

## ENCAPSULAMENTO DE FORMULAÇÃO Bti: CARACTERIZAÇÃO E PROPOSTA DE ENSAIO DE LIBERAÇÃO PROLONGADA

Denise Abatti Kasper Silva<sup>1</sup>

Tatiana da Cunha Gomes Leitzke<sup>2</sup>

Priscila Thaize dos Santos<sup>3</sup>

**Saúde, Segurança e Meio Ambiente**

### RESUMO

O controle biológico de simuliídeos por meio da bactéria *Bacillus thuringiensis* subesp. israelensis (Bti) tem sido realizado sobre larvas de *Simulium pertinax*, em virtude da sua patogenicidade. A aplicação de polímeros biodegradáveis como matriz para proteger e estabilizar agentes ativos permite manter o caráter tóxico e seletivo do bioinseticida, protegendo-o do meio ambiente, além de auxiliar na cinética de liberação do agente. Neste trabalho produziu-se e caracterizou-se partículas compostas por blendas de poli (L-ácido láctico) (PLLA) e poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) 75-25 encapsulando uma suspensão comercial de Bti (Teknar SC), e avaliou-se uma proposta de bioensaio. A produção das partículas teve como base o método de emulsão e evaporação do solvente com produção de partículas de PLLA/PLGA nas proporções 50:50 e 80:20. As partículas com e sem Bti foram caracterizadas quanto ao efeito da presença desse, além de densidade aparente, estabilidade térmica, mortalidade atingida e morfologia. O plaqueamento indicou o encapsulamento de Bti; as amostras atenderam ao critério de flotabilidade estabelecido; houve maior estabilidade térmica com a adição de Bti; análises morfológicas apresentaram esferas lisas, 30 dias não foram suficientes para observar degradação. A proposta de bioensaio de longa duração se mostrou possível, porém o uso de larvas selvagens comprometeu as análises.

**Palavras-chave:** borrachudo; micropartículas; polímeros biodegradáveis.

### INTRODUÇÃO

Os simuliídeos (*Diptera*, *Simuliidae*) são insetos com hábitos diurnos, que habitam corpos hídricos de águas límpidas e com correnteza. A fêmea da espécie *Simulium pertinax* apresenta antropofilia acentuada e comportamento hematófago, provoca picadas que causam prurido intenso e irritação, podendo induzir reações imunológicas severas. Tendo em vista o comportamento da espécie e suas consequências para o desenvolvimento socioeconômico em locais de ocorrência, o controle desta espécie deve ser feito em seus locais de foco (PAIVA, 2002; SHELLEY et al., 1997; SILVA, 2007). Dentre as 4 fases de desenvolvimento, ovos,

---

<sup>1</sup>Prof. Dr. da Univille, campus Joinville, curso de Engenharia Ambiental e Sanitária, [deabatti@gmail.com](mailto:deabatti@gmail.com)

<sup>2</sup>Prof. MSc. da Univille, campus Joinville, curso de Engenharia Ambiental e Sanitária, [tatiana.cunha@univille.br](mailto:tatiana.cunha@univille.br)

<sup>3</sup>Graduada em Engenharia Ambiental e Sanitária da Univille, [priscilathaize@hotmail.com](mailto:priscilathaize@hotmail.com)

larvas, pupas e adultos, o controle é realizado principalmente sobre as larvas (CUNHA, 2004) e pode ser feito com o uso de entomopatógenos, os componentes ativos dos bioinseticidas.

Destacada pela sua elevada potência larvicida o *Bacillus thuringiensis* subesp. *israelensis* (Bti) tem sido utilizado no controle de larvas de *Simulium pertinax* (borrachudos) como princípio ativo por sua patogenicidade (DE BARJAC, 1978; BECKER, 2000; ROSSI, 2007; SANTOS et al., 2010). Isso porque após a ingestão do Bti pela larva do inseto alvo, os cristais proteicos, responsáveis pela atividade tóxica da espécie, são solubilizados no sistema digestivo elevando a absorção d'água no intestino levando-o à ruptura e desintegração (VILAS-BÔAS et al., 2007; ANGELO et al., 2010; COPPING & MENN, 2000; SILVA, 2007).

O Bti possui baixa estabilidade fototérmica, o que dificulta o aproveitamento desta bactéria. Tendo isto em vista, e também que o Bti tem uma meia-vida no ambiente de 12-32 horas e uma atividade larvicida de uma semana ou mais, o uso de formulações que o mantenham ativo no ambiente por um intervalo de tempo maior é necessário. Estas formulações devem ter propriedades aderentes, emulsificantes, dispersantes, protetoras contra radiação, flutuantes, atrativas, ou praticamente inertes (WEIMANN, 2014, SILVA, 2007).

Segundo Rodrigues et al. (2014) os revestimentos poliméricos são mais eficazes pois garantem menores perdas por lixiviação, volatilização e fixação. Polímeros como poli (ácido láctico) (PLLA) e o poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), são poliésteres relativamente hidrofóbicos, instáveis em condições úmidas e biodegradáveis a subprodutos atóxicos (ácido láctico, ácido glicólico, dióxido de carbono e água) usados em trabalhos de sistema de liberação de agentes ativos, principalmente fármacos (ERBETTA et al., 2011).

O presente trabalho teve como objetivos avaliar o efeito do encapsulamento de uma suspensão concentrada de Bti comercial (Teknar SC) e a propor um bioensaio prolongado.

## **METODOLOGIA**

Para a seleção do método de produção das partículas usou-se os seguintes critérios: procedimento que não envolvesse aquecimento acima de 30°C; métodos de preparação das partículas em emulsão água-óleo-água (A/O/A), gerar micropartículas com densidade inferior à da água, ambientalmente amigáveis, inertes ao encapsulado e que permitissem o controle de

liberação do bioinseticida. Como material de partida utilizou-se blenda polimérica de PLLA com o PLGA, (este último apresentando proporção de ácido láctico e glicólico de 75:25).

**Obtenção das partículas:** A metodologia utilizada baseou-se naquela sugerida por Ito et al. (2007) modificada por Weimann (2014). O Quadro 01 apresenta a proporção em massa entre os dois polímeros usados e a indicação de presença ou ausência de Bti.

Quadro 1 - Nomenclatura empregada e composição das amostras.

Amostras	PLLA (% m)	PLGA (%m)	Bti
50_50_SBti	50	50	Sem
50_50_CBti	50	50	Com
80_20_SBti	80	20	Sem
80_20_CBti	80	20	Com

**Determinação da atividade do Bti:** Para avaliar a incorporação do bioinseticida na matriz polimérica foram realizados testes de plaqueamento Weimann (2014) da torta e sobrenadante da filtração, assim como uma amostra de Teknar SC e um teste branco.

**Densidade aparente das micropartículas:** foi determinada em triplicata de acordo com Weimann (2014).

**Bioensaio:** Baseou-se no método proposto por WHO (1999) descrito em Guideline Specifications for Bacterial Larvicides for Public Health Use. Propôs-se um bioensaio com duração de 30 dias, para isso, houve a substituição de larvas, após 10 e 20 dias. em virtude do tempo de ação larvicida do Bti no meio ambiente. Antes de cada nova inserção foram retiradas as larvas do período anterior, encerrando os testes ao trigésimo dia (30º dia) com a retirada das larvas restantes no Laboratório de Meio ambiente da Univille.

Empregou-se o software Origin® por meio de **análise** de diferença **estatística** significativa, ANOVA One Way, utilizando teste de Tukey com nível de significância de 95%, entre as médias geradas nos testes de densidade e no bioensaio.

**Caracterização morfológica das partículas:** micropartículas de composições sem e com Bti, iniciais e após 30 dias de degradação foram secas a 30°C por 1 h, fixadas em um suporte metálico, por meio de uma fita adesiva de carbono dupla face, e recobertas com fina cama de ouro (marca Sputter Coater, modelo Bal-Tec SCD 050) sob vácuo durante 120 segundos. Em seguida, analisadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) JSM

67017F do fabricante JEOL, no Laboratório de Microscopia Eletrônica, da UDESC em Joinville/SC, sob aumentos de 50 a 500 vezes, com uma tensão de 10 kV.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O plaqueamento permitiu verificar o encapsulamento da formulação.

A densidade aparente das amostras demonstrou que todas as amostras apresentaram densidade menor que 1 g/mL, entre 0,58 e 0,70 g/mL, atendendo ao critério de flotabilidade desejado.

A partir do bioensaio, o teste branco teve alta mortalidade e variação entre as coletas o que comprometeu os demais testes. De acordo com Paiva (2002) as larvas de simuliídeos vivem em cursos de rios límpidos e com correnteza e se alimentam filtrando partículas nutritivas, desta forma o ambiente oferecido em água parada não favoreceu sua alimentação e fornecimento de oxigênio, acarretando na alta mortalidade encontrada. As médias das amostras foram similares principalmente ao teste branco e Teknar SC. Houve grande variação entre as amostras e coletas, visto pelo desvio padrão e variação das médias, o que se deve do uso de larvas em diferentes estágios de crescimento.

## CONCLUSÕES

Houve o completo encapsulamento do Bti para as composições 50:50 e 80:20 e estas atenderam o critério de flotabilidade das partículas.

O bioensaio de longa duração mostrou-se possível, no entanto os resultados indicaram que houve problema de adaptação das larvas selvagens, atribuído às condições que não favoreceram a alimentação e introdução de oxigênio que as larvas dispunham no ambiente natural. Dessa forma sugere-se um ciclo de adaptação das larvas selvagens antes de proceder o ensaio ou a utilização de larvas padronizadas.

A análise morfológica e de superfície das partículas demonstrou não haver evidência tanto de degradação das partículas após 30 dias quanto de liberação de Bti encapsulado. Aspecto que corrobora o resultado obtidos no bioensaio.

## REFERÊNCIAS

- ANGELO, E. A. et al. *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 4, p. 945-958, 2010.
- BECKER, N. Bacterial control of vector-mosquitoes and black flies. In: Charles, J.F.; Delécluse, A.; LeRoux, C.N. **Entomopathogenic bacteria**: from laboratory to field application. Dordrecht: Klumer Academic Publishers, p. 383-398, 2000.
- COPPING, L.G. & MENN, J.J. Review biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest Management Science**, v. 56, n. 5, p. 651-676, 2000.
- CUNHA, A.D.B.P.V. **Variação temporal e sazonal de larvas de *Simulium sp.* no Litoral Norte do Estado de São Paulo**. Dissertação de Mestrado, 2004. Universidade Estadual Paulista-Jaboticabal, SP, 2004
- DE BARJAC, H. A new subspecies of *Bacillus thuringiensis* very toxic for mosquitoes: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* serotype 14. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v. 286, n. 5, p. 797 – 800, 1978.
- ERBETTA, C. D. C.; VIEGAS, C. C. V.; FREITAS, R. F. S.; SOUZA, R. G. Síntese e caracterização térmica e química do copolímero Poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo). **Polímero**, v. 21, p. 376-382, 2011.
- ITO, F.; FUJIMORI, H.; MAKINO, K. Incorporation of water-soluble drugs in PLGA microspheres. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 54, n. 2, p. 173 – 178, 2007.
- PAIVA, D. P. O borrachudo indicador biológico da qualidade da água. Curso de Capacitação em **Práticas Ambientais Sustentáveis**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2002. 112p.
- RODRIGUES, M. A. C.; BUZETTI, S.; FILHO, M. C. M. T.; GARCIA, C. M. P.; ANDREOTTI, M. Adubação com KCl revestido na cultura do milho no Cerrado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, p. 127-133, 2014.
- ROSSI, J.R. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* SPS1: caracterização. Dissertação de Mestrado, UNESP, Jaboticabal, 2007.
- SANTOS, F. P. dos; LOPES, J. Desenvolvimento de nova metodologia para aplicação de inseticidas no controle de borrachudos (Diptera: Simuliidae) em ribeirões com fluxo de água irregular. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 4, p. 1017-1030, out./dez. 2010
- SHELLEY, A.J., C.A. LOWRY, M. MAIA-HERZOG, A.P.A. LUNA DIAS & M.A.P. MORAES. Biosystematic studies on the Simuliidae (Diptera) of the Amazonia onchocerciasis focus. **Bull. Br. Mus. Nat. Hist.** (Entomol.), v. 66, p. 1-120, 1997.
- SILVA, M. **Alternativas para a produção de bioinseticida Bti**: uso do processo semicontínuo e do processo em estado sólido. Dissertação de Mestrado, 2007, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, 2007.
- VILAS-BÔAS, G. T et al. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 673-687, 2007.
- WEIMANN, G. L. **Estudo dos efeitos de três técnicas de microencapsulação da bactéria *Bacillus thuringiensis* subespécie *israelensis* (Bti) em matriz polimérica biodegradável poli(ácido láctico) e poli(ácido láctico-co-glicólico)**. Dissertação de Mestrado, 2014. Universidade da Região de Joinville, Univille, Joinville, 2014.
- WHO, World Health Organization - 1999. DRAFT Guideline Specifications for Bacterial Larvicides for Public Health Use. Geneva: WHO, 37 p. Report of the WHO Informal Consultation.