

Desafios da técnica de obtenção de microesferas de Bacillus Thuringiensis Israelensis associado a óleo essencial de Croton Rhamnifolioides

Challenges of Bacillus Thuringiensis Israelensis Microsphere techniques associated with Croton Rhamnifolioids essential oil

DOI:10.34117/bjdv7n6-610

Recebimento dos originais: 25/05/2021

Aceitação para publicação: 25/06/2021

Silvana Souza da Cunha Cavalcante

Mestre em Gestão e Política Ambiental pelo IFPE
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco
Endereço: Rua Gameleira, 103, casa 06 – Janga – Paulista – PE
E-mail: silvana_cunha@hotmail.com

Ronaldo Faustino da Silva

Doutor em Engenharia Civil pela UPE
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco
Av. Professor Luiz Freire, 500, CDU-Recife-PE
E-mail: ronaldofaustino@recife.ifpe.edu.br

Sofia Suely Ferreira Brandão Rodrigues

Doutora em Ciências Biológicas pela UFPE
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco
Av. Professor Luiz Freire, 500, CDU-Recife-PE
E-mail: sofiabrandao@recife.ifpe.edu.br

Nereide Stela Santos-Magalhães

Doutora em Ciências Farmacêuticas - Université Paris-Sud 11
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) / Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA)
Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife-PE, Brasil.
E-mail: nssm@ufpe.br

Maria Alice Varjal de Melo Santos

Doutora em Saúde Pública pelo Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz
FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Aggeu Magalhães
Av. Prof. Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária, Recife – PE
E-mail: mavarjal@cpqam.fiocruz.br

Milena Sales Ferraz

Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) / Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA)
Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife-PE, Brasil
E-mail: milenasferraz@yahoo.com.br

Laura da Silva Moura

Técnica em Química pelo IFPE
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco
Rua José Alves Bezerra, 218 - Guararapes, Jaboatão dos Guararapes, PE
E-mail: laurasmou@gmail.com

Eduardo José Alécio de Oliveira

Doutor em Ciências Biológicas pela UFPE
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco
Av. Professor Luiz Freire, 500, CDU-Recife-PE
E-mail: eduardoalecio@recife.ifpe.edu.br

RESUMO

No intuito de combater o mosquito *Aedes aegypti* métodos de controle têm sido testados para substituir o uso de inseticidas químicos, que provocam degradação ambiental e uma alta resistência dos mosquitos frente a tais produtos. Assim, o uso de produtos naturais como óleos essenciais e biolarvicidas tem sido uma alternativa aos produtos químicos convencionais. No entanto, tais produtos apresentam limitações decorrentes da baixa solubilidade em água, alta volatilidade ou degradação por exposição à radiação solar. Para minimizar estas incompatibilidades, a técnica de microencapsulamento é adotada como proteção, evitando o efeito de exposição inadequada dos ingredientes ativos. A produção de microencapsulados tem diversas etapas e desafios a serem suplantados, o que se buscou apresentar neste trabalho. Microesferas de *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) associadas ao óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* foram preparadas através do método de coacervação simples por gotejamento da suspensão bioativa em alginato de sódio a 1% e 2% em meio com CaCl_2 . Os testes larvicidas com *A. aegypti* em estágio L3 foram realizados tanto no pó seco, resultado do biocultivo, como das microesferas formuladas com este ativo e o óleo essencial. A CL 50 e a CL 90 do pó seco foram de 0,12 mg/L e 0,21 mg/L, respectivamente, cuja atividades se mantiveram após um período de conservação de um ano a -10°C . As microesferas de Bti, Bti + óleo essencial de *C. rhamnifolioides* e microesferas de óleo de *C. rhamnifolioides* em alginato a 2% não apresentaram atividade larvicida, enquanto as microesferas preparadas em alginato a 1% apresentaram 90% de mortalidade, quando se utilizou 3×10^4 UFC/g Bti imobilizado. Os resultados obtidos mostraram viabilidade para o uso de microesferas de Bti associado ao óleo essencial de *C. rhamnifolioides* para o controle de *Aedes Aegypti*. Diante dos resultados obtidos, os desafios da técnica de microencapsulamento foram estudados para o estabelecimento de parâmetros de tempo de exposição, armazenamento e concentrações na obtenção de microesferas com eficiência larvicida.

Palavras-Chave: *Aedes Aegypti*, Controle Ambiental, Biolarvicida, Microesferas.

ABSTRACT

In order to combat *Aedes aegypti* control methods have been tested to replace the use of chemical insecticides, which cause environmental degradation and a high resistance of mosquitoes to such products. Thus, the use of natural products such as oil essential and biolarvicide has been an alternative to conventional chemicals. However, such products have limitations due to low water solubility, high volatility and degradation by exposure to light. To minimize incompatibilities, microencapsulation techniques are adopted as a protection, avoiding the effect of inappropriate exposure of the active substance. In this work, *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) were produced associated with essential oil

Croton rhamnifolioides. The microspheres were obtained through the simple coacervation method by dripping the suspensions in sodium alginate at 1% and 2% in CaCl_2 medium. Larvicidal tests with *A. aegypti* in stage L3 were carried out both on the dry powder resulting from bioculture and on the microspheres formulated with this asset and the essential oil. The LC 50 and LC 90 were, respectively, 0.12 mg / L and 0.21 mg / L, whose activity was maintained after a period of one year of storage at -10°C . Bti, Bti + *Croton rhamnifolioides* oil microspheres and *Croton rhamnifolioides* oil microspheres in 2% alginate did not show mortality, while 1% alginate microspheres showed 90% mortality at 3×10^4 UFC / g immobilized Bti . The results obtained showed viability for the use of Bti microspheres associated with essential oil *C. rhamnifolioides* for the control of *Aedes Aegypti*. Challenges of the microencapsulation technique were studied to establish as the parameters of exposure time, storage and concentrations in obtaining microspheres with larvicidal efficiency.

Keywords: *Aedes Aegypti*, Biolarvicide, Environmental Control, Microspheres.

1 INTRODUÇÃO

Mais da metade da população mundial vive em áreas onde o mosquito da espécie *Aedes aegypti* está presente. *A. aegypti* é a principal espécie de mosquito que transmite os vírus da zika, dengue, chikungunya e febre amarela para os seres humanos. Normalmente tem como predominância locais altamente povoados, mas, ao longo dos anos, também está se apresentando em locais menos habitados (MONTAGNER et al., 2018). No entanto, o controle do vetor ainda é imprescindível para prevenir essas doenças, e seu papel em saúde pública é o de prevenir a infecção mediante o bloqueio ou a redução da transmissão (BRAGA; VALLE, 2007).

Uma das principais táticas adotadas para o combate ao mosquito é o uso intenso de pesticidas químicos (POLANCZYK, 2003). Contudo, o uso desses produtos vem causando impactos negativos como a resistência fisiológica desenvolvida pelas larvas, a poluição ambiental, a contaminação da cadeia alimentar e os efeitos nocivos a outros insetos benéficos (GWAL et al., 2015), com uma evolução mundial na resistência em muitas populações de *A. aegypti* (VONTAS et al., 2012). Entre as alternativas, os agentes biológicos vêm sendo usados nesse combate, a exemplo da aplicação de fungos, bactérias, vírus e extratos de plantas (VIANA et al., 2020).

Bacillus thuringiensis israelensis (Bti) é um biolarvicide não tóxico ao ser humano e ao meio ambiente, e é uma das bactérias entomopatogênicas eficaz para o controle biológico, o que as habilitam para aplicação em água potável no combate às larvas de mosquitos (VIANA et al., 2020; BRAGA; VALLE, 2007). Além disso, o Bti apresenta vantagens como não poluir o meio ambiente, preservar a fauna associada e possuir

propriedades tóxicas contra os vetores da família Culicidae (como o *Aedes aegypti*) e Simuliidae (PINTO et al., 2009), chamados de borrachudos como a espécie *Simulium orbitale* (BUFFOLO et al., 2016).

Bti exerce um efeito letal através de uma variedade de toxinas que são ingeridas pelas larvas e ativadas no intestino, causando ruptura das membranas celulares e morte (BOYCE et al., 2013). A variedade das toxinas e a complexidade do mecanismo de ação do Bti proporcionam a redução da resistência dos insetos à ação inseticida (ROH et al., 2007). Além do uso dos biolarvicidas, substâncias naturais como os óleos essenciais têm sido testados na expectativa do desenvolvimento de inseticidas naturais (KANIS et al., 2012; MAR et al., 2018).

Os óleos essenciais são compostos naturais voláteis extraídos de diferentes variedades de plantas. Sua composição química varia, pois depende de cada espécie e até mesmo da parte da planta de onde é extraído. Predominam em sua composição os derivados terpênicos, como os mono e sesquiterpenos, e os fenilpropanóides (MIRANDA et al., 2016). Os óleos essenciais podem apresentar propriedades biológicas, tais como larvicida, antioxidante, analgésica e anti-inflamatória, fungicida ou antitumoral, o que já os torna bastante utilizados na indústria farmacêutica (COSTA et al., 2013). No entanto, apresentam algumas limitações, como baixa solubilidade em água, rápida volatilização e oxidação dos constituintes químicos, o que sugere a utilização de sistemas carreadores como as microcápsulas para uma melhor efetividade em seu uso (GONSALVES et al., 2009).

A microencapsulação atua como uma proteção, evitando o efeito de exposição inadequada do componente ativo (SILVA et al., 2014). A técnica da microencapsulação vem sendo usada para substâncias que são sensíveis a temperatura, oxidação, umidade e outras reações indesejáveis, permitindo que a liberação ocorra no local e no tempo correto, utilizando o máximo potencial do ativo (GONSALVES et al., 2009).

A microencapsulação é uma maneira promissora de preparar o Bti para uso no campo. Não apenas por resistir à radiação ultravioleta, mas também por melhorar a liberação lenta do produto, assim como estender o período do efeito residual. A microencapsulação com alginato de sódio é o método mais estudado e eficaz, ocorrendo quando uma solução de alginato de sódio contendo o ativo é titulada na presença de solução de CaCl_2 para obtenção das microcápsulas (ZHANG, 2016).

O presente trabalho visou demonstrar os desafios encontrados durante a produção de microesferas de Bti associado a óleo essencial de *C. rahminfolioides* larvicida para

combate ao mosquito *Aedes aegypti*, quando do estabelecimento de condições experimentais em meio com alginato e cloreto de cálcio. Variáveis como tempo de exposição, tamanho e espessura das microesferas das microesferas impactam na eficiência do método.

2 METODOLOGIA

O cultivo e preparo do pó bruto seco ativo de Bti foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco (IFPE) - Campus Recife. Os bioensaios de atividade larvicida foram realizadas no Laboratório de Bioensaio SRCCV do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) – Pernambuco. O preparo das microesferas foi realizado no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco (LIKA-UFPE).

2.1 OBTENÇÃO DO PÓ DE BTI SECO ATIVO

2.1.1 Preparo de meio de cultura

O meio de cultura utilizado para cultivo de Bti era constituído de glicose, extrato de levedura e sais minerais e foi preparado segundo metodologia modificada de Arantes et al. (2010). Inicialmente foram preparadas soluções salinas concentradas (estoques) de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KH_2PO_4 , $MnSO_4 \cdot H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ e $(NH_4)_2SO_4$ em água purificada, nas concentrações de 0,1; 0,022; 0,04 e 0,1 g/L, respectivamente. As soluções foram conservadas em estoque sob refrigeração.

Volumes de 50 mL de solução de extrato de levedura na concentração de 4 g/L eram transferidos para Erlenmeyers com capacidade de 250 mL após ajuste do pH para 7,0 +/-0,02 com NaOH 0,1M ou HCl 0,1M. Os frascos eram fechados com tampões de algodão hidrófobo e esterilizados em autoclave vertical Phoenix/Luferco, modelo AV SD-30, a 121°C +1°C por 20 minutos. À parte, preparava-se 47,5 mL de uma solução de glicose na concentração de 8 g/L, adicionava-se 0,5 mL de cada uma das soluções estoques de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KH_2PO_4 , $MnSO_4 \cdot H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ e $(NH_4)_2SO_4$ e ajustava-se o pH para 7,0 +/- 0,02 com NaOH 0,1M ou HCl 0,1M. Em seguida, utilizando cabine de segurança biológica Esco classe II tipo A2, um volume de 50 mL da solução salina glicosada era filtrado em kit de filtração com membrana estéril de 47 mm de diâmetro, porosidade 0,45 µm e transferido em seguida para cada Erlenmeyer contendo o extrato de levedura previamente esterilizado. Os frascos contendo 100 mL de meio de cultivo

eram submetidos a aquecimento adicional a 100°C em vapor fluente por 10 minutos, resfriados à temperatura ambiente e incubados em estufa bacteriológica Quimis Q316M4, na temperatura de 30°C +/- 0,5°C por 24 horas para teste de esterilidade. Os meios somente eram utilizados após verificação de esterilidade.

2.1.2 Preparo de inóculos de Bti

Uma fita impregnada com esporos de Bti, cepa LFB-584 da Coleção de Culturas do Gênero Bacillus e Gêneros Correlatos – CCGB da FIOCRUZ foi inoculada em meio líquido de Caseína Soja contido em tubo de ensaio e incubada em estufa bacteriológica a 30°C +/- 0,5°C por 48 horas. Em seguida, foi realizada a transferência de alíquotas da cultura para meio Ágar Caseína Soja inclinado, seguido de incubação a 30°C +/- 0,5°C por 48 horas. As culturas foram conservadas sob refrigeração por, no máximo, 2 meses e eram reativadas antes de cada produção em meio líquido. Os inóculos eram finalizados pela tomada de alíquotas da cultura recém-ativada para frasco contendo solução salina estéril a 0,85% m/v e agitadas em vórtex, até que a suspensão adquirisse turvação igual à da escala McFarland nº 10 (cerca de 3 bilhões de UFC/mL).

2.1.3 Cultivo do Bti em meio líquido agitado

O volume do inóculo para cultivo de Bti foi de 5% do volume inicial do meio de cultura, baseado na metodologia de Boniolo et al. (2012).

Com auxílio de uma pipeta graduada estéril de 10 mL, 5,0 mL da suspensão microbiana com padrão de turvação nº 10 na escala McFarland era transferido para cada Erlenmeyer contendo 100 mL do meio de cultura para cultivo de Bti. Para Erlenmeyers com 150 mL de meio de cultura, inoculava-se 7,5 mL da suspensão. Os frascos eram incubados a 30°C +/- 0,5°C sob agitação orbital de 200 rpm em mesa agitadora New Brunswick Scientific, modelo C25KC, por 47 horas (LI et al., 2011). Frascos Erlenmeyer contendo o meio de cultura para cultivo de Bti estéril também era submetidos à incubação prévia como controle de esterilidade.

2.1.4 Obtenção de pó de Bti seco ativo

Ao final do cultivo do Bti em meio líquido sob agitação, os meios com a cultura crescida eram distribuídos em tubos de centrifugação tipo Falcon estéreis de 50 mL. Os tubos eram pesados, sendo as massas dos tubos igualadas acrescentando-se água purificada estéril. Em seguida, os tubos eram centrifugados a 2200 xg em centrífuga de

bancada FANEM Baby 206 BL, durante 10 minutos. Após a centrifugação, descartava-se os sobrenadantes em hipoclorito de sódio a 2% e o sedimento era seco em estufa a 85°C por 24 horas (BONIOLO et al., 2012). Em seguida os sedimentos eram submetidos a lavagem por centrifugação, pela adição de aproximadamente 30 mL de água purificada estéril. Essa etapa era realizada três vezes antes da secagem do sedimento em estufa a 85°C por 24 horas. Todos os sobrenadantes eram descartados em hipoclorito de sódio a 2%.

2.2 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE CROTON RHAMNIFOLIOIDES

O óleo essencial foi obtido de folhas da planta *Croton rhamnifolioides* coletada no município de Serra Talhada, localizado no sertão do Estado de Pernambuco-Brasil, sendo uma exsicata depositada no Herbário Professor Vasconcelos Sobrinho na Universidade Federal Rural de Pernambuco, sob número de tombamento 49855. Para a extração de óleos essenciais, foi utilizada a técnica de hidrodestilação, por um período de duas horas, utilizando uma adaptação do sistema de Clevenger, sendo constituído por um balão de fundo redondo com capacidade de 5L, manta aquecedora Lucadema 5000, unidade de refrigeração Biothec BT SOUR, condensador de tubo de bolas e um separador de óleo.

2.3 OBTENÇÃO DE MICROESFERAS

2.3.1 Preparo das suspensões

2.3.1.1 Preparo das suspensões do Bti + óleo essencial + alginato de sódio a 2%

Pesou-se em cabine de segurança biológica 0,1 g do pó de Bti seco, fazendo o uso de vidrarias e espátulas estéreis. Adicionou-se aproximadamente 10 mL de água purificada estéril e realizou-se a diluição agitando com bastão de vidro estéril até completa suspensão. A suspensão foi filtrada em papel de filtro quantitativo estéril, de 80 g/m² (gramatura) de 20-25µm para retenção de particulados oriundas de restos celulares, para evitar entupimentos no bico dosador utilizado para o microencapsulamento, Encapsulador Buchi B 385- Pro. Após essa etapa, adicionou-se 0,4 g de alginato de sódio, 0,1 mL de Tween 80% estéreis e diluiu-se até o volume final de 20 mL. A esta suspensão foi adicionado, em pequenas frações, um total de 2 mL do óleo essencial de *Croton rhamnifolioides*, agitando constantemente para manter a homogeneidade.

2.3.1.2 Preparo das suspensões do Bti + óleo essencial + alginato de sódio a 1%

Pesou-se em cabine de segurança biológica 0,1 g do pó de Bti seco, fazendo o uso de vidrarias e espátulas estéreis. Adicionou-se aproximadamente 10 mL de água purificada estéril e realizou-se a diluição agitando-se com bastão de vidro estéril até completa suspensão. A suspensão foi filtrada em papel de filtro quantitativo estéril, de 80 g/m² (gramatura) de 20-25um e em seguida, adicionou-se 0,2 g de alginato de sódio, 0,1 mL de Tween 80% estéreis e diluiu-se até o volume final de 20 mL. A esta suspensão foi adicionado em pequenas frações, um total de 2 mL do óleo de Croton rhamnifolioides, agitando constantemente para manter a homogeneidade.

2.3.2 Produção das microesferas

As microesferas de alginato de sódio preparadas com Bti + óleo essencial + alginato de sódio foram obtidas através da técnica de co-acervação em etapa única (VELOSO et al., 2009; VANISKI et al., 2017). Todas as soluções utilizadas foram esterilizadas previamente.

Utilizando um Encapsulador Buchi B 385- Pro as suspensões contendo o Bti eram gotejadas através de uma seringa de 10mL estéril, em uma solução de cloreto de cálcio a 3% (m/v). A abertura interna do bico utilizado foi de 0,3 mm, com frequência de 1740 Hz e potência de 980 mV. O gotejamento da suspensão foi controlado por uma bomba de injeção com fluxo de 24 mL/min. Após a formação, as microesferas permaneceram sob agitação por 30 minutos e em seguida foram filtradas em papel de filtro estéril e lavadas três vezes com água purificada estéril para eliminar a solução de cloreto de cálcio da superfície.

As microesferas foram observadas por microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura para avaliação da forma, coloração e homogeneidade, bem como para verificação de eventuais defeitos na superfície.

2.4 ATIVIDADE LARVICIDA

Os ensaios de atividade larvicida foram realizados em triplicata, para cada tipo de microcápsula produzida, utilizando grupo de 20 larvas de *Aedes aegypti* na fase larvar L3.

Antes de iniciar o teste larvicida as microesferas foram depositadas em papel de filtro estéril para secagem, dentro de cabine biológica. Após a secagem, pesou-se assepticamente em recipientes plásticos estéreis de 180 mL, triplicatas de 1,0 g e 0,5 g de microesferas. Em seguida foi adicionado a cada recipiente 100 mL de água purificada

estéril e 20 larvas de *Aedes aegypti* em fase larval L3. Em cada ensaio realizou-se um controle negativo de atividade larvicida, utilizando água purificada estéril e as larvas.

A mortalidade das larvas foi verificada após 24, 48 e 72 horas do início dos testes. As larvas eram consideradas mortas quando não emergiam à superfície da solução espontaneamente ou não respondiam ao estímulo de leve agitação dos recipientes plásticos.

Os resultados de atividade larvicida foram expressos em % da taxa de mortalidade das larvas após 24, 48 e 72 horas de observação.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Microesferas são estruturas onde o material microparticulado encontra-se disperso por toda a matriz da partícula, enquanto nas microcápsulas o material ativo encontra-se envolto pelo material encapsulante (ROKKA; RANTAMÄKI, 2010; MATTÉ; ROSA, 2013).

Nesta seção são apresentados os resultados obtidos durante a produção de microesferas de alginato utilizando como substâncias ativas esporos e restos celulares do *Bacillus thuringiensis*, na forma de pó seco bruto, associado com óleo essencial das folhas de *Croton rhamnifolioides*. As microesferas foram avaliadas quanto ao potencial larvicida, resultado da liberação controlada, no combate ao mosquito *Aedes aegypti* em sua fase larval 3 (L3).

3.1 PREPARAÇÃO DAS MICROESFERAS

As etapas prévias à obtenção das microesferas de Bti envolve um conjunto de operações básicas que, embora em alguns casos pareça ser simples, como por exemplo pesagem, secagem e centrifugação, exigem uma preparação técnica especializada para lidar com microrganismos de forma asséptica, sem que ocorra a contaminação do ativo biológico por outros organismos interferentes (contaminação cruzada). Desde a multiplicação da cultura microbiana estoque por inoculação nos meios de cultivo estéreis, a produção do cultivo esporulado proteico, a separação por centrifugação, secagem e formulação para encapsulamento, são fases cruciais a serem protegidas para que não ocorra contaminação externa ao produto final. Esses cuidados, realizados em escala laboratorial, tornam-se mais complexos e também necessários em escala industrial (PEREIRA; MARTINS, 2016).

Quanto a incorporação de substâncias imiscíveis como o óleo essencial em água, só é possível pela adição de um agente emulgente, havendo sido utilizado para isso Tween 80% estéril, sob constante agitação, fase considerada mais crítica para a contaminação biológica externa, sendo por isso sempre realizada em cabine biológica com fluxo laminar.

O sucesso na microencapsulação depende, em parte, das características reológicas da mistura a encapsular, principalmente quando se utiliza partículas micrométricas, microbianas, onde grumos podem ser formados e causar entupimento do encapsulador. O encapsulador Buchi B95-pro envolve a tecnologia de vibração baseada na quebra de um líquido em um fluxo contínuo por uma vibração sobreposta. O uso dessa tecnologia tem sido aplicada devido à necessidade de automatização e capacidade de produzir microesferas uniformes e monodispersas. Contudo, apesar de os parâmetros de produção serem controláveis neste processo semiautomatizado (tamanho do bico, frequência de vibração, fluxo de aspensão e tensão do eletrodo), o que influencia diretamente a produção uniforme de microesferas no microencapsulador é a viscosidade da solução polimérica (BIANCO, 2016). Esse é um dos desafios para obter bons resultados no processo de microencapsulamento. A viscosidade da solução interfere no entupimento dos bicos atomizadores e não proporciona um bom fluxo de atomização. Para evitar entupimentos, o pó bruto seco de Bti utilizado, após suspensão em meio líquido estéril, foi filtrado em papel quantitativo estéril com capacidade de retenção de partículas média maiores que 20 a 25 μm .

Os valores da frequência de vibração e do fluxo de aspensão para uma boa formação das microesferas foram determinados com a melhor configuração pela utilização de bico atomizador de 0,3 mm, frequência de 1740 Hz e potência de 980 mV. O gotejamento da suspensão se deu com fluxo de 24 mL/min.

De acordo com BORGOGNA et. al.(2010) a reologia da solução inicial utilizada para a formação das partículas de gel de alginato, deve ser levada em conta para a escolha da técnica mais adequada; e que a natureza multicomponente da solução e a concentração dos componentes, afeta fortemente as propriedades finais do sistema.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROESFERAS

3.2.1 Microesferas em alginato

A morfologia externa das microesferas do Bti + alginato a 2% e Bti + alginato a 2% + óleo de Croton rhamnifolióides apresentou-se esférica, com bordas uniformes e delimitadas. Aglomerados não foram observados (Figura 1).

Figura 1 - Microesferas de Bti + óleo essencial de Croton rhamnifolioides em alginato de sódio a 2% – Aumento de 40x

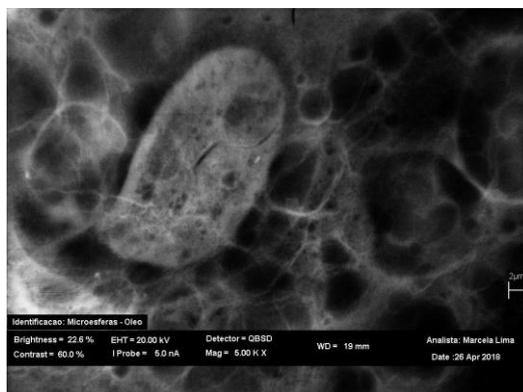


FONTE: Os autores, 2018

Características semelhantes foram encontradas no estudo de Junxin et al. (2011), no qual foram obtidas microesferas de Bti em alginato com formato esféricos, regulares e sem formação de aglomerados. Quanto mais regulares e uniformes forem as paredes das microesferas, melhor é a eficiência do microencapsulamento do núcleo ativo.

As imagens obtidas via MEV indicaram que as microesferas de Bti + alginato a 2% + óleo (Figura 2) possuíam superfície porosa, além de confirmar a morfologia esférica com bordas uniformes.

Figura 2 - Superfície de microesferas Bti+ alginato a 2% + óleo essencial de Croton rhamnifolioides (rugosa) MEV

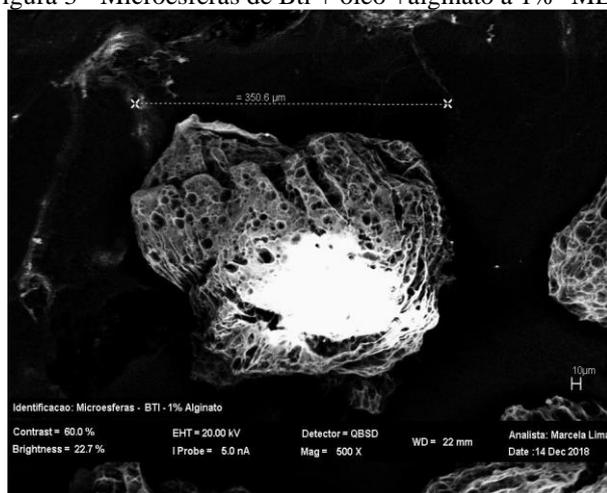


FONTE: Os autores, 2018

O tamanho das microesferas de Bti + óleo + alginato a 2% apresentaram um tamanho médio de 356 μm , e um máximo de 417,6 μm , valores próximos aos obtidos por ZHAO et. al.(2015) ao utilizar alginato a 2% (268,2 μm) e 4% (404,6 μm) na microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus*, cujo aumento do diâmetro, segundo os autores, esteve relacionado ao efeito de aumento da viscosidade, desfavorável para a emulsificação durante a agitação.

Para as microesferas de Bti + óleo + alginato a 1%, as características obtidas foram similares às microesferas com parede a 2%, sendo estas uniformes, circulares, sem aglomerados, com diâmetro consistente em média 316,8 μm (Figura 3).

Figura 3 - Microesferas de Bti + óleo +alginato a 1% - MEV



FONTE: Os autores, 2018

3.3 ATIVIDADE LARVICIDA DAS MICROESFERAS

Foram realizados três bioensaios das microesferas de Bti + óleo + alginato a 2%, dos quais nenhum apresentou mortalidade frente às larvas de mosquito *Aedes Aegypti* após 24 horas de exposição. Diante dos resultados insatisfatórios de atividade, foram realizados ensaios com 0,5g e 1,0g de microesferas de Bti + óleo + alginato 1%, material com microcápsulas de parede mais fina. Os resultados de mortalidade % frente larvas L3 para massas de 0,5 g e 1,0 g nos tempos 24, 48 e 72 horas estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Redução % do número de larvas de *A. aegypti* expostas a microesferas de Bti + óleo + alginato a 1%

Microesfera g/ UFC	Tempo de contato (horas)		
	24	45	72
0,5 / $1,5 \times 10^4$	40%	50%	50%
1,0 / 3×10^4	60%	80%	90%

Conforme mostrado na Tabela 1, resultados satisfatórios de mortalidade de 40%, em relação às larvas mortas/vivas, foram observados com 24 horas de exposição para massa de 0,5 g de microesfera; para 1,0 g de microesferas, o resultado foi de 60% após 24 horas. A massa de 1,0 g corresponde a $3,0 \times 10^4$ UFC/g de Bti.

4 CONCLUSÕES

Diante dos testes realizados com as microesferas de Bti com óleo essencial de *Croton rhamnifolioides*, foi possível concluir que as microesferas do Bti com óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* em alginato a 2% não possuem atividade larvicida contra o *Aedes aegypti*. As microesferas do Bti com óleo *Croton rhamnifolioides* em alginato a 1% possuem atividade larvicida contra o *Aedes aegypti*. A atividade larvicida das microesferas de Bti com óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* em alginato a 1% apresentou resultados satisfatórios após 24, 48 e 72 horas, comprovando assim a eficiência do microencapsulamento como protetor da substância ativa, aumentando o seu efeito residual após um período de exposição das larvas do *Aedes aegypti*.

A eficiência de um processo de microencapsulamento é alcançada a partir da padronização de parâmetros críticos como viscosidade da solução polimérica, compatibilidade entre o polímero e a substância ativa, além das variáveis de fluxo de gotejamento, pressão e frequência. É necessário encontrar, através dos testes, a equação ideal para obtenção de paredes e formas regulares do microencapsulamento.

No presente trabalho, ao padronizar com fluxo de gotejamento contínuo a camada do polímero usado, no caso o alginato de sódio, as microesferas apresentaram-se mais regulares, o que proporcionou a eficiência na atividade larvicida proposta.

AGRADECIMENTOS

Ao chefe do Laboratório de Fisiologia Bacteriana – LFB, Leon Rabinovitch, da Fundação Oswaldo Cruz/Instituto Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro, por ter cedido a cepa *Bacillus thuringiensis sorovar israelensis*, instrumento fundamental desta pesquisa.

À Prof.^a Dr.^a Ana Maria Souto Maior, do Departamento de Antibióticos da UFPE; e ao doutorando Iranildo José da Cruz Filho, pela importante colaboração para uso do laboratório e apoio para cultivo do Bti.

À Prof.^a Dr.^a Daniela Navarro, do Departamento de Química Experimental da UFPE; e ao técnico Júlio, pelo apoio para os ensaios larvicidas preliminares.

À tecnóloga Ana Paula Araújo da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) – Pernambuco/Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), na realização dos testes larvicidas.

REFERÊNCIAS

- ARANTES, O.M.N., CENCI, M.A., LOPES, J. Evaluation of a new formulation of *Bacillus thuringiensis israelensis*, **Brazilian Journal of Biology**, v.70, n.4, 2010.
- BIANCO, L. R. **Produção de 1,3-propanodiol em biorreator por *Clostridium butyricum* imobilizado em microesferas**. Recife, 2016. 144p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, 2016.
- BUFFOLO, I. R. A., SOUZA, T. M. M., SANTOS, S. S., RODRIGUES, T., BERBERTI, L. C., DOCILE, T. N., FIGUEIRÓ, R. Desvendando os padrões de preferência de habitat de larvas de simuliidae (diptera) neotropicais e suas implicações para o controle do vetor, **Acta Biomedica Brasiliensia**, v.7, n.1, p. 109-123, 2016.
- BONIOLO, F. S.; RODRIGUES, R. C.; PRATA, A. M. R.; LÓPEZ, M. L.; JACINTO, T.; SILVEIRA, M. M. da; BERBERT-MOLINA, M. A. Oxygen supply in *Bacillus thuringiensis* fermentations: bringing new insights on their impact on sporulation and δ -endotoxin production, **Applied Microbiology Biotechnology**, n. 94, p. 625-636, 2012.
- BORBOGNA, M., BELLICH, B., ZORZIN, L., LAPASIN, R., CESÀRO, A. Food microencapsulation of bioactive compounds: Rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system. **Food Chemistry**, v. 122, p. 416-423, 2010.
- BOYCE, R.; LENHART, A.; KROEGER, A.; VELAYUDHAM, R.; ROBERTS. B.; HORSTICK, O. *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) for the control of dengue vectors: systematic literature review. **Tropical Medicine and International Health**, v. 18, n. 8, p. 564-577, 2013.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência, **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 4, p. 279-293, 2007.
- COSTA, A. C. V.; MELO, G. F. A.; MADRUGA, M. S. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of a *Croton rhamnifolioides* leaves Pax & Hoffman, **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 6, p. 2853-2864, 2013.
- GONSALVES, J. K. M. C.; COSTA, A. M. B.; SOUSA, D. P.; CAVALCANTI, R. S. N. Microencapsulação do óleo essencial de *Citrus sinensis* Osbeck pelo método da coacervação simples. **Scientia Plena**, v. 5, n. 11, 2009.
- GWAL, R.; MISHRA, V.; KUKREJA, A. Investigation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) endotoxin production and analysis of efficiency of Bti against mosquito larvae. **Journal of Bioscience and Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 17-22, 2015.
- KANIS, L. A.; PROPHIRO, J. S.; VIEIRA, E. S.; NASCIMENTO, M. P.; ZEPRON, K. M.; KULKAMP-GUERREIRO, I. C.; SILVA, O. S. Larvicidal activity of *Copaifera* sp. (Leguminosae) oleores in microcapsules against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larval. **Parasitology Research**, v.110, p.1173-1178, 2012.

LI, X., DING, X., XIA, L., SUN, Y., YUAN, C., YIN, J. Proteomic Analysis of *Bacillus thuringiensis* Strain 4.0718 at Different Growth Phases. *The Scientific World Journal*, v.2012, doi:10.1100/2012 /798739

LIMAYEN, I.; CHARCOSSET, C.; FESSI, H. Purification of nanoparticle suspension by concentration/diafiltration process. **Separation and Purification Technology**, v. 38, p. 1-9, 2004.

MAR, Josiana M., SILVA, Laiane S., AZEVEDO, Sidney G., FRANÇA, Leandro P., GOES, Abrames F.F., DOS SANTOS, Amanda L., BEZERRA, Jaqueline, NUMOMURA, Rita, MACHADO, Marcos B., SANCHES, Edgar A. Lippia organoides essential oil: An efficient alternative to control *Aedes aegypti*, *Tetranychus urticae* and *Cerataphis lataniae*, **Industrial crops and products**, v.111, p.292-297, 2018.

MATTÉ, G.M., ROSA, S. A tecnologia da microencapsulação através das microesferas de quitosana, **Revista Iberoamericana Polímeros.**, v.14, n. 5, p. 206-218, 2013.

MIRANDA, C. A. S. F.; CARDOSO, M. G.; BATISTA, L. R.; RODRIGUES, L. M.; FIGUEIREDO, A. C. S. Essential oils from leaves of various species: antioxidant and antibacterial properties on growth in pathogenic species, **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 213-220, jan./mar. 2016.

MONTAGNER, F. R. G.; SILVA, O. S.; JAHNKE, S. M. Mosquito species occurrence in association with landscape composition in green urban áreas, **Brazilian Journal of Biology** v. 78, n. 2, p. 233-239, 2018.

PEREIRA, E.L., MARTINS, B.A. Processos biotecnológicos na produção de bioinseticidas, **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v.14, n. 2, 2016

PINTO, L. M. N.; BERLITZ, D. L.; CASTILHOS-FORTES, R.; FIUZA, L. M. Toxinas de *Bacillus Thuringiensis*, **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 38, 2009.

POLAMCZYK, R. A.; GARCIA, M. A.; ALVES, S. B. Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berlinier no controle de *Aedes Aegypti*. **Revista de Saúde Pública**, 37 (6): 813-6, 2003.

ROH, J. Y.; CHOI, J. Y.; LI, M. S.; JIN, B. R.; HOJE, Y. *Bacillus thuringiensis* as a Specific, Safe, and Effective Tool for Insect Pest Control. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.17, n.4, p. 547-559, 2007.

ROKKA, S. RANTAMÄKI, P. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications, **European Food Research and Technology**, v. 231, p.63-69, 2010.

SILVA, P. T.; FRIES, L. L. M.; MENEZES, C. R.; HOLMEM, A. T.; SCHWAN, C. L.; WIGMANN, E. V.; BASTOS, J. O.; SILVA, C. B. Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. **Ciência Rural Santa Maria**, v. 44, n. 7, p. 1304-1311, 2014.

VIANA, J. L.; SOARES-DA-SILVA, J.; VIEIRA-NETO, M. R. A.; TADEI, W. P.; OLIVEIRA, C. D.; ABDALLA, F. C.; PEIXOTO, C. A.; PINHEIRO, V. C. S. Isolates of *Bacillus thuringiensis* from Maranhão biomes with potential insecticidal action against *Aedes aegypti* larvae (Diptera, Culicidae). **Brazilian Journal of Biology**, 2020.

VONTAS, J., KIOULOS, E., PAYLIDI, N., MOROU, E., DELLA TORRE, A., RANSON, H. Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.104, n.2, p.126-131, 2012.

VANISKI, R., CORTI, D., DRUNKLER, D.A. Técnicas e materiais empregados na microencapsulação de probióticos **Brazilian Journal of Food Research**, Campo Mourão, v. 8, n. 1, p. 156-184, jan./mar. 2017.

VELOSO, F.T., FERRAZ, R.S., LIRA, A.A.M., SANTANA, D.P., SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Desenvolvimento e validação de método analítico em CLAE-UV para a quantificação de ácido retinóico em microcápsulas de alginato e quitosana **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 45, n. 1, jan./mar., 2009.

ZHANG, L.; ZHANG, X.; ZHANG, Y.; WU, S.; GELBIC, I.; XU, L.; GUAN, X. A new formulation of *Bacillus thuringiensis*: UV protection and sustained release mosquito larvae studies. **Scientific Reports**, 6:39425, DOI: 10.1038/srep39425, 2016.

ZHAO, M., QU, F., CAI, S., FANG, Y. NISHINARI, K., PHILLIPS G.O., JIANG, F. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* CGMCC1.2686: Correlation Between Bacteria Survivability and Physical Properties of Microcapsules, **Food Biophysics**, v.10, p.292-299, 2015.