se haveria alguma relação ente a capacidade calorífica do encapsulante e os níveis de sobrevivência dos esporos.

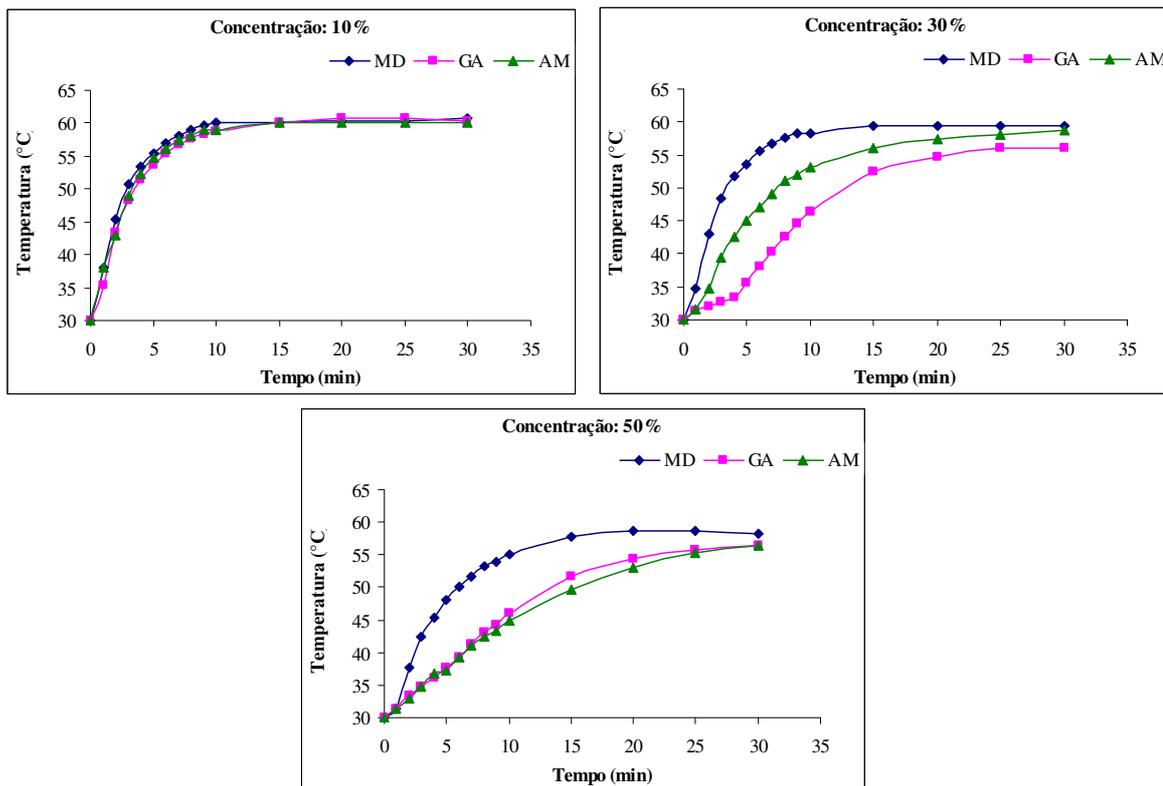


Figura 8 - Curva da variação da temperatura das soluções com 10, 30 e 50% de encapsulante, com o tempo. Os encapsulantes são maltodextrina DE 10 (MD), goma arábica (GA) e amido solúvel (AM).

Através dos dados mostrados na Figura 8, nas soluções preparadas na concentração de 10%, não se verificou grande diferença entre os comportamentos das curvas dos diferentes agentes encapsulantes testados.

Nas concentrações de 30 e 50%, a maltodextrina foi a que se aqueceu mais rapidamente, indicando que apresenta a menor capacidade calorífica, enquanto a goma arábica foi a que se aqueceu mais lentamente na concentração de 30%, apresentando, portanto, maior  $C_p$ .

Na concentração de 50%, amido e goma arábica apresentaram curvas de aquecimento semelhantes, entretanto é inviável o uso da solução de amido nessa concentração, por ser muito viscosa, e depois de resfriada, forma um gel, não permitindo sua injeção no atomizador do “spray dryer”. Mesmo em menores concentrações, as soluções de amido apresentam dificuldades operacionais, uma vez que necessitam ser aquecidas até 80-90°C para completa solubilização do amido, e em seguida resfriadas, para então ser adicionadas à suspensão de esporos que se deseja desidratar.

Goma arábica apresentou maior  $C_p$  (Figura 8) ao mesmo tempo em que foi o encapsulante que resultou em maior nível de sobrevivência dos esporos (Figura 6). Verificou-

se, dessa forma, relação entre a capacidade calorífica do encapsulante e sua capacidade de proteger os esporos da ação do calor, permitindo altos níveis de sobrevivência dos esporos.

Apesar de a goma arábica ter se mostrado inicialmente mais eficiente com relação ao nível de sobrevivência dos esporos, é a matéria-prima mais cara. Comparando custos de mercado, para aquisição de sacos de 25 kg em distribuidora de produtos químicos de Fortaleza/CE, em agosto de 2008, a cotação obtida foi a seguinte: amido de milho: R\$1,40/kg, maltodextrina: R\$2,75/kg, e goma arábica: R\$ 13,91/kg (US\$ 1,00 equivalia R\$ 1,60) mais frete, já que este produto é importado. Por isso, os experimentos de avaliação de parâmetros e estudo das melhores condições de secagem, foram realizados com a maltodextrina.

#### **4.4. Influência da concentração de encapsulante e da temperatura de entrada no nível de sobrevivência dos esporos, na umidade e na atividade de água do pó final**

Nesta etapa, procurou-se otimizar o processo de atomização para a obtenção de pós com maior viabilidade dos esporos fúngicos. Para tanto, avaliou-se por meio de planejamento estatístico o efeito da temperatura de entrada e concentração de encapsulante no nível de sobrevivência dos esporos e na umidade e atividade de água do material em pó resultante da secagem.

Maltodextrina foi escolhida para uso como encapsulante por ter proporcionado níveis de sobrevivência dos esporos elevados, pelo seu baixo custo e por sua fácil solubilização e operacionalização no preparo da suspensão. Já a goma arábica, apesar de ter sido responsável pelo maior nível de sobrevivência, não foi escolhida por ser a mais cara. O amido, por sua vez, mesmo tendo resultado em nível de sobrevivência maior do que na secagem utilizando maltodextrina, não foi utilizado por sua dificuldade operacional, com relação a sua solubilização.

Trabalhos envolvendo secagem, em “spray dryer”, de esporos de fungos utilizados no controle biológico, relatam baixos níveis de sobrevivência dos esporos (abaixo de 50%) (GUIJARRO *et al.*, 2006; LARENA; MELGAREJO; DE CAL, 2003; LARENA *et al.*, 2003). Dessa forma, atomização, utilizando-se maltodextrina como encapsulante, é uma opção viável para a desidratação de esporos de *T. harzianum* LCB47, uma vez que altos níveis de sobrevivência foram observados (Tabela 12).

Tabela 12 - Nível de sobrevivência dos esporos, e umidade e atividade de água do pó resultante das condições de secagem do planejamento experimental.

| Temperatura de entrada (°C) | Teor de encapsulante (%) | Viabilidade (%) |         | Nível de sobrevivência (%) <sup>a</sup> | *Umidade (%) | Aw    |
|-----------------------------|--------------------------|-----------------|---------|---|--------------|-------|
|                             |                          | *Antes          | *Depois |   |              |       |
| 120                         | 6                        | 26,0            | 20,0    | 77                                      | 7,67         | 0,410 |
| 120                         | 10                       | 26,3            | 24,3    | 92                                      | 8,12         | 0,500 |
| 160                         | 6                        | 30,3            | 20,3    | 67                                      | 10,69        | 0,610 |
| 160                         | 10                       | 27,0            | 25,0    | 93                                      | 11,16        | 0,620 |
| 112                         | 8                        | 63,7            | 40,7    | 64                                      | 7,16         | 0,448 |
| 168                         | 8                        | 34,7            | 33,0    | 95                                      | 11,37        | 0,617 |
| 140                         | 5,2                      | 43,3            | 35,0    | 81                                      | 9,69         | 0,507 |
| 140                         | 10,8                     | 37,7            | 35,7    | 95                                      | 8,78         | 0,549 |
| 140                         | 8                        | 21,7            | 20,0    | 92                                      | 9,38         | 0,543 |
| 140                         | 8                        | 24,0            | 23,7    | 99                                      | 8,70         | 0,483 |

\* Média dos experimentos conduzidos em triplicata

a - Quociente dos conídios germinados antes (viabilidade antes) e após (viabilidade depois) o processo de secagem (HORACZEK; VIERNSTEIN, 2004)

Pela Tabela 12 observou-se que em condições de maior teor de encapsulante, menor foi o efeito da temperatura de entrada do ar no nível de sobrevivência dos esporos. Quando o teor de maltodextrina adicionado à suspensão de esporos foi de 6%, o aumento da temperatura de entrada do ar de 120°C para 160°C resultou em redução de 13% no nível de sobrevivência, enquanto com 10% de maltodextrina, para mesma variação de temperatura, o nível de sobrevivência dos esporos se manteve estável. Este fato indica a capacidade do encapsulante de proteger os esporos do calor durante a secagem, o que reduz a perda da sua viabilidade. Isso foi observado porque, apesar de não significativo a 5% de significância, o fator linear do teor de encapsulante foi o mais importante na determinação da resposta em estudo, com nível de confiança de aproximadamente 89%; e porque este fator afeta positivamente o nível de sobrevivência dos esporos (Tabela 13).

Tabela 13 - Dados estatísticos com relação ao nível de sobrevivência dos esporos.

| Fator                             | Efeito     | Erro padrão | p        |
|-----------------------------------|------------|-------------|----------|
| Média/interação                   | 95,500000  | 7,367172    | 0,000204 |
| (1)Temperatura de entrada (°C)(L) | 8,710155   | 7,367172    | 0,302569 |
| Temperatura de entrada (°C)(Q)    | -16,750000 | 9,745852    | 0,160798 |
| (2)Teor de encapsulante (%) (L)   | 15,199747  | 7,367172    | 0,108063 |
| Teor de encapsulante (%) (Q)      | -8,250000  | 9,745852    | 0,444993 |
| 1L × 2L                           | 5,500000   | 10,418754   | 0,625501 |

(L) Fator linear, (Q) Fator quadrático

Com relação à temperatura de entrada do ar, apenas seu fator quadrático se mostrou importante na determinação do nível de sobrevivência, com nível de confiança de 84%. O coeficiente de explicação do modelo ( $R^2$ ) foi de 69,0%, sendo considerado baixo. Portanto o gráfico correspondente ao modelo para o nível de sobrevivência (Figura 9) foi apresentado apenas como indicador geral de tendência. Esse baixo valor de  $R^2$  pode ser explicado pela influência de outros fatores, que não o teor de encapsulante e a temperatura de entrada do ar de secagem, no nível de sobrevivência; ou pelo fato de o modelo ter outros efeitos além dos lineares e quadráticos.

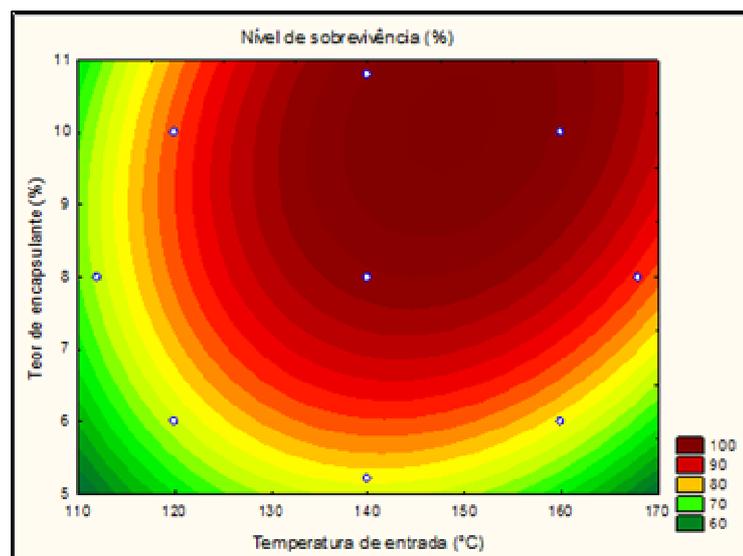


Figura 9 - Curvas de contorno referentes ao nível de sobrevivência dos esporos após a secagem da suspensão, com relação à variação da temperatura de entrada do ar de secagem e do teor de encapsulante.

Pela Figura 9, as condições 140°C/10,8%, 140°C/8,0% e 160°C/10% de temperatura de entrada e teor de encapsulante, respectivamente, resultam em esporos com nível de sobrevivência maior que 90%, entretanto a melhor condição é a 140°C/8,0%, pois é a que utiliza menor temperatura de entrada e menor teor de encapsulante.

A um nível de significância de 5%, o efeito linear da temperatura de entrada do ar de secagem foi o único parâmetro significativo na umidade final do pó obtido, apresentando nível de confiança de 100% (Tabela 14).

A temperatura de saída do produto é controlada pelo ajuste de parâmetros como o fluxo de ar e a aspiração, que nesse caso foi constante em todos os experimentos, e a vazão de alimentação da bomba, que foi o parâmetro variável. Dessa forma, foi necessária uma maior vazão de suspensão de esporos (70%) para a temperatura de entrada do ar de 160°C do que para a de 120°C (35%), para a obtenção de produto com temperatura final de 55°C em ambos os experimentos. Por isso, na condição de maior temperatura de entrada do ar, a remoção de água da suspensão na forma de gotículas foi menor, resultando em maior umidade residual. Isso explica o efeito positivo entre a temperatura de entrada e a umidade do pó (Tabela 14).

Tabela 14 - Dados estatísticos com relação à umidade do produto final.

| <b>Fator</b>                      | <b>Efeito</b> | <b>Erro padrão</b> | <b>p</b> |
|-----------------------------------|---------------|--------------------|----------|
| Média/interação                   | 9,040000      | 0,334034           | 0,000011 |
| (1)Temperatura de entrada (°C)(L) | 3,003460      | 0,334034           | 0,000847 |
| Temperatura de entrada (°C)(Q)    | 0,305000      | 0,441885           | 0,528013 |
| (2)Teor de encapsulante (%)(L)    | -0,091734     | 0,334034           | 0,797206 |
| Teor de encapsulante (%)(Q)       | 0,275000      | 0,441885           | 0,567442 |
| 1L × 2L                           | 0,010000      | 0,472395           | 0,984125 |

(L) Fator linear, (Q) Fator quadrático

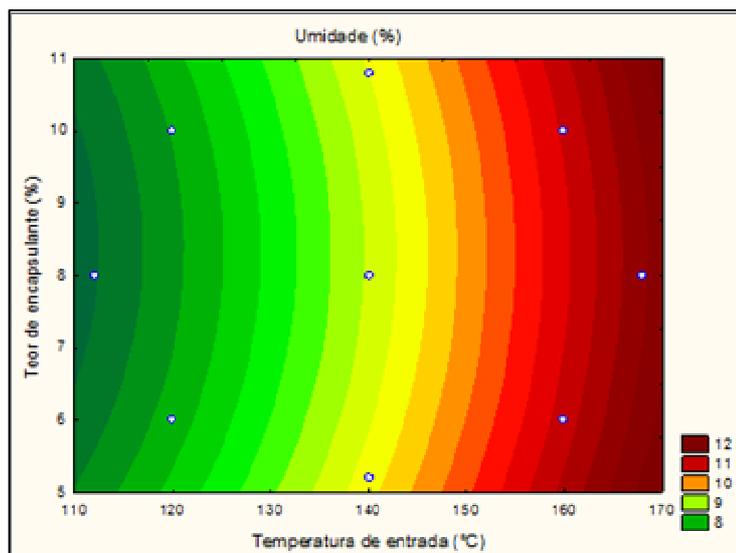


Figura 10 - Curvas de contorno referentes à umidade do pó obtido após a secagem da suspensão, com relação à variação da temperatura de entrada do ar de secagem e do teor de encapsulante.

O teor de encapsulante não foi um parâmetro significativo, a 5% de significância, com relação à umidade do produto final (Tabela 14). O modelo explicou 95,3% da variação total das respostas, possibilitando a construção de curvas de contorno para a estimação de dados (Figura 10).

De acordo com a Figura 10, a região que permite um produto final com menor umidade é a de temperatura de entrada de 110°C e teor de encapsulante entre 7 e 10%, sendo diferente da região para obtenção de maiores níveis de sobrevivência (Figura 9). Esse fato demonstra a dificuldade de se conseguir um pó com baixo teor de umidade e, ao mesmo tempo, com esporos com altos níveis de sobrevivência.

Larena, De Cal e Melgarejo (2007) citam trabalhos onde o conteúdo de umidade elevado do produto pode ter sido a causa de mudanças ocorridas na viabilidade durante a estocagem. Alta umidade leva o microrganismo a quebrar a dormência antecipadamente e propicia o crescimento de contaminantes. Também citam que esporos de alguns fungos com baixos níveis de umidade tiveram os melhores resultados com relação à sobrevivência.

Quanto à atividade de água, o fator linear temperatura de entrada do ar de secagem foi o único significativo a 5% de significância, apresentando nível de confiança de 99,8%, e correlação positiva com a resposta analisada (Tabela 15). Apesar de não significativo, o teor de encapsulante linear foi um fator importante na determinação da atividade de água do produto final, com nível de confiança de aproximadamente 90%. O modelo explicou 93,9% da variação total das respostas, possibilitando a construção de curvas de contorno (Figura 11), para se ter uma tendência dos valores de atividade de água.

Tabela 15 - Dados estatísticos com relação à atividade de água do produto final.

| Fator                             | Efeito    | Erro padrão | p        |
|-----------------------------------|-----------|-------------|----------|
| Média/interação                   | 0,513000  | 0,018945    | 0,000011 |
| (1)Temperatura de entrada (°C)(L) | 0,139751  | 0,018945    | 0,001800 |
| Temperatura de entrada (°C)(Q)    | 0,021875  | 0,025062    | 0,432014 |
| (2)Teor de encapsulante (%) (L)   | 0,039849  | 0,018945    | 0,103253 |
| Teor de encapsulante (%) (Q)      | 0,017375  | 0,025062    | 0,526282 |
| 1L × 2L                           | -0,040000 | 0,026792    | 0,209734 |

(L) Fator linear, (Q) Fator quadrático

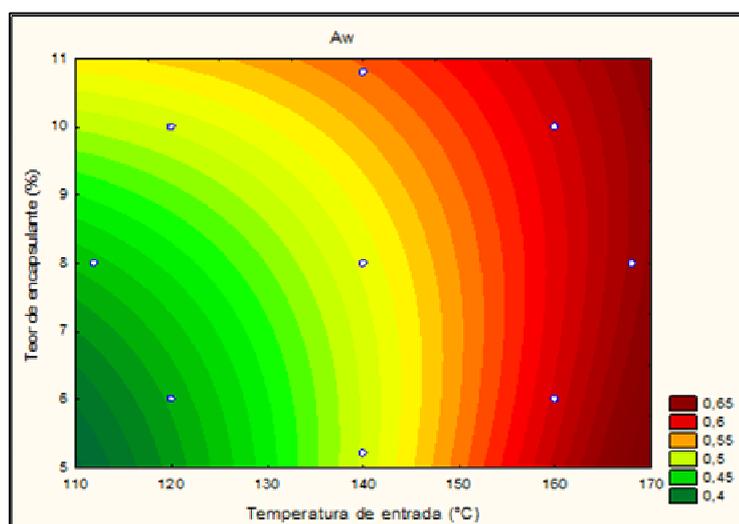


Figura 11 - Curvas de contorno referentes à atividade de água do pó obtido após a secagem da suspensão, com relação a variação da temperatura de entrada do ar de secagem e do teor de encapsulante.

Pela Figura 11, os menores valores de atividade de água no produto final seriam alcançados se o processo fosse conduzido à 110°C de temperatura de entrada e entre 5 e 6% de encapsulante.

Comparando-se a umidade e a atividade de água do pó resultante, verifica-se que o fator linear da temperatura do ar de secagem foi muito importante tanto na umidade como na atividade de água do produto final, com maior nível de confiança (100%) para a umidade. Observou-se que o aumento da umidade do produto não resultou em aumento proporcional da atividade de água, ou seja, da água livre disponível para a atividade microbiológica, enzimática ou química (FELLOWS, 2006).

#### 4.5. Teste de estabilidade dos esporos à estocagem

Durante a busca para estabelecer condições iniciais para obtenção de esporos viáveis, realizou-se um teste para avaliar a retenção da viabilidade dos esporos durante um mês de estocagem. Isso foi feito através do armazenamento do pó resultante da desidratação dos esporos na condição de 100/55°C (Tabela 4) onde maltodextrina foi utilizada como encapsulante. A Figura 12 mostra os dados obtidos.

Os esporos de *T. harzianum* LCB47 armazenados sob refrigeração foram os que se mantiveram mais estáveis durante o período do armazenamento, mantendo 100% de viabilidade ao final da estocagem. Em contrapartida, observou-se 28% de redução da viabilidade, quando a estocagem ocorreu à temperatura ambiente (Figura 12).

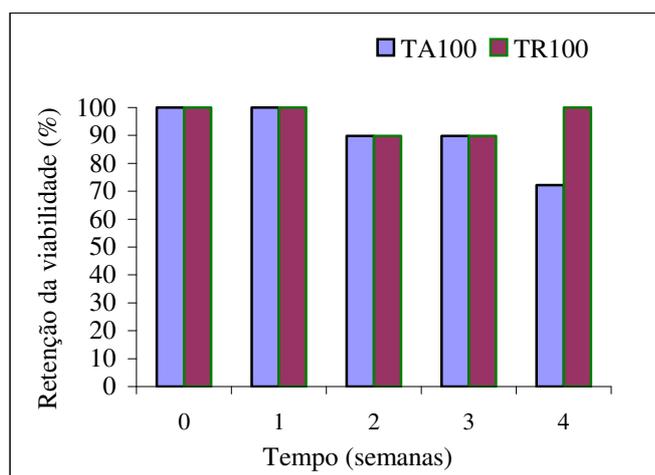


Figura 12 - Retenção da viabilidade dos esporos armazenados durante um mês nas seguintes condições: TA100: Temperatura de secagem de 100/55°C e armazenamento em temperatura ambiente, TR100: Temperatura de secagem de 100/55°C e armazenamento sob refrigeração.

Apesar de os esporos terem mantido sua viabilidade durante a estocagem quando armazenados sob refrigeração, segundo Larena, De Cal e Melgarejo (2007), o produto biológico para uso no controle biológico deve ter uma vida de prateleira de pelo menos 12 a 18 meses, sem refrigeração, para ser comercialmente aceitável.

---

---

## **5. CONCLUSÕES**

---

---

## 5. CONCLUSÕES

É necessária a adição de encapsulante à suspensão de esporos para a recuperação de material na forma de pó no coletor após a secagem em “spray dryer”.

A temperatura de saída é o fator mais importante para a obtenção de esporos viáveis após a atomização, e foi a temperatura de saída de 55°C que permitiu maiores níveis de sobrevivência dos esporos de *T. harzianum* LCB47.

Há uma relação inversamente proporcional entre a temperatura de saída e a umidade dos produtos da secagem e a viabilidade dos esporos.

Maltodextrina, amido e goma arábica foram os encapsulantes mais eficientes com relação à manutenção da viabilidade dos esporos de *T. harzianum* LCB47 durante a secagem por “spray dryer”.

Temperatura de entrada de 140°C; temperatura de saída de 55°C; vazão de ar comprimido de 742 L.h<sup>-1</sup>; capacidade de alimentação da bomba de 55%; velocidade do aspirador de 100%; e adição de 4 vezes o valor de sólidos solúveis totais de maltodextrina DE10 como encapsulante foram as melhores condições para a obtenção de material em pó contendo esporos viáveis de *Trichoderma harzianum* LCB47. Nestas condições o nível de sobrevivência médio durante o processo de atomização foi de 96%.

A temperatura refrigerada foi a mais adequada para a retenção da estabilidade de esporos de *T. harzianum* LCB47 durante um mês de estocagem.

## SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Realizar um estudo dos efeitos simultâneos da temperatura de entrada, da temperatura de saída e do teor de encapsulante no nível de sobrevivência dos esporos, e na umidade e atividade de água do produto em pó resultante da desidratação.

Avaliar os efeitos simultâneos dos parâmetros do atomizador (temperatura de entrada e de saída do ar, vazão de alimentação da suspensão, velocidade do aspirador e fluxo de ar comprimido), a fim de se estabelecer condições de secagem que resultem em esporos com altos níveis de sobrevivência e produto com baixas umidade e atividade de água.

Testar o uso de maltodextrinas com níveis diferentes de dextrose equivalente (DE).

Testar misturas, em várias proporções, de encapsulantes com diferentes características de solubilidade, viscosidade, capacidade emulsificante e de formação de filmes; visando um processo de secagem com custos reduzidos e esporos com altos níveis de sobrevivência.

Testar o uso de goma de cajueiro como encapsulante, como alternativa ao uso de maltodextrinas e de goma arábica.

Estocar os esporos de *Trichoderma harzianum* LCB47 por um período maior de tempo (6 a 12 meses), à temperatura ambiente, para avaliação da retenção da sua viabilidade durante o armazenamento. Nesse contexto, analisar o efeito da umidade e da atividade de água do produto na retenção da viabilidade dos esporos.

Melhorar a formulação em pó dos esporos, através da adição de substâncias que melhorem as propriedades físicas do pó, como antiagregantes, e de substâncias que auxiliem na retenção da viabilidade dos esporos durante a estocagem, como antioxidantes, por exemplo, permitindo armazenamento por longos períodos de tempo.

Analisar os esporos fúngicos, antes e após a secagem, por meio de microscopia de varredura eletrônica, a fim de se definir a melhor condição de secagem com relação à manutenção da estrutura dos esporos.

Testar outras linhagens de fungo do gênero *Trichoderma*, e outros fungos utilizados no controle biológico.

Realizar testes em campo com o produto em pó para avaliar sua eficiência no controle biológico.

## REFERÊNCIAS

ABDEL-FATTAH, G. M.; SHABANA, Y. M.; ISMAIL, A. E.; RASHAD, Y. M. *Trichoderma harzianum*: a biocontrol agent against *Bipolaris oryzae*. **Mycopathologia**, v.164, p.81-89, 2007.

ALONSO, L. F. T. **Algoritmos de seleção e dimensionamento de secadores**. Campinas, SP, 2001. 241 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas.

ATHAYDE, A. C. R.; FERREIRA, U. L.; LIMA, E. A. L. A. Fungos entomopatogênicos: Uma alternativa para o controle do carrapato bovino – *Boophilus microplus*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.21, p.12-15, jul/ago, 2001.

AZEREDO, H. M. C. Encapsulation: applications to food technology. **Alimentos e Nutrição**, v.16, n.1, p.89-97, jan./mar. 2005.

AZEREDO, H. M. C.; BRITO, E. S.; BRUNO, L. M.; PINTO, G. A. S. Métodos de conservação de alimentos. In: AZEREDO, H. M. C. (Ed.). **Fundamentos de Estabilidade de Alimentos**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2004. p.97-128.

AZEVEDO, J. L. Fungos: Genética e melhoramento de fungos na biotecnologia. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.01, p.12-15, n.1, maio., 1997.

BARROS, F. A. R.; STRINGHETA, P. C. Microencapsulamento de antocianinas: Uma alternativa para o aumento de sua aplicabilidade como ingrediente alimentício. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.36, n.36, p.18-24, jan/jun, 2006.

BHANDARI, B.; HOWES, T. Implication of glass transition for the drying and stability of dried foods. **Journal of Food Engineering**, v.40, p.71-79, 1999.

BHANU PRAKASH, G. V. S.; PADMAJA, V.; SIVA KIRAN, R. R. Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v.99, p.1530-1537, 2008.

BIER, J. W.; SPLITTSTOESSER, D. F.; TORTORELLO, M. L. Microscopic methods. In: **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: APHA - American Public Health Association, 2001, p. 40.

BLAKEMAN, J. P.; FOKKEMA, N. J. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. **Annual Review of Phytopathology**, v.20, p.167-192, 1982.

BOONYAI, P.; BHANDARI, B.; HOWES, T. Stickiness measurement techniques for food powders: A review. **Powder Technology**, v.145, p.34-46, 2004.

BÜCHI. **Manuel d'instructions atomisateur de séchage B-290**. 2005

BÜCHI LABORTECHNIK AG. Training papers - Spray drying. Disponível em: <[http://www.buchi.com/Spray-Drying.69.0.html?&no\\_cache=1&file=308&uid=2283](http://www.buchi.com/Spray-Drying.69.0.html?&no_cache=1&file=308&uid=2283)>. Acesso em: 15. jan. 2007.

CAVALCANTE, R. S.; LIMA, H. L. S.; PINTO, G. A. S.; GAVA, C. A. T.; RODRIGUES, S. Effect of moisture on *Trichoderma* conidia production on corn and wheat bran by solid state fermentation. **Food Bioprocess Technology**, v.1, p.100–104, 2008.

COLLARES, F. P. **Desprendimento de filmes de pastas alimentícias durante a secagem sobre superfícies de sólidos e sua relação com a Transição Vítre**a. Campinas, SP, 2001. 205 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas.

DAIÚTO, E. R.; CEREDA, M. P. Amido como suporte na desidratação por atomização e em microencapsulamento. In: CEREDA, M. P. (Coord.). **Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, 2003, v.3, cap. 16, p. 449-454.

ELAD, Y.; KAPAT, A. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. **European Journal of Plant Pathology**, v.105, p.177-189, 1999.

ELAD, Y.; ZIMAND, G.; ZAQS, Y.; ZURIEL, S.; CHET, I. Use of *Trichoderma harzianum* in combination or alternation with fungicides to control cucumber grey mould (*Botrytis cinerea*) under commercial greenhouse conditions. **Plant Pathology**, v.42, p.324-332, 1993.

FARIA, M. R.; MAGALHÃES, B. P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil: Situação atual e perspectivas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.22, p.18-21, set/out, 2001.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e prática**. 2ª ed, Porto Alegre: Artmed, 2006. p. 59.

FRANCESCHINI, M.; GUIMARÃES, A. P.; CAMASSOLA, M.; FRAZZON, A. P.; BARATTO, C. M.; KOGLER, V.; SILVA, M. V.; DUTRA, V.; NAKAZOTO, L.; CASTRO, L.; SANTI, L.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Biotecnologia aplicada ao controle biológico. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.23, p.32-37, 2001.

FROYD, J.D. Can synthetic pesticides be replaced with biologically-based alternatives? An industry perspective. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.19, p.192–195, 1997.

GALLETTI, S.; BURZI, P. L.; CERATO, C.; MARINELLO, S.; SALA, E. *Trichoderma* as a potential biocontrol agent for *Cercospora* leaf spot of sugar beet. **BioControl**, v.53, p.917-930, 2008.

GAVA, C. A. T. **Projeto de pesquisa:** Desenvolvimento de formulações de biofungicidas com alta estabilidade para o manejo integrado de doenças de fruteiras tropicais. Petrolina-PE, 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**, v.40, p. 1107–1121, 2007.

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

HARMAN, G. E.; HOWELL, C. H.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews/Microbiology**, v.2, p.43-56, 2004.

HORACZEK, A.; VIERNSTEIN, H. Comparison of three commonly used drying technologies with respect to activity and longevity of aerial conidia of *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. **Biological Control**, v.31, p.65-71, 2004.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas: Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. IAL: São Paulo, 2004. 4. ed. 1004 p.

JONES, E. E.; WEBER, F. J.; OOSTRA, J.; RINZEMA, A.; MEAD, A.; WHIPPS, J. M. Conidial quality of the biocontrol agent *Coniothyrium minitans* produced by solid-state cultivation in a packed-bed reactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v34, p.196-207, 2004.

KANAKDANDE, D.; BHOSALE, R.; SINGHAL, R. S. Stability of cumin oleoresin microencapsulated in different combination of gum arabic, maltodextrin and modified starch. **Carbohydrate Polymers**, v.67, p.536–541, 2007.

KRISHNAN, S.; BHOSALE, R.; SINGHAL, R. S. Microencapsulation of cardamom oleoresin: Evaluation of blends of gum arabic, maltodextrin and a modified starch as wall materials. **Carbohydrate Polymers**, v.61, p.95–102, 2005.

LANGRISH, T. A. G.; CHAN, W. C.; KOTA, K. Comparison of maltodextrin and skim milk wall deposition rates in pilot-scale spray dryer. **Powder Technology**, v.179, p.84-89, 2007.

LARENA, I.; DE CAL, A.; LIÑÁN, M.; MELGAREJO, P. Drying of *Epicoccum nigrum* conidia for obtaining a shelf-stable biological product against brown rot disease. **Journal of Applied Microbiology**, v.94, p.508-514, 2003a.

LARENA, I.; DE CAL, A.; MELGAREJO, P. Effects of stabilizers on shelf-life of *Epicoccum nigrum* formulations and their relationship with biocontrol of postharvest brown rot by *Monilinia* of peaches. **Journal of Applied Microbiology**, v.102, p.570–582, 2007.

LARENA, I.; MELGAREJO, P.; DE CAL, A. Drying of conidia of *Penicillium oxalicum*, a biological control agent against *Fusarium* wilt of tomato. **Journal of Phytopathology**, v.151, p.600-606, 2003b.

LEITE, J. T. C. **Obtenção de extrato de inulina de chicória (*Cichorium intybus*) por abaixamento de temperatura e secagem por *spray dryer***. Campinas, SP, 2001. 155 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas.

MADENE, A.; JACQUOT, M.; SCHER, J.; DESOBRY, S. Flavour encapsulation and controlled release – a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v.41, p.1-21, 2007.

MAZUR, P.; WESTON, W. H. The effects of spray-drying on the viability of fungous spores. **Journal of Bacteriology**, v.71, p. 257-266, 1956.

MELO, I. S.; COSTA, F. G. Desenvolvimento de uma formulação granulada a base de *Trichoderma harzianum* para controle de fitopatógenos. **Comunicado Técnico**: Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna-SP, ago. 2005.

MOORE, D.; DOURO-KPINDOU, O. K.; JENKINS, N. E.; LOMER, C. J. Effects of moisture content and temperature on storage of *Metarhizium flavoviride* conidia. **Mycology Research**, v.6, p.51-61, 1996.

MORETTI, P. E. **Microbiologia: Fundamentos e Aplicações**. Disponível em: <<http://www.fam.br/microrganismos>>. Acesso em: 05. out. 2008.

PERELLÓ, A.; MORENO, V.; MÓNACO, C.; SIMÓN, M. R. Effect of *Trichoderma* spp. isolates for biological control of tan spot of wheat caused by *Pyrenophora tritici-repentis* under field conditions in Argentina. **BioControl**, v.53, p.895-904, 2008.

PLANETA orgânico. **Controle biológico**. Disponível em: <<http://www.planetaorganico.com.br/controle.htm>>. Acesso em: 30. jan. 2007.

QUEK, S. Y.; CHOK, N. K.; SWEDLUND, P. The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. **Chemical Engineering and Processing**, v.46, p.386–392, 2007.

RIBEIRO, A. P. S. **Produção de quitinases por fermentação por *Trichoderma* sp.** Campinas, SP, 2000. 63 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas.

SILVA, J. B. T.; MELLO, S. C. M. Utilização de *Trichoderma* no controle de fungos fitopatogênicos. **Documentos**: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília-DF, dez. 2007.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase por fermentação no estado sólido**. Curitiba, PR, 2005. 157f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

TSENG, S. C.; LIU, S. Y.; YANG, H. H.; LO, C. T.; PENG, K. C. Proteomic study of biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* ETS 323 in response to *Rhizoctonia solani*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.6914-6922, 2008.

VALDUGA, E.; LIMA, L.; PRADO, R.; PADILHA, F. F.; TREICHEL, H. Extração, secagem por atomização e microencapsulamento de antocianinas do bagaço de uva “Isabel (*Vitis labrusca*). **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.5, p.1568-1574, set./out., 2008.

VEGA, C.; ROOS, Y. H. Invited review: Spray-dried dairy and dairy-like emulsions – Compositional considerations. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.383-401, 2006.

VERMA, M.; BRAR, S. K.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y.; VALÉRO, J. R. Dissolved oxygen as principal parameter for conidia production of biocontrol fungi *Trichoderma viride* in non-Newtonian wastewater. **Journal of Industrial Microbiological Biotechnology**, v.33, p.941-952, 2006.

VERMA, M.; BRAR, S. K.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y.; VALÉRO, J. R. Starch industry wastewater as a substrate for antagonist, *Trichoderma viride* production. **Bioresource Technology**, v.98, p.2154-2162, 2007.

YE, S. D.; YING, S. H.; CHEN, C.; FENG, M. G. New solid-state fermentation chamber for bulk production of aerial conidia of fungal biocontrol agents on rice. **Biotechnological Letter**, v.28, p.799–804, 2006.

## ANEXOS

### ANEXO A - Composição dos meios de cultura

#### 1. Ágar Batata Dextrose (HiMedia)

| Ingredientes       | Gramas/litro |
|--------------------|--------------|
| Infusão de batatas | 200,00       |
| Dextrose           | 20,00        |
| Ágar               | 15,00        |

pH final (a 25°C):  $5,6 \pm 0,2$

#### 2. Meio de produção de inóculo

- 46,00 g de farelo de trigo
- 60 mL de solução de peptona 5,6%

#### 3. Meio de farelo de trigo

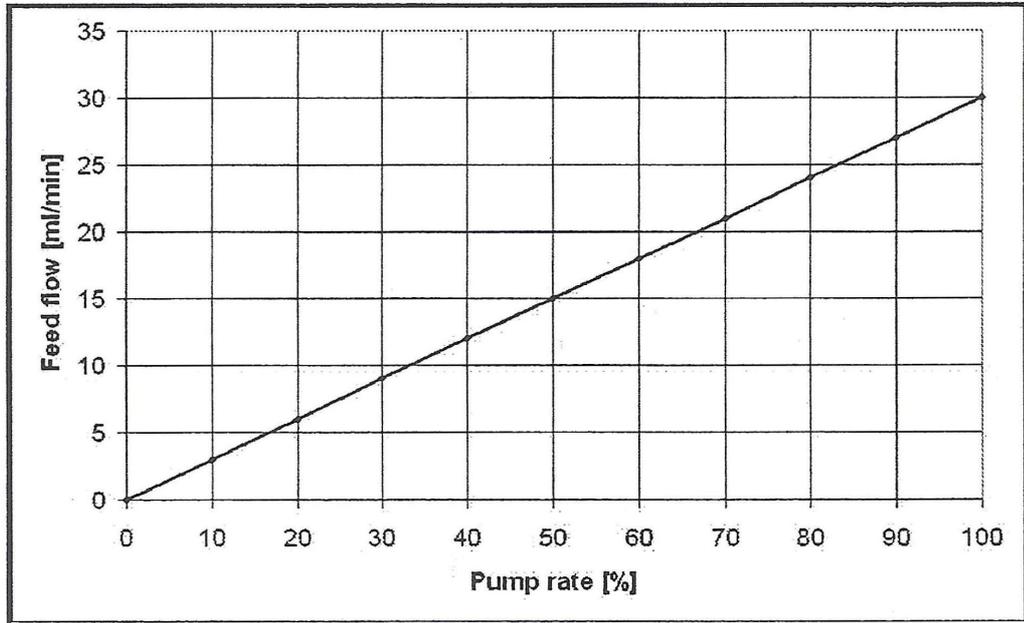
Para 120 g de meio:

- 40 g de farelo de trigo
- 80 mL de água destilada

#### 4. Meio Ágar Água (WA)

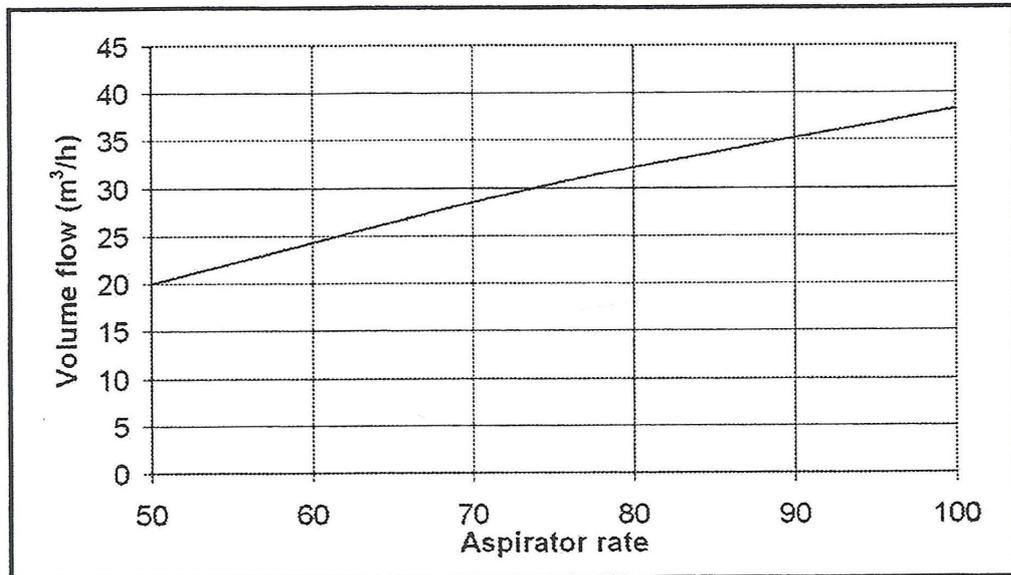
- 20 g de ágar bacteriológico (HiMedia)
- 10 µL de suspensão comercial concentrada de thiabendazole ( $485 \text{ g.L}^{-1}$ ) fornecido por Novartis Biociências S.A (Tecto SC)
- 1L de água destilada

ANEXO B - Correlação entre os valores percentuais indicados e a vazão de alimentação, em mL.h<sup>-1</sup>



FONTE: Büchi (2005)

ANEXO C - Correlação entre os valores percentuais indicados e o fluxo de volume, em  $\text{m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$



FONTE: Büchi (2005)