

Métodos de encapsulamento de fungos entomopatogênicos para sua aplicação no controle biológico

Encapsulation methods of entomopathogenic fungi for their application in the biological control

Métodos de encapsulación de hongos entomopatógenos para su aplicación en el control biológico

Recebido: 16/11/2022 | Revisado: 22/11/2022 | Aceitado: 24/11/2022 | Publicado: 01/12/2022

Matheus Felipe Celestino

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2748-5154>

Universidade Estadual de Maringá, Brasil

E-mail: matheusfcelestino@hotmail.com

João Arthur dos Santos Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6864-1523>

Universidade Estadual de Maringá, Brasil

E-mail: joaoarthur_oliveira@hotmail.com

Resumo

Atualmente a proteção das lavouras tem sido realizada utilizando agrotóxicos, entretanto, a utilização inadequada e os longos períodos de exposição desses produtos têm causado uma série de problemas ao meio ambiente e à saúde humana. O controle biológico, mais especificamente empregando os fungos entomopatogênicos, surge como uma alternativa eficaz e *eco-friendly* aos agrotóxicos, porém, esses microrganismos são altamente sensíveis à algumas condições ambientais, como a variação de temperatura e luz ultravioleta. Assim, alguns métodos de encapsulamento têm sido desenvolvidos para proteger os fungos contra esses fatores. Para compreender a respeito desses métodos, neste trabalho, realizamos uma revisão da literatura abordando algumas técnicas de encapsulamento de fungos entomopatogênicos para sua aplicação no controle biológico. Os materiais de revestimento utilizados no encapsulamento são os polímeros sintéticos (poliuretano, poliacrilato e álcool polivinílico) ou naturais (alginato, amido, celulose, gelatina, entre outros). O material selecionado deve formar uma proteção estável, inerte, resistente e capaz de liberar o conteúdo no tempo e nas condições ideais. Dentre as técnicas para encapsulamento de fungos entomopatogênicos, podemos destacar a Gelificação térmica, Gelificação iônica, *spray-drying*, Coacervação e LentiKats®. Encapsulados de *Trichoderma harzianum* por meio da gelificação iônica e de *Beauveria bassiana* por gelificação iônica e *spray-drying* já foram relatados com sucesso. No geral, as técnicas de encapsulamento protegem os fungos contra os fatores ambientais e aumentam a eficiência e a viabilidade desses microrganismos no campo.

Palavras-chave: Microrganismos; Revestimento; Proteção; *Eco-friendly*.

Abstract

Currently, crop protection has been carried out using pesticides, however, the inappropriate use and long periods of exposure to these products have caused a series of problems for the environment and human health. Biological control, more specifically using entomopathogenic fungi, appears as an effective and *eco-friendly* alternative to pesticides, however, these microorganisms are highly sensitive to some environmental conditions, such as temperature variation and ultraviolet light. Thus, some encapsulation methods have been developed to protect fungi against these factors. To a better understanding of these methods, in this work, we carried out a literature review addressing some encapsulation techniques for entomopathogenic fungi for their application in biological control. The materials used in encapsulation are synthetic polymers (polyurethane, polyacrylate, and polyvinyl alcohol) or natural polymers (alginate, starch, cellulose, and gelatin, among others). The material selected must form a stable, inert, and resistant protection capable of releasing the contents in time and under ideal conditions. Among the techniques for encapsulating entomopathogenic fungi, we can highlight thermal gelation, ionic gelation, spray-drying, coacervation, and LentiKats®. Encapsulations of *Trichoderma harzianum* by ionic gelation and of *Beauveria bassiana* by ionic gelation and spray-drying have already been successfully reported. Overall, encapsulation techniques protect fungi against environmental factors and increase the efficiency and viability of these microorganisms in the field.

Keywords: Microorganisms; Coating; Protection; *Eco-friendly*.

Resumen

En la actualidad, la protección de cultivos se ha llevado a cabo mediante el uso de plaguicidas, sin embargo, el uso inadecuado y los largos períodos de exposición de estos productos han ocasionado una serie de problemas al medio ambiente y a la salud humana. El control biológico, más específicamente el uso de hongos entomopatógenos, aparece como una alternativa efectiva y *eco-friendly* a los pesticidas, sin embargo, estos microorganismos son altamente sensibles a algunas condiciones ambientales, como la variación de temperatura y la luz ultravioleta. Por lo tanto, se

han desarrollado algunos métodos de encapsulación para proteger a los hongos contra estos factores. Con el fin de comprender acerca de estos métodos, en este trabajo realizamos una revisión de la literatura que aborda algunas técnicas de encapsulación de hongos entomopatógenos para su aplicación en el control biológico. Los materiales de recubrimiento utilizados en la encapsulación son polímeros sintéticos (poliuretano, poliacrilato y alcohol polivinílico) o polímeros naturales (alginato, almidón, celulosa, gelatina, entre otros). El material seleccionado debe formar una protección estable, inerte, resistente, capaz de liberar el contenido a tiempo y en condiciones ideales. Entre las técnicas de encapsulación de hongos entomopatógenos podemos destacar la gelificación térmica, la gelificación iónica, el secado por aspersión, la coacervación y LentiKats®. Ya se han informado con éxito encapsulaciones de *Trichoderma harzianum* por gelificación iónica y de *Beauveria bassiana* por gelificación iónica y secado por aspersión. En general, las técnicas de encapsulación protegen a los hongos contra factores ambientales y aumentan la eficiencia y viabilidad de estos microorganismos en el campo.

Palabras clave: Microorganismos; Revestimiento; Protección; *Eco-friendly*.

1. Introdução

De acordo com o decreto nº 4.074 de 4 de janeiro de 2002, os agrotóxicos são definidos como produtos e agentes de processos cuja finalidade, dentre outras, compreende a proteção e beneficiamento de produtos agrícolas (Brasil, 2002). Essa proteção contra pragas e doenças agrícolas tem sido realizada principalmente por meio da utilização de produtos químicos sintéticos. Apesar da alta eficiência e baixo custo comparado a outros sistemas disponíveis no mercado, a utilização equivocada e a exposição prolongada aos agrotóxicos têm impactado negativamente a saúde humana e o meio ambiente, afetando espécies não-alvo e aumentando a resistência das pragas aos inseticidas (Asghar; Malik & Javed, 2016; Zhu et al., 2018; Sharma, 2019).

Alguns dos efeitos provocados pelos agrotóxicos despertaram maiores cuidados na sociedade no que tange aos hábitos alimentares, surgindo uma preferência pelo consumo de alimentos de origem orgânica, ou seja, produzidos sem o uso de agrotóxicos. Diante da mudança no cenário agrícola e da necessidade de uma alternativa mais sustentável em relação aos agrotóxicos, o controle biológico, tanto natural quanto induzido e com o manejo adequado, surge como uma opção *eco-friendly* auxiliando na redução da aplicação desses produtos químicos e outros insumos nos sistemas agrícolas (Bettiol & Morandi, 2009; Crowder & Harwood, 2014; Mossa, 2016).

O controle biológico, por definição, é compreendido como um fenômeno natural que consiste na regulação do número de um determinado indivíduo (praga) por inimigos naturais podendo ser empregado isoladamente ou como parte de uma estratégia de Manejo de Pragas (Nava, 2007). Nessas estratégias, fungos entomopatógenos têm se destacado, pois atuam efetivamente contra um amplo espectro de pragas prejudiciais à lavoura e, devido ao alto rendimento e fácil cultivo, possuem potencial para suprir o mercado de biopesticidas em larga escala (Nava, 2007).

Embora alguns produtos à base de fungos entomopatógenos já estejam disponíveis comercialmente, seu uso agrícola enfrenta limitações devido, principalmente, a sensibilidade desses microrganismos às altas temperaturas e à exposição à luz ultravioleta (Vemmer & Patel, 2013; Acheampong et al., 2020; Maruyama et al., 2020; Felizatti et al., 2021). Esses fatores podem comprometer sua eficiência no controle biológico, por isso, são necessárias condições adequadas de armazenamento, transporte e aplicação em campo que ocorrem por meio do desenvolvimento de metodologias capazes de proteger os fungos contra esses fatores garantindo uma maior disponibilidade dos mesmos no campo (Felizatti et al., 2021).

Uma das metodologias encontradas para mitigar essas limitações é o processo de encapsulamento, que consiste em formar uma barreira protetora em torno do ativo. O encapsulamento é um procedimento bastante conhecido e utilizado em diversos segmentos como tintas, alimentos e, mais recentemente, fármacos e produtos agrícolas formulados a base de microrganismos (Vemmer & Patel, 2013). Existem diversas metodologias e técnicas de encapsulamento, cada qual com suas características e complexidades, entretanto, dentre todas, as de gotejamento são as que mais têm se destacado (Felizatti et al., 2021).

Como exemplo, podemos citar encapsulados de *Trichoderma harzianum* (Hypocreales: Hypocreaceae) por meio da

gelificação iônica, uma das técnicas de gotejamento, já foi realizado (Mancera-Lopez et al., 2019; Maruyama et al., 2020). O encapsulamento desse fungo incrementou o potencial de ação contra o fungo fitopatogênico *Sclerotinia sclerotiorum* (Helotiales: Sclerotiniaceae), ainda aumentando a biodisponibilidade em campo em comparação com o fungo não encapsulado (Maruyama et al., 2020), além de ajudar a preservar seus conídios sem perda de viabilidade (Mancera-Lopez et al. 2019). Também por gelificação iônica e *spray-drying*, outra técnica de gotejamento, também já foram produzidos encapsulados de *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae), os quais apresentaram melhor estabilidade quando expostos à altas temperatura e luz ultravioleta em comparação ao fungo não encapsulado e ensaio biológicos contra o inseto-praga *Spodoptera cosmioides* (Lepidoptera: Noctuidae) (Felizatti et al., 2021).

Em 2020, em todo o mundo foram utilizados aproximadamente 2,6 milhões de toneladas de pesticidas e 471 mil toneladas de inseticidas, sendo o Brasil responsável por 14% (± 377 mil toneladas) e 12% (± 60 mil toneladas) de pesticidas e inseticidas, respectivamente, desse total (FAOSTAT, 2022). Então, tornam-se relevantes trabalhos que abordem trabalhos originais ou que revisem metodologias que favoreçam o emprego de estratégias *eco-friendly*/ alternativas de controle de pragas e patógenos nos sistemas agrícolas diminuindo assim o emprego dos agrotóxicos. Neste trabalho, nós realizamos uma revisão da literatura abordando algumas técnicas de encapsulamento de fungos entomopatogênicos para sua aplicação no controle biológico, das quais são ferramentas biotecnológicas para mitigar os efeitos diretos e indiretos dos agrotóxicos e seus derivados no meio ambiente.

2. Metodologia

Uma revisão narrativa, de acordo com a metodologia de Correia & Mesquita (2014), foi elaborada com base em pesquisas nas plataformas online Google Acadêmico (<https://scholar.google.com.br>), PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), ScienceDirect (<https://www.sciencedirect.com/>) e Scopus (<https://www.scopus.com/>). Para a pesquisa, foram empregados os seguintes descritores em inglês: *biological control AND entomopathogenic fungi AND encapsulation, entomopathogenic fungi AND bioencapsulation OR encapsulation techniques*. A seleção dos artigos para compor a revisão foi realizada inicialmente com a leitura do título e resumo (*abstract*) para verificar a presença dos descritores alvo utilizados durante a pesquisa, em seguida, a partir da leitura do conteúdo dos artigos, aqueles que apresentaram a descrição de alguma técnica de encapsulamento (gotejamento, *spray-drying*, coacervação, hidrogéis ou outras) de fungos entomopatogênicos foram selecionados. Além disso, as buscas foram delimitadas (filtradas) entre 2015 à 2021, todavia, pela escassez dos trabalhos abordando a temática, trabalhos de datas anteriores também foram incluídos.

3. Resultados e Discussão

3.1 Materiais e morfologia dos encapsulados

Os materiais de revestimento utilizados no encapsulamento são os polímeros, sejam eles sintéticos (poliuretano, poliacrilato e/ou álcool polivinílico) ou naturais (alginato, amido, celulose, gelatina, goma arábica ou goma gelana) (Vemmer & Patel, 2013; Choudhury; Meghwal & Das, 2021). O material selecionado deve formar uma proteção estável, inerte, resistente e capaz de liberar o conteúdo no tempo e nas condições ideais, portanto é necessário avaliar as características intrínsecas de cada material, para que a escolha seja adequada ao microrganismo e à técnica de encapsulamento empregada (Choudhury; Meghwal & Das, 2021).

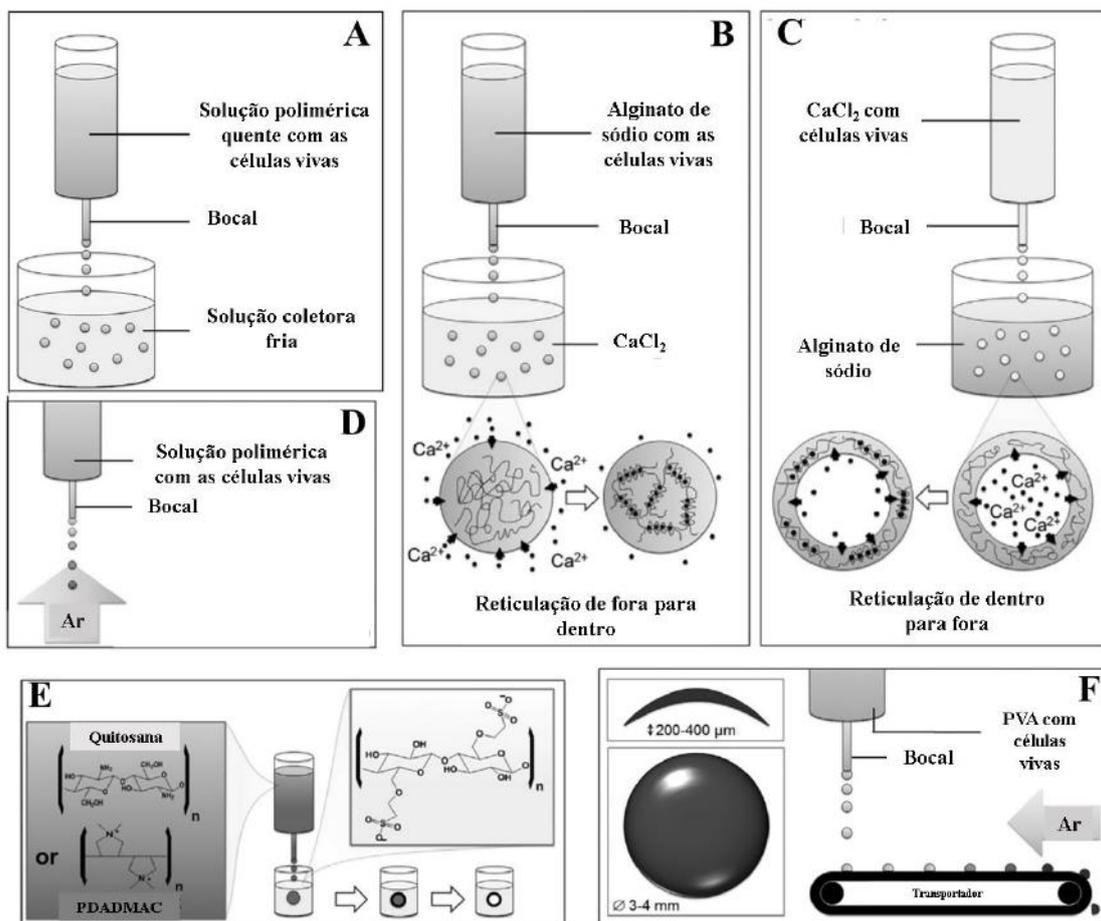
As características intrínsecas de cada material podem ser divididas em três: Propriedades físico-químicas, fatores econômicos e qualidade/segurança. Nas propriedades físico-químicas leva-se em consideração o peso molecular e distribuição, mecanismos de gelificação, viscoelasticidade e a formação de estruturas primárias, secundárias e terciárias. Nos fatores econômicos abordam-se principalmente os custos de produção e aplicação, já na qualidade e segurança estuda-se a toxicidade,

degradabilidade e os processos para aprovação nos órgãos regulatórios (Vemmer & Patel, 2013).

Dependendo do método de encapsulamento utilizado e das propriedades físico-químicas do material, os encapsulados podem assumir diferentes formas e tamanhos (Vemmer & Patel, 2013). Adota-se como microencapsulados aqueles com diâmetro entre 10 – 100 μm e macroencapsulados aqueles com diâmetro superiores a 100 μm (John et al., 2011). O formato mais comum dos encapsulados é o esférico podendo apresentar diferentes configurações como: esferas, esfera ocas, lente, esferas de revestimento e esferas multicompartimentada (Vemmer & Patel, 2013).

Dentre as técnicas ou metodologias para encapsulamento de fungos entomopatogênicos, podemos destacar aquelas baseadas em gotejamento, como a Gelificação térmica, Gelificação iônica, *spray-drying*, Coacervação complexa e LentiKats®. A Figura 1 apresenta um esquema geral de como ocorre essas técnicas, já a descrição detalhada de cada uma está nos subitens a seguir (3.2, 3.3, 3.4 e 3.5).

Figura 1 - Métodos de encapsulamento de fungos entomopatogênicos. Em (A) Gelificação térmica, (B) Gelificação iônica - esferas, (C) Gelificação iônica - esferas ocas, (D) *spray-drying*, (E) Coacervação complexa e (F) LentiKats®.



Fonte: Adaptado de Vemmer & Patel (2013).

3.2 Técnicas de gotejamento: Gelificação térmica e iônica

Algumas soluções poliméricas, como as de goma gelana e gelatina, sofrem gelificação conforme ocorre a diminuição da temperatura, que pode ser revertida e/ou desintegrada com o aumento da mesma. Utilizando esse princípio, é possível obter encapsulados esféricos por meio do gotejamento de uma solução quente contendo os fungos que é repentinamente resfriada de 40/45 $^{\circ}\text{C}$ a 25 $^{\circ}\text{C}$ em uma solução solidificante fria contendo um agente reticulante, conforme indicado na Figura 1A (Jonh et

al., 2011; Vemmer & Patel, 2013).

A gelificação iônica é uma técnica que se destaca pela simplicidade e versatilidade, não utilização de solventes orgânicos e produção de encapsulados em temperatura ambiente (Benavides et al., 2016; Rocha, 2017). A produção das esferas pode ser interna ou externa e ocorre por meio da interação eletrostática entre polímeros aniônicos e cátions monovalentes ou polivalentes, como o alginato e cálcio, que são os materiais mais utilizados nessa técnica por conta da alta disponibilidade e baixa toxicidade (Schoubben et al., 2010; Aguilar et al., 2015; Benavides et al., 2016).

A gelificação iônica interna produz esferas adicionando sais de cálcio insolúveis em uma solução polimérica contendo material de núcleo, como alginato. Posteriormente, a suspensão é emulsificada em uma fase oleosa contendo surfactante reduzindo o pH utilizando uma solução ácida com o intuito de liberar os íons cálcio, permitindo a complexação (Schoubben et al., 2010). Já a gelificação iônica externa produz esferas por meio do gotejamento de uma solução de alginato de sódio em uma solução de cloreto de cálcio, conforme demonstrado na Figura 1B. A reticulação ocorre “de fora para dentro” formando uma estrutura tridimensional rígida contendo água (Schoubben et al., 2010; Vemmer & Patel, 2013; Aguilar et al., 2015; Benavides et al., 2016).

Utilizando a mesma técnica e as mesmas soluções, mas alterando as posições de cada uma e suplementando a solução reticulante com um espessante, como a carboximetilcelulose sódica, é possível obter esferas ocas. A reticulação nesse caso ocorre “de dentro para fora” e a espessura da camada pode ser controlada pela concentração dos reagentes (Figura 1C) (Vemmer & Patel, 2013).

3.3 *Spray-drying*

Nesta técnica uma solução, emulsão ou suspensão contendo o material ativo, no caso os fungos, e o material de parede em solução aquosa ou orgânica são submetidos contra uma corrente de ar quente que provoca a evaporação instantânea do solvente obtendo, assim, as microcápsulas, conforme exemplificado na Figura 1D (Silva et al., 2014; Saberi-Riseh, 2021).

As desvantagens dessa técnica, do ponto de vista para o controle biológico, são a alta distribuição de tamanho de partículas e as altas temperaturas que podem reduzir a taxa dos fungos sobreviventes não permitindo o encapsulamento de células sensíveis, como os fungos não formadores de esporos. Por outro lado, as vantagens do sistema são a alta velocidade, reprodutibilidade, facilidade de operação, implementação em larga escala, baixo preço dos insumos e, principalmente, formação e secagem dos encapsulados em uma única etapa o que possibilita obter formulações com longos *shelf-life* (durabilidade do produto) (Vemmer & Patel, 2013; Silva et al., 2014; Saberi-Riseh, 2021).

3.4 *Coacervação complexa*

A coacervação é entendida como uma separação de fases de dois polieletrólitos solúveis em água de cargas opostas dispersos formando uma fase de equilíbrio diluída e uma fase coacervada densa através da deposição das partículas coloidais sobre um núcleo ativo (Jyothi et al., 2010; Vemmer & Patel, 2013; Da Silva et al., 2015).

A coacervação complexa consiste em três etapas: (1) formação de três fases imiscíveis, (2) deposição do material de revestimento e (3) solidificação do revestimento (Jyothi et al., 2010). Na primeira etapa o material de parede é dissolvido e o material do núcleo é disperso nessa solução, com a qual é imiscível. Em seguida, na segunda etapa, adiciona-se o material polimérico líquido com a carga oposta ao material de parede, que fará a cobertura. Nesse ponto, as microcápsulas obtidas são estabilizadas por reticulação, dessolvatação ou tratamento térmico para que então possam ser secas na última etapa do processo (Jyothi et al., 2010; Vemmer & Patel, 2013; Da Silva et al., 2015).

Os coacervados podem ser afetados por diversos fatores, principalmente a sensibilidade ao pH e à força iônica, que limitam sua utilização, entretanto, devido à alta eficiência de encapsulação (>99%) e possibilidades de liberação controlada

com base no estresse mecânico, na temperatura ou liberação sustentada, a coacervação é considerada uma tecnologia promissora para o encapsulamento de fungos entomopatogênicos, tanto que Patel et al. (2011) obtiveram com sucesso encapsulados esféricos ocós com o fungo *Hirsutella rhossiliensis* (Hypocreales: Ophiocordycipitaceae).

3.5 LentiKats®

O álcool polivinílico (PVA) é um polímero que, quando em solução, é capaz de se gelificar por conta própria quando armazenadas por muito tempo, entretanto, esse processo espontâneo é lento, e as matrizes obtidas nessas condições geralmente são fracas, portanto, desenvolveu-se novas técnicas para melhorar a gelificação das soluções de PVA (Vemmer & Patel, 2013).

Uma das técnicas mais conhecida é o congelamento e descongelamento repetitivo da solução obtendo os chamados criogéis (Vemmer & Patel, 2013). O criogel obtido é significativamente mais forte, entretanto, as baixas temperaturas têm um efeito negativo nas células vivas, tornando esse método incompatível para a maioria dos fungos entomopatogênicos (Vemmer & Patel, 2013; Krasňan et al., 2016).

Outro método desenvolvido foi a tecnologia LentiKats® (Figura 1F). Esse método é considerado o mais adequado para se trabalhar com células, pois é realizado em temperatura ambiente e sem produtos químicos tóxicos e caros (Krasňan et al., 2016). A tecnologia LentiKats® consiste em adicionar glicerol ou polietilenoglicol (PEG) à solução de PVA. Essa mistura é aquecida para melhor solubilização dos componentes e, posteriormente, resfriada para adição das células. A solução é extrusada em placas formando encapsulados em forma de lente que podem ser secas deixando as placas expostas ao ar e/ou, preferencialmente, em uma cabine de fluxo laminar. Após secos, os encapsulados são colocados em uma solução (sulfato de sódio) de estabilização. Ao término do processo, as lentes são decantadas e armazenadas em meio ou solução adequada (Vemmer & Patel, 2013; Krasňan et al., 2016).

O PVA é de baixo custo, não tóxico, estável, biocompatível e resistente à oxidação e os hidrogéis de PVA são inofensivos aos fungos, possuem estrutura e boa resistência mecânica e química tornando-o um suporte de imobilização adequado para várias aplicações, incluindo no controle biológico (Vemmer & Patel, 2013; Radosavljevic et al., 2021). Além disso, a tecnologia LentiKats® já está dimensionada para uso industrial, tanto que se estima que a capacidade de produção de um biocatalisador LentiKats® é de cerca de 70 toneladas por ano.

4. Conclusão

A utilização inadequada e os longos períodos de exposição aos agrotóxicos químicos sintéticos e, conseqüentemente, os malefícios causados à saúde humana e ambiental evidenciam a necessidade do mercado por produtos sustentáveis, sem perda da qualidade e capazes de atender a demanda solicitada. Nesse sentido, os fungos entomopatogênicos, inimigos naturais de diversas pragas agrícolas se mostram uma ferramenta útil para a próxima geração de defensivos ecológicos.

Embora sejam eficientes e altamente direcionados, a utilização dos fungos entomopatogênicos esbarra na sensibilidade à luz ultravioleta e variação de temperaturas. Aqui, descrevemos algumas técnicas de encapsulamento, cada qual com suas características, mas todas com o objetivo de proteger os fungos contra esses fatores ambientais limitantes garantindo sua eficiência e a viabilidade. Esperamos que esta revisão narrativa ajude a estimular o encapsulamento, não somente dos fungos entomopatogênicos, mas também de outros microrganismos benéficos para o setor agrícola. Além disso, futuros estudos precisam ser realizados para adaptar e/ou aprimorar estes métodos de encapsulamento para outras classes de fungos e bactérias, aumentando assim a variedade de produtos microbianos disponíveis no mercado, o que contribuirá para mitigar os efeitos adversos dos agrotóxicos e estimulantes de crescimento de plantas químicas no meio ambiente e na saúde humana.

Referências

- Acheampong, M. A., Hilla, M. P., Moorea, S. D., & Coombesa, A. C. (2020). UV sensitivity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates under investigation as potential biological control agents in South African citrus orchards. *Fungal Biology*, 124(5), 304–310. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.08.009>.
- Aguilar, K. C., Tello, F., Bierhalz, C. K., Garnica Romo, M. G., Martínez Flores, H. E., & Grosso, C. R. F. (2015). Protein adsorption onto alginate-pectin microparticles and films produced by ionic gelation. *Journal of Food Engineering*, 154, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.12.020>.
- Asghar, U., Malik, M. F., & Javed, A. (2016). Pesticide exposure and human health: a review. *Journal of Ecosystem & Ecography*, 1–4. 10.4172/2157-7625.S5-005.
- Benavides, S., Cortés, P., Parada, J., & Franco, W. (2016). Development of alginate microspheres containing thyme essential oil using ionic gelation. *Food Chemistry*, 204, 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.104>.
- Bettiol, W., & Morandi, M.A.B. (2009). *Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas*. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, 341p.
- Brasil. (2002). *Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências*. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 04 jan. 2002. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumosagricolas/agrotoxicos/legislacao/arquivos-de-legislacao/decreto-4074-2002-ecretodos-agrotoxicos/view>. Acesso em: 30 nov 2021.
- Choudhury, N., Meghwal, M., & Das, K. (2021). Microencapsulation: An overview on concepts, methods, properties and applications in foods. *Food Frontiers*, 2(4), 426–442. <https://doi.org/10.1002/fft2.94>.
- Correia, A. M. R. & Mesquita, A. (2014). *Mestrados E Doutoramentos*. Porto: Vida Econômica Editorial, 328 p
- Crowder, D. W., & Harwood, J. D. (2014). Promoting biological control in a rapidly changing world. *Biological Control*, 75, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.04.009>.
- Da Silva, T. M., Rodrigues, L. Z., Nunes, G. L., Codevilla, C. F., Da Silva, C. B., & De Menezes, C. R. (2015). Encapsulação de compostos bioativos por coacervação complexa. *Ciência e Natura*, 37, 56–64. 10.5902/2179-460X19715
- Faostat. *Pesticides use*. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/RP>. Acesso em: 09. nov. 2022.
- Felizatti, A. P., Manzano, R. M., Rodrigues, I. M. W., Da Silva, M. F. G., Fernandes, J. B., & Forim, M. R. (2021). Encapsulation of *B. bassiana* in Biopolymers: Improving Microbiology of Insect Pest Control. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.704812>.
- John, R. P., Tyagi, R. D., Brar, S. K., Surampalli, R. Y., & Prévost, D. (2011). Bio-encapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery. *Critical Reviews in Biotechnology*, 31(3), 211–226. <https://doi.org/10.3109/07388551.2010.513327>.
- Jyothi, N. V. N., Prasanna, P. M., Sakarkar, S. N., Prabha, K. S., Ramaiah, P. S., & Srawan, G. Y. (2010). Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *Journal of Microencapsulation*, 27(3), 187–197. <https://doi.org/10.3109/02652040903131301>.
- Krasňan, V., Stloukal, R., Rosenberg, M., & Rebros, M. (2016). Immobilization of cells and enzymes to LentiKats®. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(6), 2535–2553. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7283-4>.
- Mancera-López, M. E., Izquierdo-Estévez, W. F., Escalante-Sánchez, A., Ibarra, J. E., & Barrera-Cortés, J. (2019). Encapsulation of *Trichoderma harzianum* conidia as a method of conidia preservation at room temperature and propagation in submerged culture. *Biocontrol Science and Technology*, 29(2), 107–130. <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1535053>.
- Maruyama, C. R., Bilesky-José, N., Lima, R., & Fraceto, L. F. (2020). Encapsulation of *Trichoderma harzianum* preserves enzymatic activity and enhances the potential for biological control. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00225>.
- Mossa, A. T. H. (2016). Green Pesticides: Essential oils as biopesticides in insect-pest management. *Journal of Environmental Science and Technology*, 9(5), 354–378. <https://dx.doi.org/10.3923/jest.2016.354.378>.
- Nava, D. E. (2007). *Controle biológico de insetos-praga em frutíferas de clima temperado: uma opção viável, mas desafiadora*. (First edition). Embrapa Clima Temperado, Pelótas, 20p.
- Patel, A.V., Jakobs-Schönwandt, D., Rose, T., & Vorlop, K.-D. (2011). Fermentation and microencapsulation of the nematophagous fungus *Hirsutiella rhossiliensis* in a novel type of hollow beads. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89, 1751–1760. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3046-9>
- Radosavljević, M., Levic, S., Belovic, M., Pejin, J., Djukic-Vukovic, A., Mojovic, L., & Nedovic, V. (2021). Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in Polyvinyl Alcohol for the production of L-(+)-Lactic Acid. *Process Biochemistry*, 100, 149–160. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.10.006>.
- Rocha, L. C. R. (2017). *Desenvolvimento de micropartículas contendo suco de tomate via gelificação iônica*. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais), Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Saberi-Riseh, R., Moradi-Pour, M., Mohammadinejad, R., & Thakur, V. K. (2021). Biopolymers for biological control of plant pathogens: Advances in microencapsulation of beneficial microorganisms. *Polymers*, 13(12), 1–23. <https://doi.org/10.3390/polym13121938>.
- Schoubben, a., Blasi, P., Giovagnoli, S., Rossi, C., & Ricci, M. (2010). Development of a scalable procedure for fine calcium alginate particle preparation. *Chemical Engineering Journal*, 160(1), 363–369. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.02.062>.

Sharma, A., Kumar, V., Shahzad, B., Tanveer, M., Sidhu, G. P. S., Handa, N., ... & Thukral, A. K. (2019). Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Applied Sciences*, 1(11), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1485-1>.

Silva, P. T., Fries, L. L. M., Menezes, C. R., Holkem, A. T., Schwan, C. L., Wigmann, E. F., Bastos, J. O., & Da Silva, C. B. (2014). Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. *Ciência Rural*, 44(7): 1304–1311. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20130971>.

Vemmer, M., & Patel, A. V. (2013). Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. *Biological Control*, 67(3), 380–389. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.09.003>.

Zhu, J., Wang J., Ding, Y., Liu, B., & Xiao, W. (2018). A systems-level approach for investigating organophosphorus pesticide toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 149, 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.10.066>.