

4.03.01 - Farmácia / Farmacotecnia

MATRIZ ALGINATO/BENTONITA PARA ENCAPSULAÇÃO DE ENTOMOPATÓGENO - LIBERAÇÃO *IN VITRO* E ESTABILIDADEDiogo P. C. Batista^{1*}, Henrique F. Goulart², Antônio E. G. Santana³, Luciano A. M. Grillo⁴, Camila B. Dornelas⁵

- 1 Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Materiais do Centro de Tecnologia da UFAL
- 2 Professor/Pesquisador do Centro de Ciências Agrárias da UFAL
- 3 Professor/Pesquisador do Centro de Ciências Agrárias da UFAL
- 4 Professor/Pesquisador da Escola de Enfermagem e Farmácia da UFAL
- 5 Professora/Pesquisadora do PPGMat do Centro de Tecnologia da UFAL / Orientadora

Resumo:

Tendo em vista a grande demanda por práticas voltadas à responsabilidade ambiental (*ecofriendly*) para o controle de pragas, associada a susceptibilidade dos agentes biológicos normalmente utilizados para tal finalidade, um nanocompósito polimérico foi avaliado como matriz de encapsulação. *Beads* alginato/bentonita contendo conídios do entomopatógeno *Beauveria bassiana* ativo contra insetos-praga de palmáceas em associação com o feromônio de agregação Rincoforol foram preparados por técnicas de gelificação ionotrópica. Foi avaliada a suscetibilidade do fungo frente a exposição ao feromônio. Os produtos formulados foram avaliados quanto ao fator de esfericidade, tamanho de partículas, índice de intumescimento e a cinética de liberação *in vitro*. O PLN demonstrou grande potencial como matriz de encapsulação, resultando em melhorias nos parâmetros testados em comparação com o polímero isoladamente, além de proporcionar proteção ao bioativo frente a eventuais efeitos deletérios provocados pelo método de secagem e/ou a co-encapsulação com o feromônio.

Palavras-chave: Encapsulação de bioativo; Silicato lamelar; Nanocompósito polimérico.

Apoio financeiro: CAPES, CNPQ, FACEPE/CETENE, FINEP e FAPEAL.

Introdução:

Um dos maiores problemas enfrentados no agronegócio é a ocorrência de insetos-praga nos cultivos, ameaça constante que desponta como um desafio a produtores. O aplicação de inseticidas químicos convencionais na tentativa de controlar essas pragas leva a desequilíbrios biológicos pela morte de insetos úteis [1]. Produtos caracterizados como bioinseticidas geralmente são isentos destes efeitos, não afetando o meio ambiente bem como espécies importantes no ecossistema, além de preservar a saúde de consumidores. Produtos deste tipo contendo fungos entomopatogênicos como bioativo já são amplamente utilizados no agronegócio, no entanto, os ativos geralmente são muito sensíveis a fatores abióticos. Ainda, a falta de praticidade das formulações disponíveis no mercado associada a reduzida vida de prateleira dos produtos, dificultam a comercialização e restringem sua efetividade no Manejo Integrado de Pragas (MIP). Desta forma, técnicas de encapsulação são bastante interessantes para contornar tais problemas [2]. Formulações com matrizes poliméricas geralmente apresentam propriedades superiores a de produtos não formulados e são de essencial importância na manutenção da viabilidade dos microorganismos [3]. Um polímero bastante utilizado como sistema matricial para encapsulação de ativos é o alginato de sódio, um biopolímero hidrofílico biodegradável, que, embora dotado de diversas características desejáveis, apresenta-se como matriz muito porosa, de pobre resistência mecânica e instável frente a alguns compostos, a exemplo de cátions monovalentes. A combinação deste com outros compostos de características distintas pode resultar em melhorias estruturais, como ocorre nos nanocompósitos poliméricos [4]. Quando em combinação com argilas filossilicatadas, a exemplo da bentonita, recebem a denominação genérica de *Polymer-Layered Silicate Nanocomposite (PLN)*, que possuem lamelas cristalinas em escala nanométrica, organizadas bidimensionalmente umas sobre as outras. Além de incrementar as propriedades mecânicas, a bentonita proporciona efeito fotoprotetor [5]. Assim, o presente trabalho propõe a investigação do nanocompósito polimérico alginato-bentonita como matriz de encapsulação de um fungo entomopatogênico em formulação tipo *beads*.

Metodologia:**Microorganismo e meio de cultura**

O isolado CPATC032 foi repicado em placas de Petri contendo meio nutritivo BDA e mantidas em câmara de germinação (Solab, Brasil) a 28 (±1)°C adaptada com fotoperíodo de 12 horas. Suspensões foram obtidas a partir da raspagem de colônias com 10-14 dias inoculadas em água destilada contendo Tween 80® a 0,02%. O teste de suscetibilidade de *B. bassiana* frente ao Rincoforol foi realizado a partir da mistura direta da suspensão fúngica com o feromônio. Foram testadas como variáveis a proporção suspensão/feromônio e o tempo de

exposição. Quanto a proporção, o Rincoforol foi incorporado às suspensões em concentrações variando entre 2,5; 5; 10; 25 e 50%. Quanto ao tempo de exposição, alíquotas de cada mistura foram semeadas em placas de viabilidade contendo BDA como segue: imediatamente pós-mistura e após períodos de 1; 2 e 3 horas de contato suspensão/feromônio. A viabilidade foi testada entre 16 e 240 horas pós-semeio e comparada com uma suspensão-controle.

Formulações coencapsuladas

As formulações foram preparadas como já descrito em Batista et al. (2017) [6]. Uma solução aquosa de alginato de sódio em concentração final de 1% foi adicionada suspensão aquosa de bentonita sódica em diferentes concentrações, sendo designadas em função deste parâmetro, como AB0; AB2; AB4 e AB6. A estas matrizes foi incorporada uma suspensão fúngica contendo 10^8 con/mL e/ou Rincoforol. As matrizes foram extrudidas em cloreto de cálcio 0,25 M, resultando na gelificação ionotrópica do alginato e formação dos *beads* [3]. Estes permaneceram na solução de cloreto de cálcio por mais 30 minutos para incorporação de íons cálcio e enrijecimento de sua estrutura. Os *beads* foram separados, lavados para interrupção do processo de incorporação de cálcio e congelados à -14°C ($\pm 3^{\circ}\text{C}$), seguindo-se a liofilização dos mesmos. Formulações controle foram produzidas com o objetivo de comparar os parâmetros avaliados, como segue: 1) *Beads* compostos apenas pela matriz e o Rincoforol, mas sem o bioativo e; 2) *Beads* contendo os conídios fúngicos mas com ausência do feromônio.

Índice de intumescimento (Ii%)

O Ii% foi calculado a partir do aumento do peso médio de amostras do produto formulado após sua imersão em solução aquosa. A cada intervalo de 24 horas, os *beads* foram retirados, secos gentilmente entre folhas de papel filtro para retirada da água superficial e em seguida repesados para avaliação da capacidade de captação de água.

Liberção in vitro dos conídios

5 *beads* de cada amostra foram semeados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA e incubados em câmara de germinação. Os *beads* foram observados em períodos de tempo pré-determinados para verificação de germinação miceliana resultante da liberação do bioativo da matriz. As observações foram feitas com o auxílio de um estereoscópio binocular.

Resultados e Discussão:

Nos testes de suscetibilidade dos conídios ao Rincoforol, foi visto que houve uma grande queda na viabilidade para a maioria das suspensões. A primeira verificação foi realizada após 16 horas de semeio, tempo padrão para viabilidade de conídios de *B. bassiana*. Para os casos em que o crescimento do tubo germinativo não ocorreu neste período, seguiu-se a verificação diária até o período máximo de 240 horas pós-semeio. Nas maiores concentrações de feromônio, 10, 25 e 50%, as suspensões se mostraram inviáveis mesmo após o período máximo do teste, indicando efeito deletério ao bioativo. Para a mistura suspensão/Rincoforol contendo 5% do feromônio, a alíquota semeada imediatamente, bem como as semeadas 1 e 2 horas pós-contato demonstraram germinação dos conídios. Contudo, este fato se deu 196 horas pós-semeio, ou seja, 180 horas de retardo quando em comparação com a suspensão utilizada como controle. Já para a menor concentração de feromônio, 2,5%, apenas o tempo de contato de 3 horas não demonstrou viabilidade, para os demais tempo houve atraso de 14 horas na germinação em comparação com o controle, já que os primeiros sinais de germinação se deram após 30 horas do início do experimento. Apesar dos testes terem indicado inviabilidade ou retardo do crescimento dos conídios em suspensões, estes resultados podem ser considerados positivos, isso porque foram aplicadas proporções muito altas de feromônio, acima das concentrações usuais utilizadas em métodos de encapsulação. Estas concentrações altas foram aplicadas com o objetivo de verificar o efeito deletério do feromônio ao bioativo, a partir de concentrações variadas, além de estabelecer o limite de Rincoforol que poderia ser adicionado a suspensão. Adicionalmente, os testes foram conduzidos com o feromônio em contato direto com os conídios, o que possibilita a avaliação do produto encapsulado na matriz e um possível efeito protetor da formulação que possa surgir. A partir dos dados obtidos, a concentração de 2,5% foi selecionada para a co-encapsulação com o bioativo na matriz PLN e realização de testes subsequentes.

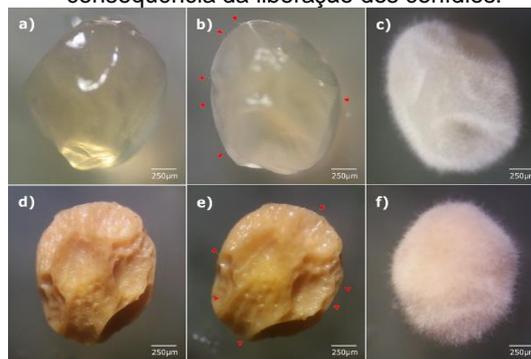
Maiores diâmetros nos *beads* co-encapsulados foram observados proporcionalmente ao aumento na concentração de bentonita, 790; 810; 1131 e 1193 μm , respectivamente para AB0; AB2; AB4 e AB6. Este aumento do tamanho proporcional ao aumento do teor de silicato é devido a propriedade de enchimento deste material, que mantém parcialmente a estrutura inicial vista no momento da gelificação. O reforço estrutural proporcionado pela argila inibe a retração estrutural com a perda de água no momento da secagem e mantém os *beads* com diâmetro médio maior. Embora seja observada uma forma esférica inicial para todos os produtos no momento da gelificação ionotrópica, existe uma tendência de retração estrutural após o processo de secagem. Para *beads* AB0, essa retração se mostrou mais acentuada e estes exibiram forma mais irregular que as demais

formulações. À medida que a concentração de bentonita é aumentada, pode-se notar maior característica de enchimento do *bead* e maior tendência à esferização.

Com relação ao índice de intumescimento dos produtos co-encapsulados, os *beads* AB0 apresentaram alto valor ($li\%_{MAX}$ acima de 200%), justificado por se tratar de um hidrogel, que possui grande capacidade de captação de água. Para os *beads* adicionados de bentonita, o $li\%$ reduziu drasticamente, ficando em torno de 125% para AB4 e de 80% para AB6. AB2 se mostrou excessão, já que apresentou $li\%$ semelhante a AB0 por conter baixa concentração do silicato. A passagem da água através da matriz obedece princípios de difusão dos compostos e podem variar entre os nanocompósitos e o polímero de partida, tendo influência direta na liberação de ativos encapsulados. Desta forma, o $li\%$ pode ser alterado a depender do material utilizado em associação com o polímero, como visto em nossos experimentos, seja por alterações na taxa de difusão, seja por modificações no arcabouço estrutural da rede polimérica.

A liberação do fungo das formulações contendo o bioativo mas com ausência de Rincoforol se iniciou 25 horas após o semeio. Como pode ser visto nas figuras 1a e 1d, após 17 horas do semeio em BDA os *beads* já se apresentam inchados por captarem água do meio. Após 25 horas foi possível visualizar na superfície os primeiros sinais de crescimento hifal como consequência da liberação dos conídios da matriz (Figuras 1b e 1e – as inserções em vermelho indicam o crescimento das primeiras hifas por consequência da liberação dos conídios). As figuras 1c e 1f mostram o crescimento hifal disseminado por todo o *bead*, recobrimdo-o.

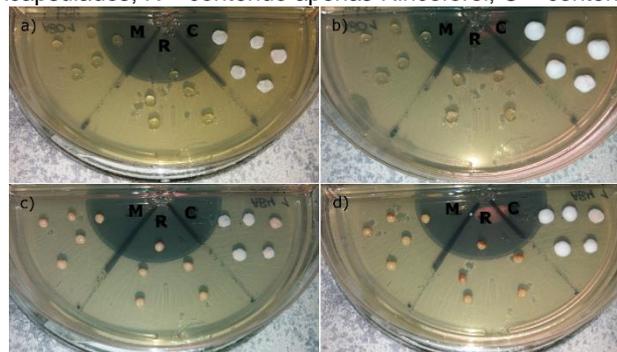
Figura 1 – Liberação *in vitro* dos conídios de *B. bassiana* encapsulados em matrizes com diferentes concentrações de bentonita. *Beads* contendo apenas conídios encapsulados semeados em BDA: a) AB0 após 17 horas; b) AB0 após 25 horas; c) AB0 após 50 horas; d) AB4 após 17 horas; e) AB4 após 25 horas; f) AB4 após 50 horas. As inserções em vermelho indicam o crescimento das primeiras hifas por consequência da liberação dos conídios.



Fonte: Autor, 2017.

Contudo, para os produtos multifuncionais, ou seja, que apresentam o feromônio em sua composição, não houve crescimento fúngico, exceto para o produto AB6, onde foi vista germinação inicial após 66 horas. Estes dados indicam que a argila pode estar agindo como agente protetor do bioativo, visto que, embora a presença do semioquímico seja deletéria para o fungo mesmo nos produtos formulados, maiores concentrações do argilomineral podem manter a viabilidade dos conídios. Como forma de controle, formulações contendo o feromônio mas sem conídios também foram semeadas em BDA. Como previsto, estes *beads* não demonstraram crescimento fúngico, como mostrado na figura 2.

Figura 2 – Placas de Petri contendo BDA utilizadas na liberação *in vitro* dos conídios de *B. bassiana* encapsulados em matrizes com diferentes concentrações de bentonita: a) AB0 após 50 horas; b) AB0 após 66 horas; c) AB4 após 50 horas; d) AB4 após 66 horas. As letras na parte superior de cada imagem indicam *beads*: M – co-encapsulados; R – contendo apenas Rincoforol; C – contendo apenas conídios.



Fonte: Autor, 2017.

Conclusões:

Os resultados preliminares obtidos até o momento demonstraram potencial aplicabilidade da matriz avaliada na co-encapsulação do bioativo utilizado. Apesar do Rincoforol ter demonstrado efeito deletério aos conídios, a maior concentração de bentonita avaliada, 6%, foi capaz de proporcionar proteção ao bioativo. A capacidade de gelificação da matriz se mostrou satisfatória, mesmo na concentração mais alta da porção inorgânica. O silicato proporcionou menor captação de água pela matriz, essencial na obtenção de controle de liberação. Com relação a morfologia, o silicato agiu como material de enchimento da matriz. Maiores quantidades de argila resultaram em maior tendência de esferização, por reforço estrutural da rede polimérica. Conseqüentemente, os produtos se apresentaram ligeiramente maiores que os compostos apenas pelo polímero. Apenas o produto com maior concentração de argila proporcionaram proteção aos conídios, mesmo após exposição do bioativo ao feromônio e ao congelamento utilizado no método de secagem. Desta forma, estudos adicionais são necessários para avaliar a possibilidade de obtenção de nanocompósitos co-encapsulados eficientes para serem aplicados com sucesso no MIP.

Referências:

- [1] SINGH, B.; SHARMA, D. K.; GUPTA, A. A study towards release dynamics of thiram fungicide from starch-alginate *beads* to control environmental and health. **Journal of Hazardous Materials**, 161, 208-216, 2009.
- [2] HE, Y. et al. Encapsulation and characterization of slow-release microbial fertilizer from the composites of bentonite and alginate. **Applied Clay Science**, 109-110, 68-75, 2015.
- [3] WU, Z.; GUO, L.; QIN, S.; LI, C. Encapsulation of *R. planticola* Rs-2 from alginate-starch-bentonite and its controlled release and swelling behavior under simulated soil conditions. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 39, 317-327, 2012.
- [4] BOURBIGOT, S. et al. Solid state NMR characterization and flammability of styrene-acrylonitrile copolymer montmorillonite nanocomposite. **Polymer**, 45, 7627-7638, 2004
- [5] RAY, S. S.; BOUSMINA, M. Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites: In greening the 21st century materials world. **Progress in Materials Science**, 50, 962-1079, 2005.
- [6] BATISTA, D. P. C. et al. Encapsulation and release of *Beauveria bassiana* from alginate–bentonite nanocomposite. **RSC Advances**, 7, 26468-26477, 2017.