

República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI 1002615-0 A2**



(22) Data de Depósito: 30/07/2010  
(43) Data da Publicação: 27/03/2012  
(RPI 2151)

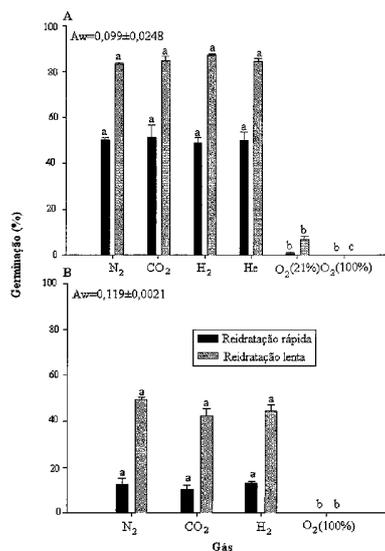
(51) *Int.Cl.:*  
B65B 31/02

(54) **Título:** EMBALAGEM EM ATMOSFERA MODIFICADA PARA AUMENTO DA VIDA-DE-PRATELEIRA DE FUNGOS

(73) **Titular(es):** Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.

(72) **Inventor(es):** Marcos Rodrigues de Faria

(57) **Resumo:** EMBALAGEM EM ATMOSFERA MODIFICADA PARA AUMENTO DA VIDA-DE-PRATELEIRA DE FUNGOS. A presente invenção refere-se a um método de embalagem para aumento da vida-de-prateleira de esporos de fungos, aos esporos de fungos obtidos por tal método e à embalagem que contém tais esporos. O método de embalagem compreende as etapas de redução atividade de água dos esporos para uma faixa de atividade de água viável aos organismos, envase dos esporos em embalagens impermeáveis a gases e vapor d'água contendo sachês que promovam atmosfera de baixa atividade de água e baixo teor de oxigênio absorvedores de oxigênio e de umidade e manutenção dos esporos na embalagem durante algum tempo em temperatura viável aos organismos.



## “EMBALAGEM EM ATMOSFERA MODIFICADA PARA AUMENTO DA VIDA-DE-PRATELEIRA DE FUNGOS”

### CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a métodos de embalagem de esporos de fungos, tais quais os fungos entomopatogênicos dos gêneros *Beauveria*, *Isaria*, *Lecanicillium*, *Nomuraea* e *Trichoderma*, para aumento da vida-de-prateleira.

### FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Pesticidas biológicos são uma alternativa aos obtidos sinteticamente, por não serem tóxicos aos seres humanos. Entre eles estão aqueles produzidos a partir de fungos entomopatogênicos, cujos esporos são desidratados, para que se mantenham viáveis por períodos prolongados (Moore et al. Effects of moisture content and temperature on storage of *Metarhizium flavoviride* conidia. Biocontrol Science and Technology, v.6, p. 51-61.). A desidratação também faz com que os esporos sobrevivam em ambientes extremos caracterizados por calor seco, congelamento e descongelamento, bem como meio ácido.

Há mais de um século que pesquisas demonstraram a interação entre fungos e pragas agrícolas. Tal interação favorece o desenvolvimento das plantas cultivadas por meio da eliminação de seus patógenos, insetos-praga e plantas daninhas. Estas constatações estimularam o emprego de micopesticidas para o controle de pragas agrícolas. A produção destes biopesticidas tem aumentado e, entre as causas desse aumento, estão a exigência de consumidores por alimentos mais saudáveis, alimentos com menos resíduos tóxicos, maior conscientização de profissionais do setor agropecuário quanto ao uso de agrotóxicos, legislação cada vez mais restritiva aos pesticidas químicos e necessidade do uso de produtos alternativos em programas de manejo de resistência aos químicos.

Fungos empregados no controle biológico de pragas e que são utilizados como pesticidas são expostos a temperaturas elevadas, chegando a atingir 50°C ou mais durante o transporte ou no armazenamento. Este fator ambiental afeta a viabilidade de esporos de fungos sensíveis a elevações de temperatura, tais como *Metarhizium*, *Beauveria*, *Lecanicillium* e *Trichoderma*. Os estudos realizados até o momento voltaram-se, sobretudo, para o armazenamento destes fungos sob condições refrigeradas

ou temperaturas ambientais inferiores a, aproximadamente, 30°C. Micopesticidas experimentam rápida queda na viabilidade durante o armazenamento sem refrigeração e isto compromete a aceitação do produto no mercado, ocasionando ainda resultados indesejáveis no controle das pragas-alvo.

5 O estudo de Marques e Alves (Marques, E. J., Alves, S.B. Otimização de formulações na preservação de esporos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok. em diferentes condições de armazenamento. Arquivos de Biologia e Tecnologia, v. 39, p. 861-877, 1996) demonstrou que a viabilidade de esporos com teor de umidade de 15,5% armazenados a 30°C pode ser  
10 bastante reduzida em menos de 30 dias.

O estudo de Sandhu et al. (Sandhu, S.S., Rajak, R.C., Agarwal, G.P. Studies on prolonged storage of *Beauveria bassiana* conidia: effects of temperature and relative humidity on conidial viability and virulence against chickpea borer, *Helicoverpa armigera*. Biocontrol Science and Technology, v. 3, p.47-53, 1993) revelou que esporos  
15 de *Beauveria bassiana* preservam mais a viabilidade quanto menor a temperatura e a umidade relativa de equilíbrio adotadas durante o armazenamento.

Tem-se dado grande enfoque ao armazenamento de fungos entomopatogênicos e outras espécies em ambientes com temperatura baixa ou moderada ou em embalagens que permitem trocas entre as atmosferas interna e externa, que não se configuram como  
20 métodos adequados para o armazenamento em temperaturas superiores a 25°C

O documento US5989898 revela a utilização de embalagem impermeável e de absorvedores de umidade e de oxigênio para gerar atmosfera com umidade relativa inferior a 10% e menos de 5% de oxigênio. Outra proposta desse documento é a eliminação do oxigênio através de embalagem a vácuo, ou ainda a aplicação de  
25 nitrogênio à embalagem com esporos. Os micro-organismos utilizados foram *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para armazenamento a 25°C e a 37°C. O documento US5989898 utiliza agente tensoativo para reativar os esporos, diferindo da presente invenção, que possibilita armazenamentos em temperaturas superiores a 37°C, utilização de diferentes gases atóxicos (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> e He) em substituição ao oxigênio, e  
30 adota a observância de um período de pré-incubação do produto embalado. É importante que micopesticidas devidamente embalados sejam expostos a condição adequada de temperatura antes de expostos às condições extremas, para que haja tempo

de os teores de oxigênio e umidade serem reduzidos para níveis adequados. O documento WO9718294 revela a extensão de duas a seis vezes a vida-de-prateleira de esporos de fungos ou de bactérias mediante redução do teor de oxigênio, associado ou não a métodos de redução da umidade. Entretanto, a temperatura máxima de armazenamento avaliada foi de 30°C, e após apenas 70 dias de armazenamento a viabilidade inicial já havia sido reduzida em 85% ou mais no tratamento com o emprego de sachê absorvedor de O<sub>2</sub> ou no tratamento com emprego de nitrogênio. Já a presente invenção permite a manutenção da viabilidade de esporos de fungos armazenados a temperaturas superiores, por exemplo, de 40°C, durante o período de três a seis meses.

10

### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Constitui objeto desta invenção prover um método de embalagem de esporos de fungos, de modo a aumentar a sua vida-de-prateleira. O método compreende as etapas de: i) redução do teor inicial de umidade dos esporos para uma faixa de atividade de água viável aos organismos; ii) envase dos esporos em embalagens impermeáveis a gases e vapor d'água com sachê absorvedor de oxigênio e de umidade. Opcionalmente, combinação de dois ou mais sachês de propriedades diferentes; iii) manutenção dos esporos na embalagem durante no mínimo dois a 25°C ou em outra temperatura viável aos organismos.

Uma segunda concretização da invenção consiste em prover esporos dos gêneros *Beauveria*, *Isaria*, *Lecanicillium*, *Nomuraea* e *Trichoderma* com vida-de-prateleira aumentada.

Em outra concretização obtém-se uma embalagem selada compreendendo em seu interior: (i) esporos viáveis de fungos; e (ii) um ambiente com teor de umidade e oxigênio reduzidos pelo uso de sachês e com um período de estocagem em uma temperatura adequada em embalagens impermeáveis a gases e vapor d'água.

### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1: Efeito de diferentes gases na viabilidade conidial de *Beauveria bassiana* após armazenamento a 50 °C por 60 dias. A viabilidade foi avaliada por meio de dois protocolos de germinação (rehidratação rápida vs. rehidratação lenta).

Figura 2: Viabilidade de conídios de *Beauveria bassiana* após injeção de 20% CO<sub>2</sub> (+80% N<sub>2</sub>) e armazenamento a 25, 40, ou 50 °C.

### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um método de armazenamento para aumento da vida-de-prateleira de fungos sob condições não-refrigeradas, sobretudo temperatura superior ou igual a 37°C. Por meio desta metodologia os esporos devem permanecer viáveis mesmo quando submetidos a elevadas temperaturas ambientais.

Na descrição que segue, alguns termos são utilizados extensivamente. As seguintes definições são providas para facilitar o entendimento da invenção.

O termo “embalagem em atmosfera modificada” é aqui definido como o processo de embalagem onde o material no interior da mesma é exposto a gases com composição distinta do ar atmosférico, podendo incluir técnicas como a injeção de determinado gás ou mistura de gases no interior da embalagem ou o uso de elementos cujos componentes reagem com componentes da embalagem. Estes elementos, podem ser mas não estão limitados a sachês absorvedores, emissores de gases, ou absorvedores de vapor d’água.

O termo “viabilidade” refere-se ao percentual de germinação de esporos medido por procedimento que emprega rehidratação rápida, por ser considerado um protocolo mais indicado para avaliação da qualidade conidial dos micopesticidas.

Considera-se “temperatura viável ao organismo” aquela que não causa a morte ou debilitação de conídios de determinada espécie. Na presente invenção a temperatura viável é preferencialmente em torno de 25°C.

Define-se “atividade de água” ( $a_w$ ) como a razão entre a pressão de vapor d’água de um material e a pressão de vapor da água pura, na mesma temperatura. É uma medida da água contida no material que está disponível para reações químicas e biológicas e, por isto, um parâmetro importante em estudos com micro-organismos.

O termo “vida-de-prateleira” é definido como o período de tempo em que um micopesticida pode ser armazenado em determinada condição de temperatura sem que ocorra considerável perda de atributos relacionados à sua eficiência. Para micopesticidas empacotados em embalagens não-herméticas, a umidade relativa de armazenamento deve ser igualmente considerada. Para efeito desta invenção, considera-se o período de 2 a 6 meses a mínima vida-de-prateleira desejável para inseticidas biológicos armazenados em temperaturas próximas a 40°C. A viabilidade é o atributo mais comumente utilizado por patologistas para referir-se à qualidade conidial e deve ser, preferencialmente, superior a 80%. Deste modo, estabeleceu-se como a vida-de-

prateleira para micoinseticidas o tempo necessário para que a viabilidade seja reduzida para 80% em uma determinada temperatura.

O método de extensão da vida-de-prateleira de esporos de fungos entomopatogênicos

5 consiste nas seguintes etapas:

i) redução inicial do teor de umidade dos esporos para níveis muito baixos de atividade de água viável aos organismos;

ii) envase dos esporos em embalagens impermeáveis a gases e vapor d'água com sachê absorvedor de oxigênio e de umidade. Opcionalmente, combinação de dois ou mais  
10 sachês de propriedades diferentes.

iii) manutenção na embalagem durante no mínimo dias em uma outra temperatura viável aos organismos.

A redução do teor inicial de umidade de esporos hidratados pode ser feita mediante secagem durante a etapa de colheita dos esporos a produção de fungos normalmente se  
15 dá em substratos sólidos, como arroz cozido e similares. Imediatamente após o processo de produção do fungo o substrato colonizado pode ser acondicionado em sala com baixa umidade relativa, o que resulta na secagem dos conídios ou utilizando-se câmara contendo material desidratante, até que haja redução da atividade de água para valores baixos.

20 Tais valores baixos de atividade de água são preferencialmente, a 0,030. Esse material pode ser selecionado do grupo de, mas não sendo limitado a: sulfato de cálcio e sílica gel. Para esta redução do teor de umidade em câmara de secagem aguarda-se o período de dois dias ou mais a 25°C ou outra temperatura viável aos organismos, na qual a desidratação do fungo possa ocorrer sem debilitar as estruturas fúngicas.

25 A atividade de água dos organismos é reduzida significativamente após o envase, e assim mantida por meio do uso de embalagem impermeável a gases e vapor de água.

No processo de embalagem dos esporos, como meio de fornecer atmosfera adequada para a conservação dos mesmos, preferencialmente utilizam-se sachês com função dupla, tanto de absorvedor de umidade quanto de oxigênio. Os sachês devem gerar  
30 atmosfera atóxica aos esporos. Para atmosfera modificada os sachês com dupla função ou função única e que podem ser adicionados às embalagens podem ser, mas não estão limitados a: RP-3A (absorvedor de oxigênio e umidade), Ageless® ZPT 1000

(absorvedor de oxigênio), OxyFree™ 504A (absorvedor de oxigênio e gás carbônico), OxyFree™ 504E (absorvedor de oxigênio e gerador de gás carbônico) ou sulfato de cálcio anidro (absorvedor de umidade). As embalagens impermeáveis utilizadas neste método podem ser, mas não estão limitadas a embalagens aluminizadas e vidro. O resultado do uso de sachês em embalagens é diferente, dependendo da atividade de água inicial dos esporos. Quando se utiliza somente sachê absorvedor de oxigênio, a elevada umidade dos esporos prejudica a conservação dos mesmos, reduzindo a viabilidade após exposição a condições de elevada temperatura. Devem ser utilizados absorvedores de umidade que não liberem vapor d'água quando expostos a temperaturas elevadas, tal como o Drierite™, composto de sulfato de cálcio anidro, que somente libera vapor d'água após exposição a temperaturas superiores a 177°C.

A atividade de água final do micopesticida e a composição atmosférica no interior da embalagem são fatores essenciais para a manutenção da viabilidade dos esporos até seu uso. A manutenção dos esporos na embalagem impermeável antes da exposição a elevadas temperaturas consiste no que se denomina pré-incubação ou “período de equilíbrio”, tempo necessário para redução da atividade de água para valores inferiores a 0,1, preferencialmente próximos a 0,03. Para o fungo *Beauveria bassiana*, o período de equilíbrio é geralmente de dois dias, ou mais que isso dependendo de fatores como o tamanho da embalagem, tipo de formulação, quantidade de micopesticida e quantidade e eficiência dos sachês absorvedores utilizados.

Os fungos que podem ser embalados e reativados de acordo com a presente invenção incluem, mas não estão limitados àqueles dos gêneros *Beauveria*, *Isaria*, *Lecanicillium*, *Nomuraea* e *Trichoderma*.

As embalagens impermeáveis em que esporos de fungos de acordo com a invenção são acondicionados podem ser, mas não se limitam a: vidro, materiais laminados contendo alumínio ou cerâmica ou outros materiais impermeáveis a gases e vapor d'água.

Os exemplos abaixo são colocados de forma a ilustrar e elucidar melhor a invenção e não podem ser tidos como forma de limitar a presente invenção.

### 30 EXEMPLOS

Exemplo 1: INJEÇÃO DE DIFERENTES GASES EM EMBALAGEM DE VIDRO

Amostras de esporos (0,6 g) foram mantidas em frascos herméticos de vidro de 125 mL (Ball®, Jarden Corp., Muncie, IN, USA) fechados com tampas metálicas contendo septos de borracha. Em cada frasco de vidro foram injetados durante 40 minutos à taxa de 40 mL.min<sup>-1</sup> dióxido de carbono puro, nitrogênio, hélio ou hidrogênio, bem como 100% ou 21% de oxigênio, equilibrados com N<sub>2</sub> (Airgas East, Inc., Salem, NH, USA). Nos frascos onde não se injetou O<sub>2</sub> mediu-se a concentração deste gás seguindo-se a injeção para assegurar que o ambiente estivesse com concentrações não detectáveis de O<sub>2</sub>. Amostras de gás (500 µL) foram extraídas de cada frasco com uma seringa hermética (modelo 1750, Hamilton Company, Reno, NV, USA) e injetadas em um cromatógrafo a gás (Varian Aerograph, Walnut Creek, CA, USA) equipado com um detector de condutividade térmica. As alturas dos picos foram comparadas com um padrão comercial contendo 6,96 % de O<sub>2</sub> e 4,91 % de CO<sub>2</sub>, equilibrados com N<sub>2</sub>. Cada tratamento consistindo na exposição a gás foi repetido três ou quatro vezes. Para se minimizar as trocas gasosas (entrada de O<sub>2</sub>) durante o armazenamento, os frascos de vidro de 125 mL foram mantidos em contentores herméticos maiores Ball® jar (0,95 L) contendo a mesma mistura de gases. Utilizando-se este arranjo, os frascos de vidro foram incubados a 50°C por 60 dias. As temperaturas foram monitoradas continuamente com dois *data loggers* digitais (Hobo®, Onset Computer Corp., Bourne, MA, USA) por incubadora. Após este armazenamento, a concentração de O<sub>2</sub> em cada frasco foi novamente determinada como indicativo da hermeticidade do sistema. A atividade de água dos esporos foi medida a 25°C com um medidor de atividade de água (LabMaster-a<sub>w</sub>, Novasina, Pfäffikon, Switzerland) e determinou-se a germinação. A viabilidade foi determinada diretamente suspendendo-se os conídios em pó na solução água-surfactante e dispondo este material sobre o meio extrato de levedura ágar-benomila (yeast extract Agar/benomyl médium – YEA). As soluções (água-surfactante) foram equilibradas com a temperatura ambiente. Após a execução de cada protocolo de reidratação, os blocos de ágar inoculados (sobre lâminas de vidro) foram incubados em placas de Petri parafinadas a 25°C no escuro e as contagens de germinação foram realizadas 24 após a inoculação (p.i.). Considerou-se que os conídios haviam germinado quando um tubo de germe de qualquer tamanho fosse visível em aumento de 400X com iluminação de contraste de fase. No mínimo 200 conídios foram

examinados em vários campos microscópicos para cada replicata de suspensão de cada tratamento experimental.

O experimento foi repetido em uma data diferente, sem o tratamento com 21% de O<sub>2</sub>. Os frascos injetados com gases exceto O<sub>2</sub> em que ocorreu considerável troca gasosa (teor final de O<sub>2</sub>  $f > 3,5\%$ ) foram descartados. Os dados foram transformados em raiz quadrada do arco-seno e analisados utilizando análise de variância com um fator. As médias foram comparadas pelo teste Tukey-Kramer HSD ou teste-t e considerados estatisticamente diferentes no nível de significância de 5%. Os dados foram analisados utilizando o pacote estatístico JMP (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA).

Vê-se na Figura 1 que a atividade de água final para os esporos no primeiro ensaio não variaram com o tratamento de gás ( $P = 0,4150$ ,  $F_{5,13} = 1,1$ ); a média global de atividade de água foi  $0,099 \pm 0,0248$ . Diferenças significativas de germinação foram observadas após 60 dias a 50°C ( $P < 0,0001$ ,  $F_{5,13} = 122,0$ ) e enquanto a exposição a N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> e He produziu viabilidades equivalentes na faixa de 40-51%, taxas de germinação muito baixas ou mesmo a ausência de esporos viáveis foram registradas a 21% e 100% de O<sub>2</sub>, respectivamente.

Como no primeiro ensaio, os tratamentos não produziram diferenças significativas na atividade de água final dos esporos ( $P = 0,29$ ,  $F_{3,11} = 1,4$ ); atividade de água média de  $0,119 \pm 0,0021$  entre os tratamentos. Injeção de 100% de O<sub>2</sub> resultou novamente em nenhum sobrevivente (21% de O<sub>2</sub> não foi testado) O armazenamento com todos os outros gases resultou em viabilidade superior ao tratamento com O<sub>2</sub> porém baixa, equivalente (faixa de 10-13%) (Fig. 1B). Estas taxas de germinação foram marcadamente menores do que a faixa de 49-51% observada no primeiro ensaio, em função da menor atividade de água dos esporos no primeiro experimento. À exceção dos frascos injetados com O<sub>2</sub>, as concentrações de O<sub>2</sub> residual (1,6%-1,9%) não diferiram entre os frascos injetados com gases ( $P = 0,73$ ,  $F_{2,8} = 0,3$ ).

#### Exemplo 2: INJEÇÃO DE CO<sub>2</sub> E N<sub>2</sub> PARA ARMAZENAMENTO DE ESPOROS EM DIFERENTES TEMPERATURAS

Utilizando-se o mesmo arranjo descrito no item anterior, as amostras de esporos foram injetadas com 20% de CO<sub>2</sub> e 80% de N<sub>2</sub>. Testaram-se quatro amostras para cada tratamento quanto ao O<sub>2</sub> residual e atividade de água final após o armazenamento

durante 45, 91, 180 e 240 dias a 40°C. O experimento foi repetido em uma data diferente. Além disso, realizaram-se experimentos separadamente para se investigar os efeitos de armazenamento a 25°C (avaliações aos 46, 120, 180, 365 e 480 dias pós-armazenamento) e 50°C (avaliações aos 15, 30, 47, 75 e 90 dias pós-armazenamento).

5 Em todos os casos, a viabilidade também foi determinada no “dia zero”, ou seja, imediatamente antes do armazenamento em incubadoras a diferentes temperaturas. Diferentes frascos foram amostrados em uma única data de avaliação e, portanto, este estudo não utilizou delineamento com medidas repetidas.

Os dados foram transformados em raiz quadrada do arco-seno e analisados utilizando uma análise de variância com um fator. As médias foram comparadas pelo teste Tukey-Kramer HSD ou teste-t e considerados estatisticamente diferentes no nível de significância de 5%. Os dados foram analisados utilizando o pacote estatístico JMP (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA).

15 No experimento de armazenamento a 25°C observou-se uma significativa queda na viabilidade ( $P = 0,0002$ ,  $F_{5,18} = 8,8$ ), mas o decréscimo foi gradual e pequeno, sendo a viabilidade superior a 90% aos 365 dias, e de 87% aos 480 dias pós-armazenamento, conforme visto na Figura 2. A atividade de água dos esporos aumentou de 0,104 aos 46 dias pós-armazenamento para 0,204 ao final do experimento ( $P < 0,0001$ ,  $F_{[4,15]} = 36,3$ ) e a concentração média de O<sub>2</sub> residual passou de 0,5% a 12,4% ( $P < 0,0001$ ,  $F_{4,15} = 38,0$ ).

20 No experimento a 40°C, registrou-se perda de viabilidade estatisticamente significativa durante os primeiros 3 meses de armazenamento, mas a diminuição foi de somente 6 pontos percentuais (de 93 para 87%). Isto foi seguido por um rápido declínio até 4% de viabilidade aos 240 dias pós-armazenamento (ANOVA  $P < 0,0001$ ,  $F_{4,34} = 361,7$ ). Durante o intervalo entre 45 e 240 dias, a concentração média de O<sub>2</sub> residual aumentou de 1,2% para 6,6% ( $P = 0,0002$ ,  $F_{3,28} = 9,4$ ) e a atividade de água aumentou de 0,104 para 0,145 ( $P < 0,0001$ ,  $F_{3,27} = 35,4$ ).

25 A 50°C, a viabilidade inicial diminuiu rapidamente de 96 para 81% nos primeiros 15 dias, e para cerca de 10% aos 90 dias pós-armazenamento ( $P < 0,0001$ ,  $F_{6,21} = 129,1$ ). O O<sub>2</sub> residual aumentou de 0,8% aos 15 dias para 3,2% aos 90 dias pós-armazenamento ( $P = 0,0074$ ,  $F_{5,18} = 4,5$ ), enquanto a atividade de água dos esporos não

mudou significativamente durante este período (de 0,104 aos 15 dias para 0,098 aos 90 dias;  $P= 0,3448$ ,  $F_{5,18} = 1,2$ ).

### Exemplo 3: INJEÇÃO DE GÁS E EMPREGO DE EMBALAGEM ATIVA (EA)

5 Esporos de *Beauveria bassiana* foram desidratados com NaOH em frascos de vidro de 125 mL por 1 dia a 25°C, resultando em  $0,083 \pm 0,001$  de atividade de água. Várias amostras selecionadas aleatoriamente foram transferidas para frascos de vidro e receberam injeção de N<sub>2</sub>. A perda de O<sub>2</sub> foi reduzida utilizando um sistema de envase duplo com recipientes de vidro. As demais amostras (0,6 g) foram submetidas a um dos  
10 três tratamentos de EA compreendendo: i) bolsas de alumínio (8 x 8,5 cm) com um sachê RP-3A absorvedor de O<sub>2</sub> e umidade; ii) um filme absorvedor de O<sub>2</sub> (código M-0034, lote 19208A, 88.9x63.5x0.3 mm; CSP Technologies, Auburn, AL, USA) mais um filme absorvedor de umidade (CSP Technologies, código M-0026, lote 02208A, 63.5x38.1x0.6 mm) ou; iii) um filme com dupla ação absorvedor de O<sub>2</sub> e umidade (CSP  
15 Technologies, código M-0033, lote 10808A, 76.2x76.2x0.6 mm). Para controle, esporos foram mantidos em bolsas de polietileno de 30 mm de espessura (código P827-2.1.2; Empac Agroindustrial de Plásticos Ltda, Brasília, Brazil) com um sachê RP-3A.

Após o preparo, todas as embalagens com esporos foram pré-incubadas a 25°C por 5 dias e, em seguida, transferidas para 50°C. O O<sub>2</sub> residual dos frascos de vidro  
20 injetados com N<sub>2</sub> foi verificado imediatamente antes da incubação à temperatura elevada. Para todos os tratamentos, três embalagens foram empregadas para determinação destrutiva de atividade de água e da viabilidade dos esporos imediatamente antes da transferência para 50°C. Os esporos foram incubados a 50°C por 56 ou 129 dias. Após o armazenamento, mediu-se a atividade de água e avaliou-se a  
25 viabilidade conidial. Para cada tratamento e data, quatro embalagens preparadas independentemente foram avaliadas destrutivamente e, portanto, não foi adotado delineamento com medidas repetidas.

### Exemplo 4: SACHÊS PARA ATMOSFERA MODIFICADA

Amostras de esporos de *Beauveria bassiana* foram armazenados em frascos de  
30 vidro de 125 mL com o dessecante sulfato de cálcio (Drierite™ indicador de 8-mesh, W.A. Hammond Drierite Co., Xenia, OH, USA) por dois dias a 25°C. A atividade de água dos esporos antes do envase foi de  $0,019 \pm 0,0005$ . Em outro tratamento os esporos

foram mantidos sobre solução saturada de NaCl por 2 dias a 25°C, que resultou em atividade de água de  $0,738 \pm 0,0007$  antes do envase. As amostras foram então transferidas para bolsas laminadas (10x12 cm) contendo um dos seguintes sachês para modificação da atmosfera: absorvedor de O<sub>2</sub> e umidade RP-3A, absorvedor de O<sub>2</sub> Ageless® ZPT 1000 (Mitsubishi Gas Chemical Co., Japan), absorvedor de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> OxyFree™ 504A (Tianhua Tech, China), absorvedor de O<sub>2</sub> e gerador de CO<sub>2</sub> OxyFree™ 504E (Tianhua Tech, China), ou absorvedor de umidade à base de Drierite™ (56,7 g). Como controle foram utilizadas bolsas laminadas sem sachê. As bolsas foram incubadas a 50°C sem o período de pré-incubação, quantificando-se a atividade de água dos esporos e realizou-se a contagem de germinação após 45 dias. Cada tratamento (tipo de sachê vs. atividade de água inicial) foi repetido quatro vezes.

**TABELA 1.** Germinação (%) de esporos de *Beauveria bassiana* determinada após armazenamento por 45 dias a 50°C em bolsas contendo sachês absorvedores e/ou geradores de gases e vapor d'água.

Sachê	Baixa a <sub>w</sub> inicial (0,019)		Elevada a <sub>w</sub> inicial (0,738)	
	A <sub>w</sub> final	%	A <sub>w</sub> final	%
Ageless (absorvedor de O <sub>2</sub> )	0,807± 0,0012 a	0,0% c	0,819± 0,0015 a	0,0% c
Drierite™ (absorvedor de umidade)	0,022± 0,0003 de	5,2±0,7% b	0,023± 0,0007 e	7,3%±1,3% b
RP-3A (absorvedor de O <sub>2</sub> /umidade)	0,019± 0,0003 e	79,0±1,3% a	0,020± 0,0003 e	72,8%±3,2% a
504 A (absorvedor de O <sub>2</sub> e CO <sub>2</sub> )	0,704± 0,0003 c	0,0% c	0,729± 0,0009 c	0,0% c
504 E (absorvedor de O <sub>2</sub> e gerador de CO <sub>2</sub> )	0,761± 0,0035 b	0,0% c	0,798± 0,0024 b	0,0% c
Sem sachê (controle)	0,027± 0,0003 d	3,8±0,4% b	0,709± 0,0012 d	0,0% c

<sup>1</sup>Em cada coluna, médias (±EP) seguidas da mesma letra não são estatisticamente diferentes (Tukey HSD;  $\alpha = 0,05$ ). Germinação determinada através do protocolo de rehidratação rápida.

O uso de vários sachês de atmosfera modificada resultou em diferenças altamente significativas na viabilidade dos esporos, tanto para os de baixa ( $P < 0,0001$ ,  $F_{[5,12]} = 1631,4$ ) quanto os de elevada atividade de água inicial ( $P < 0,0001$ ,  $F_{[5,12]} = 522,4$ ) (Tab. 1). Conforme esperado, considerando-se as capacidades de absorção dos diferentes sachês, a atividade de água final dos esporos nos tratamentos com baixa ou alta atividade de água inicial também foram marcadamente diferentes. O uso de sachês

que liberam umidade durante o armazenamento (Ageless, 504A e 504E) ou que absorveram umidade mas não O<sub>2</sub> (Drierite™) resultou em menor viabilidade quando comparados com o uso de absorvedor de dupla ação, absorvedor de O<sub>2</sub> e umidade (RP-3A).

#### 5 Exemplo 5: COMBINAÇÃO DE SACHÊS DE ATMOSFERA MODIFICADA PARA A EXTENSÃO DA VIDA-DE-PRATELEIRA

10 Amostras de esporos foram secas com Drierite™ por 2 dias a 25°C (resultando em atividade de água de 0,020±0,0008) e então transferidas para bolsas laminadas de 16x20 cm com diferentes sachês: RP-5A para absorção de O<sub>2</sub> e umidade (mesma composição do RP-3A, mas indicado para embalagens maiores), 504E para absorção de O<sub>2</sub> e geração de CO<sub>2</sub> ou um sachê 504E mais um sachê de Drierite™ (56,7 g). Cada tratamento foi repetido três vezes e determinou-se a atividade de água dos esporos bem como a germinação após 148 e 180 dias pós-armazenamento a 40°C.

15 O sachê que absorve O<sub>2</sub>, mas libera umidade (504E) foi eficiente quando testado em conjunto com um dessecante (Drierite™), mas o uso isolado do sachê 504E resultou em perda total da viabilidade (Tab. 2). A estratégia de uso consorciado de sachês foi tão boa quanto o uso do sachê de dupla ação (RP-5A), tanto aos 148 dias ( $P < 0,0001$ ,  $F_{2,6} = 309,0$ ) quanto aos 178 dias pós-armazenamento a 40°C ( $P < 0,0001$ ,  $F_{2,6} = 2,035$ ).

20 **TABELA 2.** Efeito de um absorvedor de O<sub>2</sub> e gerador de CO<sub>2</sub>, com ou sem sachê dessecante, sobre a atividade de água e a viabilidade de esporos de *Beauveria bassiana* armazenados a 40°C durante 5 ou 6 meses.

Sachê	Dia 148		Dia 178	
	A <sub>w</sub> final <sup>1</sup>	%	A <sub>w</sub> final <sup>1</sup>	%
504 E (absorvedor de O <sub>2</sub> e gerador de CO <sub>2</sub> )	0,793± 0,0038 a	0,0% b	0,809± 0,0168 a	0,0% b
504E + Drierite™ (absorvedor de umidade)	0,030± 0,0003 b	81,0±4,5% a	0,030± 0,0003 b	79,3±1,9% a
RP-5A (absorvedor de O <sub>2</sub> /umidade)	0,026± 0,0000 b	83,5±2,2% a	0,028± 0,0003 b	81,8±0,4% a

<sup>1</sup>A<sub>w</sub> inicial foi de 0,020±0,0008, e esporos não foram pré-incubados em temperatura moderada antes de exposição a 40 °C.

25 <sup>2</sup>Em cada coluna, médias (±EP) seguidas da mesma letra não são estatisticamente diferentes (Tukey HSD;  $\alpha = 0,05$ ). Germinação determinada por meio do protocolo de rehidratação rápida.

### Exemplo 6: EFEITO DO PERÍODO DE EQUILÍBRIO SOBRE A VIDA-DE-PRATELEIRA

Os esporos puros de *Beauveria bassiana* tiveram a sua atividade de água equilibrada no interior da embalagem antes de serem expostos a regimes de temperatura elevada. As amostras de *Beauveria bassiana* foram mantidas em Drierite™ ou NaCl por 2 dias a 25°C, resultando em atividade de água de  $0,020 \pm 0,0008$  e  $0,740 \pm 0,0018$ , respectivamente. Então, os esporos foram transferidos para bolsas laminadas cada uma contendo um sachê RP-3A (absorvedor de O<sub>2</sub> e umidade) e pré-incubados por um período adicional de 5 dias a 25°C antes de serem armazenados nas temperaturas-alvo (25, 40 e 50°C). De maneira alternativa, amostras foram mantidas em Drierite™ ou NaCl por 7 dias a 25°C, transferidas para bolsas laminadas contendo sachês RP-3A e imediatamente armazenadas nas temperaturas-alvo sem o período de equilíbrio de 5 dias a 25°C. Cada tratamento foi repetido quatro vezes e medições da atividade de água e da viabilidade foram realizadas aos 60 dias a 50°C e 180 dias a 25 ou 40°C.

A atividade de água final dos esporos não variou entre os tratamentos em cada temperatura de armazenamento (Tab. 3). Percentagens de germinação após 180 dias a 25°C foram elevadas (91-94%) para todos os tratamentos, exceto para o tratamento com alta atividade de água inicial e sem o período de equilíbrio, que teve sua viabilidade reduzida para 88%. Após 180 dias a 40°C, a viabilidade foi de 87-89% para a maioria dos tratamentos mas significativamente menor (75%) no tratamento com elevada atividade de água inicial e sem o período de equilíbrio ( $P = 0,0068$ ,  $F_{3,8} = 8,7$ ). Finalmente, após 60 dias a 50°C observou-se a mesma tendência, com as viabilidades para quase todos os tratamentos na faixa de 83-86%, exceto para o tratamento de alta atividade de água inicial e sem o período de equilíbrio, que teve sua viabilidade significativamente reduzida para 60% ( $P < 0,0001$ ,  $F_{3,8} = 37,8$ ).

As vidas-de-prateleira observadas no presente estudo são consideravelmente superiores às obtidas anteriormente. Atmosferas modificadas após a injeção de outros gases que não O<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> e He) resultaram em viabilidades comparáveis após 2 meses de armazenamento a 50°C. Quando se testou uma atmosfera com 20 % de CO<sub>2</sub> (+ 80% N<sub>2</sub>) em frascos, os tempos para a viabilidade dos esporos cair para 80% foram superiores a 91 e a 15 dias à temperatura de 40 e 50°C, respectivamente. Esses tempos são similares para as estimativas obtidas a partir dos dados publicados por Hong et al.

(2001) (Hong, T.D., et al.. The effect of storage environment on the longevity of conidia of *Beauveria bassiana*. *Mycological Research* v. 105, p. 597-602, 2001), sugerindo que os esporos desidratados a até 5% de umidade e armazenados com ar atmosférico em embalagens hermeticamente fechadas retiveram 80% da viabilidade por 80 e 17 dias a 40 e 50°C, respectivamente. Estas foram, até então, as vidas-de-prateleira mais longas já registradas para esta espécie de fungo em temperaturas elevadas. Entretanto, quando se utilizou a embalagem ativa (com sachês que absorvem tanto O<sub>2</sub> quanto umidade em embalagens herméticas) e introduzi-se um período de equilíbrio, a viabilidade atingiu valores inéditos, variando de 80 e 90% após 6 meses a 40°C, ou 2 meses a 50°C.

10 **TABELA 3.** Efeito de atividade de água inicial e do período de equilíbrio (pré-incubação) sobre a germinação de esporos de *Beauveria bassiana* armazenados em bolsas laminadas contendo sachê absorvedor de O<sub>2</sub> e umidade.

Condição	180 dias a 25 °C		180 dias a 40 °C		60 dias a 50 °C	
	A <sub>w</sub> final <sup>2</sup>	%	A <sub>w</sub> final <sup>2</sup>	%	A <sub>w</sub> final <sup>2</sup>	%
A <sub>w</sub> inicial baixa / pré-incubação	0,029± 0,0000 a	93,2±0,4 % ab	0,028± 0,0003 a	87,8±0,9% a	0,022± 0,0000	84,8±3 ,5% a
A <sub>w</sub> inicial baixa / sem pré-incubação	0,029± 0,0003 a	94,0±1,1 % a	0,028± 0,0003 a	88,8±0,8% a	0,022± 0,0000	86,3±3 ,8% a
A <sub>w</sub> inicial alta / pré-incubação	0,029± 0,0000 a	91,0±1,3 % ab	0,028± 0,0000 a	88,0±2,6% a	0,021± 0,0000	82,5±1 ,0% a
A <sub>w</sub> inicial alta / sem pré-incubação	0,029± 0,0003 a	88,3±0,4 % b	0,028± 0,0003 a	75,3±2,2% b	0,021± 0,0000	60,0±3 ,0% b

<sup>1</sup>Em cada coluna, médias (±EP) seguidas da mesma letra não são estatisticamente diferentes (Tukey HSD;  $\alpha = 0,05$ ). Germinação determinada através do protocolo de rehidratação rápida.

<sup>2</sup>A<sub>w</sub> inicial baixa e alta foram 0,020±0,0008 e 0,740±0,0018, respectivamente.

A vida-de-prateleira do micoherbicida *Sclerotinia minor* juntamente com o seu substrato também aumentou substancialmente quando o ar ambiente foi substituído por CO<sub>2</sub> e N<sub>2</sub> ou um dos dois gases (Teshler, M. P., et al. Increased shelf life of a bioherbicide through combining modified atmosphere packaging and low temperatures. *Biocontrol Science and Technology* 17, 387-400, 2007). Do mesmo modo, as vidas-de-prateleira de *pellets* de alginato com micélios secos a ar dos fungos nemotófagos *Paecilomyces lilacinus* e *Pochonia chlamydospora* aumentaram quando sob vácuo, CO<sub>2</sub> ou ambientes ricos em N<sub>2</sub> se comparados com o ar atmosférico (Duan, W., Yang, E., Xiang, M., Liu, X. Effect of storage conditions on the survival of two potential

biocontrol agents of nematodes, the fungi *Paecilomyces lilacinus* and *Pochonia chlamydosporia*. *Biocontrol Science and Technology*, v. 18, p. 605-612, 2008). De acordo com esses autores, a remoção do O<sub>2</sub> reduz a velocidade do metabolismo e limita reações oxidativas, permitindo a extensão da vida-de-prateleira dos fungos.

5 Observou-se que atmosferas em que o ar foi substituído por CO<sub>2</sub> e N<sub>2</sub> aumentaram a longevidade de esporos de *Beauveria bassiana*. As tentativas anteriores de estender a vida-de-prateleira desta espécie foram conduzidas na presença de ar, apesar dos efeitos benéficos da retirada de O<sub>2</sub> (ou aumento da concentração de CO<sub>2</sub>) durante a vida-de-prateleira de curto prazo do fungo *Metarhizium anisopliae* ter sido  
10 demonstrado há décadas por Clerk e Madelin (1965) (Clerk, C.G.; Madelin, M.F. The longevity of conidia of three insect-parasitizing hyphomycetes. *Transactions of the British Mycological Society* 48, 193-209, 1965). A patente US5989898 revela que esporos de *Metarhizium* desidratados com Drierite™ armazenados em atmosferas supostamente sem O<sub>2</sub> obtidas pelo uso do sachê Ageless inseridos em bolsas  
15 impermeáveis a umidade e gás mostraram 74% de viabilidade após 2 meses a 37°C, e não apresentaram nenhuma viabilidade se mantidos em bolsas sem absorvedor de O<sub>2</sub> ou com umidade relativa do ar elevada, variando de 40 a 100%. Leite et al. (2002) (Leite, L.G., et al. Preservação de micélio de *Batkoa* sp. e *Furia* sp. (*Entomophthorales*) em combinação com dessecantes e redutores de oxigênio. *Arquivos do Instituto Biológico*  
20 69, 117-122, 2002) preservaram micélios secos de *Batkoa* sp. e *Furia* sp. durante 3 meses a 23 °C utilizando-se Ageless e sílica gel, mas não se conhecem estudos complementares sobre embalagem de fungos entomopatogênicos em atmosfera modificada.

Em embalagens não herméticas a disponibilidade de ar aos esporos é  
25 significativa (Hong, T.D., et al. Saturated salt solutions for humidity control and the survival of dry powder and oil formulations of *Beauveria bassiana* conidia. *Journal of Invertebrate Pathology* v. 89, p. 136-143, 2005) e, conseqüentemente, os resultados observados para longevidade dos esporos são desestimuladores. A presente invenção mostrou que a adoção de polímeros plásticos com alta permeabilidade a O<sub>2</sub> e umidade  
30 são totalmente indesejáveis para embalagem de micopesticidas, mesmo se combinados com um eficiente sachê para embalagem ativa. A injeção de gás (por 40 min) em recipientes de vidro mostrou-se muito mais eficiente que o emprego de embalagens não-

herméticas, porém menos eficiente que o emprego de laminados (+ sachês de embalagem ativa) para a extensão da vida-de-prateleira de esporos de *Beauveria bassiana* na presente tecnologia devido à presença de atividade de água maior do que a desejada após a injeção de gás, a trocas de ar com o ambiente externo e devido à incapacidade de os protocolos de injeção de gás utilizados em permitir maior retirada do O<sub>2</sub> presente nas embalagens. O estudo de Teshler et al. (2007) (Teshler, M. P. et al. Increased shelf life of a bioherbicide through combining modified atmosphere packaging and low temperatures. *Biocontrol Science and Technology* 17, 387-400, 2007). revelou que a concentração de O<sub>2</sub> residual foi de 0,26% após injeção de gás em embalagens laminadas. A atividade de água permaneceu em níveis baixos e constantes após o envase hermético com alumínio e o uso de um absorvedor de O<sub>2</sub> e umidade eficiente. Em organismos anidrobióticos, podem ocorrer reações enzimáticas isoladas que levam à produção de radicais livres e reações não-enzimáticas mediadas por estes radicais livres. Por exemplo, podem ocorrer reações de degradação de fosfolipídios, com acúmulo de seus subprodutos (ácidos graxos) nas membranas (McKersie, B.D. et al. Senaratna, T., Walker, M.A., Kendall, E.J., Hetherington, P.R. Deterioration of membranes during aging in plants: Evidence for free radical mediation. In: L.D. Noodén, L.D., Leopold, A.C. (Eds.), *Senescence and Aging in Plants*. San Diego: Academic Press, , p. 442-464, 1988). No entanto, o envelhecimento sob condições atmosféricas isentas de O<sub>2</sub> e extremamente secas é consideravelmente mais lento do que sob condições não herméticas.

A maioria dos sachês de embalagem ativa utilizados na indústria de alimentos testada não foi efetiva para estender a viabilidade de esporos de *Beauveria bassiana*, seja porque os níveis de atividade de água dos esporos aumentaram até níveis indesejáveis ou porque O<sub>2</sub> não foi reduzido para níveis baixos. Um sachê com dupla ação, capaz de absorver O<sub>2</sub> e umidade, foi mais eficiente que sachês que possuem somente um único atributo. Apesar de CO<sub>2</sub> ser conhecido por possuir atividade fungistática sobre alguns fungos em crescimento (Tabak and Cooke, 1968; Abellana et al., 2000), nenhum efeito deletério foi observado sobre esporos entomopatogênicos armazenados, o que sugere a possibilidade do uso de embalagem ativa mediante sachês absorvedores de O<sub>2</sub> e emissores de CO<sub>2</sub>.

A vida-de-prateleira de aproximadamente um ano foi registrada para o relativamente termotolerante *M. acridum* com umidade de 6,2% (mas o mesmo não foi alcançado para esporos com 7,0% de teor d'água) a 27-32°C e armazenado sob vácuo (Hong et al., 1999), bem como para formulações oleosas de *Beauveria bassiana* a 25°C (Wraight et al, 2001). Na presente invenção chegou-se a 6 meses de vida-de-prateleira para esporos com 2,1-2,4% de umidade acondicionados em embalagem ativa, o que é tempo suficiente para distribuições em regiões com temperaturas médias efetivas próximas a 40°C. Os experimentos também foram realizados a 50°C. Temperaturas iguais ou superiores a esta podem ser atingidas em certas regiões (Hong, T.D., Ellis, R.H., Moore, D. Development of a model to predict the effect of temperature and moisture on fungal spore longevity. *Annals of Botany*, v. 79, p. 121-128, 1997) ou durante o transporte (Ostrem and Godshall, 1979).

Além de fatores intrinsicamente relacionados ao armazenamento, fatores pré-armazenamento tais como a qualidade inicial dos propágulos de fungos, que por sua vez é influenciada pelas condições da cultura (Agosin, E. et al.. Effect of culture conditions on spore shelf life of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* v. 13, p. 225-232, 1997; Frey, S., Magan, N. Production of the fungal biocontrol agent *Ulocladium atrum* by submerged fermentation: accumulation of endogenous reserves and shelf-life studies. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 56, p. 372-377, 2001; Tarocco et al. Optimization of erythritol and glycerol accumulation in conidia of *Beauveria bassiana* by solid-state fermentation, using response surface methodology. *Applied Microbiology and Biotechnology* v.68, p. 481-488, 2005), processos de secagem e coleta (Sandoval-Coronado, C.F. et al. Drying and formulation of blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* (Hyphomycetes) produced in two different liquid media. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* v. 17, p. 423-428, 2001; Bateman, R. Constraints and enabling technologies for mycopesticide development. *Outlooks on Pest Management* April, p. 64-69. 2004; Jackson, M.A., Payne A.R.,. Evaluation of the desiccation tolerance of blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) using a lab-scale, air-drying chamber with controlled relative humidity. *Biocontrol Science and Technology*, v. 17, p. 709-719, 2007.) e formulação (Sandoval-Coronado, C.F., Luna-Olvera, H.A., Arevalo-Nino, K., Jackson, M.A., Poprawski, T.J.,

Galan-Wong, L.J.,. Drying and formulation of blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* (Hyphomycetes) produced in two different liquid media. World Journal of Microbiology and Biotechnology v. 17, p. 423-428, 2001; Batta, Y.A. Production and testing of novel formulations of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschinkoff) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes). Crop Protection, v. 22, p. 415-422, 2003; Friesen, T. J. et al. Effect of conditions and protectants on the survival of *Penicillium bilaiae* during storage. Biocontrol Science and Technology, v. 16, p. 89-98, 2006) têm profundo impacto sobre a longevidade. Esta invenção mostrou que é necessária a secagem de esporos embalados e submetidos a condições moderadas antes da exposição a regimes de alta temperatura para que a elevada atividade de água inicial atinja os níveis desejados e, assim, evitar a morte prematura ou debilitação dos esporos. Fatores pós-armazenamento, tais como o protocolo de germinação, embora não diretamente relacionados à vida-de-prateleira, podem resultar em viabilidades errôneas se não realizados de maneira apropriada. As vidas-de-prateleira apresentadas neste exemplo foram estimadas com ênfase em um protocolo de rehidratação rápida (sem prévia exposição dos esporos a um regime de rehidratação lenta dentro de uma câmara úmida por 24 h).

A atividade de água dos esporos pré-desidratados mantidos em bolsas herméticas com Drierite™ ou absorvedor de O<sub>2</sub> e umidade estiveram consistentemente na faixa de 0,019-0,030 (umidade relativa de equilíbrio de 1,9-3,0%). Esta pequena variação foi observada entre as leituras realizadas no inverno (ar do laboratório mais frio e seco) e estações com maior temperatura e umidade relativa. A importância de desidratar os esporos aéreos de fungos para estender a vida-de-prateleira foi demonstrada previamente (Clerk, C.G.; Madelin, M.F. The longevity of conidia of three insect-parasitizing hyphomycetes. Transactions of the British Mycological Society 48, 193-209, 1965; Feng, M.G., Poprawski, T.J., Khachatourians, G.G. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. Biocontrol Science and Technology v. 4, p. 3-34, 1994; Shimizu, S.; Mitani, T. Effects of temperature on viability of conidia from *Beauveria bassiana* in oil formulations. Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology v. 44, p.51-53, 2000). Nos estudos com armazenamento hermético em que o ar não foi retirado das embalagens (Hong, T.D., et al. Gunn, J.. The effect of storage environment

on the longevity of conidia of *Beauveria bassiana*. Mycological Research 105, 597-602, 2001) relataram que a longevidade de dois isolados de *Beauveria bassiana* não aumentou significativamente quando o conteúdo de umidade no armazenamento reduziu para valores abaixo da faixa de 4,6-5,2%, em equilíbrio com umidade relativas de 11-14% a 20°C. Neste estudo, a melhor atividade de água dos esporos foi consistentemente associada ao Drierite™, que tem conteúdo de umidade consideravelmente menor que 5%. Os resultados obtidos na presente invenção sugerem que sob condições praticamente anaeróbicas (< 0,03% O<sub>2</sub>) atividades de água ótimas para armazenamento são menores do que sob atmosferas aeróbicas.

## REIVINDICAÇÕES

1. Método de embalagem de esporos de fungos, caracterizado por compreender as etapas de: (i) redução da atividade de água dos esporos para níveis muito baixos; (ii) envase dos esporos em embalagens impermeáveis a gases e vapor de água com sachê  
5 absorvedor de oxigênio e de umidade; (iii) opcionalmente realizar a combinação de dois ou mais sachês de propriedades diferentes; iv) manutenção dos esporos na embalagem durante no mínimo dois ou mais dias a 25°C ou outra temperatura viável aos organismos.
2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por dito sachê ser atóxico aos  
10 esporos.
3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ditos sachês de propriedades diferentes consistirem de sachê absorvedor de umidade e sachê absorvedor de oxigênio.
4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ditos sachês de  
15 propriedades diferentes consistirem de sachê absorvedor de oxigênio e sachê gerador de dióxido de carbono.
5. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ditos sachês de propriedades diferentes consistirem de sachê absorvedor de umidade e sachê conversor de oxigênio em dióxido de carbono.
- 20 6. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por dito sachê absorvedor de oxigênio ser selecionado do grupo que consiste de saches da série RP, Ageless® ZPT 1000 e OxyFree™ 504.
7. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por dito sachê absorvedor de umidade ser selecionado do grupo que consiste de sachês da série RP, sulfato de cálcio  
25 ou sílica gel.
8. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por dito sachê absorvedor de oxigênio e de umidade ser selecionado do grupo que consiste de sachês da série RP.
9. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ditas embalagens impermeáveis a gases e vapor de água serem selecionadas do grupo consistindo de  
30 vidro, materiais laminados contendo alumínio ou cerâmica ou outros materiais impermeáveis a gases e vapor d'água.

10. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ditos níveis de atividade de água serem inferiores a 0,1, preferencialmente próximos a 0,03.
11. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ditos esporos serem selecionados do grupo de gêneros *Metarhizium*, *Beauveria*, *Isaria*, *Lecanicillium*, *Nomuraea* e *Trichoderma*.
12. Esporos dos gêneros *Metarhizium*, *Beauveria*, *Isaria*, *Lecanicillium*, *Nomuraea* e *Trichoderma* com vida-de-prateleira aumentada de acordo com método descrito na reivindicação 1.
13. Uma embalagem selada compreendendo em seu interior: (i) esporos viáveis de fungos; e (ii) um ambiente com teor de umidade inicial reduzido pelo uso de sachês e com um período de estocagem em uma temperatura adequada em embalagens impermeáveis a gases e vapor de água com sachê absorvedor de oxigênio e de umidade. Opcionalmente realizar a combinação de dois ou mais sachês de propriedades diferentes.
14. Embalagem de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por dito sachê ser atóxico aos esporos.
15. Embalagem de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por ditos sachês de propriedades diferentes consistirem de sachê absorvedor de umidade e sachê absorvedor de oxigênio.
16. Embalagem de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por ditos sachês de propriedades diferentes consistirem de sachê absorvedor de oxigênio e sachê gerador de dióxido de carbono.
17. Embalagem de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por ditos sachês de propriedades diferentes consistirem de sachê absorvedor de umidade e sachê conversor de oxigênio em dióxido de carbono.
18. Embalagem de acordo com a reivindicação 13, caracterizada por tal ambiente permitir a redução da atividade de água dos esporos até valores inferiores a 0,1, preferencialmente, próximos a 0,03.
19. Embalagem de acordo com a reivindicação 13, caracterizada por dito período de estocagem compreender períodos, preferencialmente, superiores a 2 dias.
20. Embalagem de acordo com a reivindicação 13, caracterizada por dita estocagem ocorrer a 25°C ou outra temperatura viável aos organismos.

21. Embalagem de acordo com a reivindicação 13, caracterizada por dito sachê  
65 absorvedor de oxigênio ser selecionado do grupo que consiste de sachês da série RP,  
Ageless® ZPT 1000 e OxyFree™ 504.
22. Embalagem de acordo com a reivindicação 13, caracterizada por dito sachê  
absorvedor de umidade ser selecionado do grupo que consiste de sachês da série RP,  
sulfato de cálcio e sílica gel.
- 70 23. Embalagem de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por dito sachê  
absorvedor de oxigênio e de umidade ser selecionado do grupo consistindo de sachês da  
série RP.
24. Embalagem de acordo com a reivindicação 13, caracterizada por ditas embalagens  
impermeáveis a gases e vapor de água serem selecionadas do grupo que consiste de  
75 vidro, materiais laminados contendo alumínio ou cerâmica ou outros materiais  
impermeáveis a gases e vapor d'água.

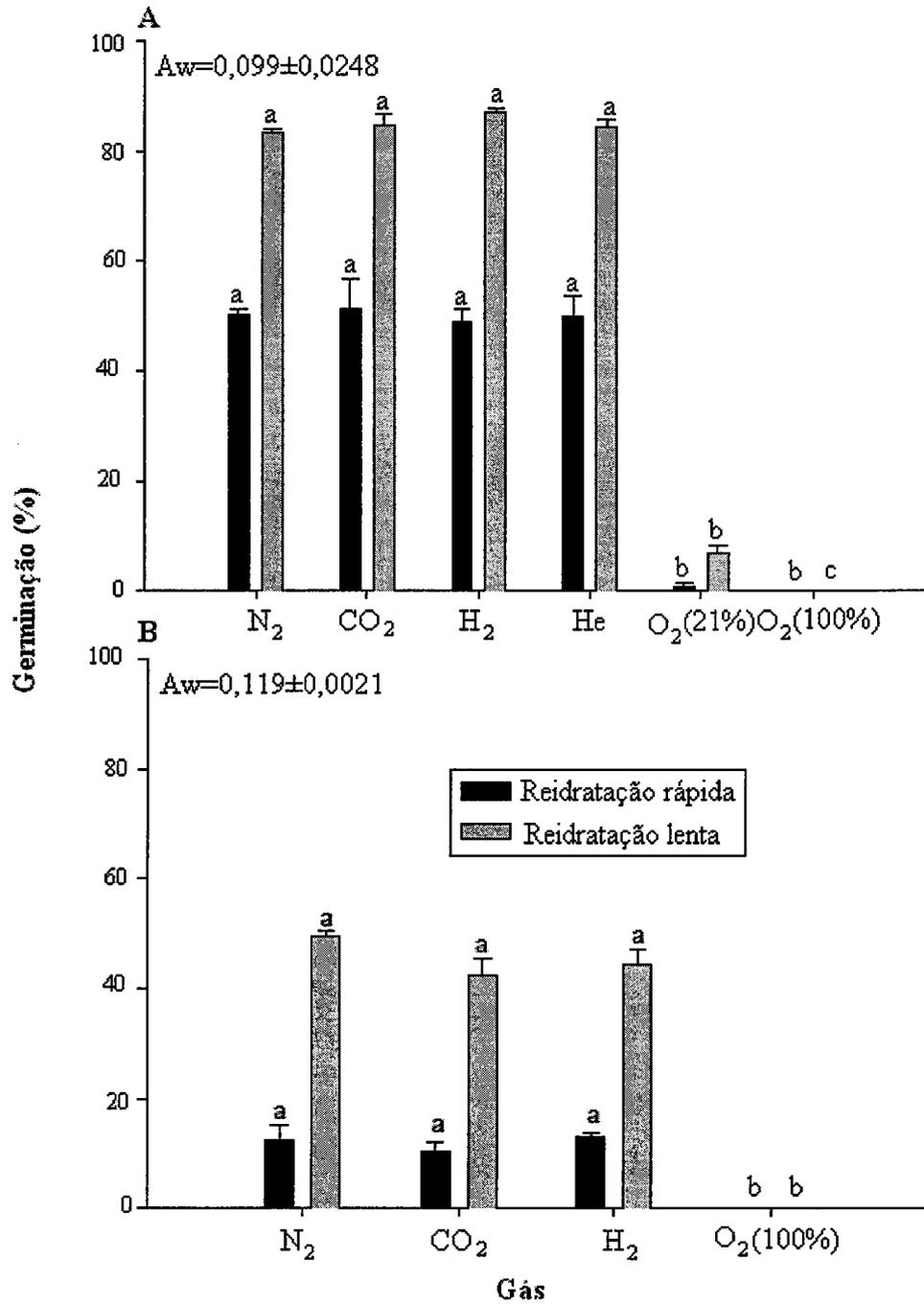


Figura 1

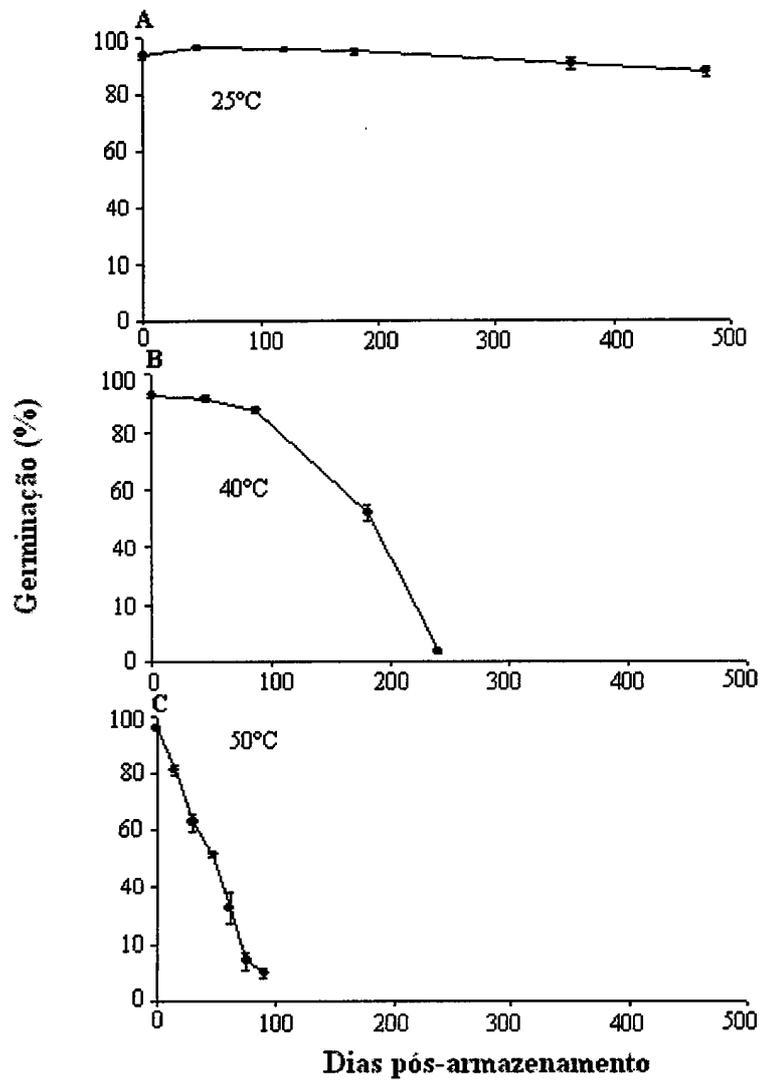


Figura 2

**RESUMO****EMBALAGEM EM ATMOSFERA MODIFICADA PARA AUMENTO DA  
VIDA-DE-PRATELEIRA DE FUNGOS**

A presente invenção refere-se a um método de embalagem para aumento da vida-de-  
5 prateleira de esporos de fungos, aos esporos de fungos obtidos por tal método e à  
embalagem que contém tais esporos. O método de embalagem compreende as etapas de  
redução atividade de água dos esporos para uma faixa de atividade de água viável aos  
organismos, envase dos esporos em embalagens impermeáveis a gases e vapor d'água  
contendo sachês que promovam atmosfera de baixa atividade de água e baixo teor de  
10 oxigênio absorvedores de oxigênio e de umidade e manutenção dos esporos na  
embalagem durante algum tempo em temperatura viável aos organismos.