



**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GESTÃO AMBIENTAL
MESTRADO PROFISSIONAL EM GESTÃO AMBIENTAL**

SILVANA SOUZA DA CUNHA CAVALCANTE

ATIVIDADE LARVICIDA FRENTE À *Aedes aegypti* DE *Bacillus thuringiensis israelensis* e ÓLEO ESSENCIAL DE *Croton rhamnifolioides* MICROENCAPSULADO

Recife, 2018

SILVANA SOUZA DA CUNHA CAVALCANTE

ATIVIDADE LARVICIDA FRENTE À *Aedes aegypti* DE *Bacillus thuringiensis israelensis* e ÓLEO ESSENCIAL DE *Croton rhamnifolioides* MICROENCAPSULADO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Gestão Ambiental, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Gestão Ambiental do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco.

Prof. Dr. Eduardo José Alécio de Oliveira
Orientador

Prof. Dr. Ronaldo Faustino da Silva
Coorientador

Recife, 2018

C376a Cavalcante, Silvana Souza da Cunha.
Atividade larvícida frente à *Aedes aegypti* de *Bacillus thuringiensis israelensis* e óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* microencapsulado. / Silvana Souza da Cunha Cavalcante. – Recife, PE: O autor, 2018.
66 f.: il., color. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo José Alécio de Oliveira
Co-orientador: Prof. Dr. Ronaldo Faustino da Silva

Dissertação (Mestrado) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco - IFPE, Campus Recife, Coordenação de Pós-Graduação - Mestrado Profissional em Gestão Ambiental, 2018.

Inclui referências

1. *Aedes aegypti*. 2. Biolarvícida. 3. Microencapsulamento. 4. Óleo essencial. I. Oliveira, Eduardo José Alécio de (Orientador). II. Silva, Ronaldo Faustino. (Co-orientador). III. Título.

633.84 CDD (22 Ed.)

Silvana Souza da Cunha Cavalcante

ATIVIDADE LARVICIDA FRENTE À *Aedes aegypti* DE *Bacillus thuringiensis israelensis* e ÓLEO ESSENCIAL DE *Croton rhamnifolioides* MICROENCAPSULADO

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Gestão Ambiental do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco como parte integrante dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Gestão Ambiental.

Data da aprovação: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Eduardo José Alécio de Oliveira
Orientador –MPGA- IFPE

Prof. Dr. Ronaldo Faustino da Silva
Coorientador- MPGA-IFPE

Prof.^a Dr.^a Sofia Suely Ferreira Brandão Rodrigues
Examinador Interno- MPGA- IFPE

Prof.^a Dr.^a Claudia de Albuquerque Maranhão
Examinador Externo- IFPE

Dedico este trabalho a meu pai, Jamil Bezerra (*in memoriam*), que sempre foi um grande incentivador de meus estudos e minhas conquistas. Sinto muito sua falta. A minha mãe, Aramari, guerreira em sua luta e sempre perto de mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por proporcionar sempre oportunidades, guiar meus caminhos para as conquistas e os desafios e mostrar como enfrentar as adversidades.

Aos meus pais, Jamil Bezerra da Cunha (*in memoriam*) e Aramari Souza da Cunha, por serem pessoas batalhadoras, que sempre fizeram o melhor por mim, deram minha base, que definiram meu papel na sociedade como ser humano e profissional, além de serem meus exemplos de vida.

Aos meus filhos, Caio e Laura, razão do meu viver. Por muitas vezes, fiquei ausente para me dedicar a este trabalho e eles souberam esperar dentro dos seus limites.

A Adalberto, por ser companheiro nas idas e vindas da vida, nos bons e maus momentos à espera de mais uma conquista.

Às minhas amigas e companheiras de trabalho da Arconic Indústria e Comércio de Metais Ltda., Itapissuma - PE, Tereza e Marcela, que dividiram momentos de aprendizado e auxiliaram nas análises de microscopia para a construção deste trabalho.

Ao orientador Prof. Dr. Eduardo Alécio e ao coorientador Dr. Ronaldo Faustino, por me apresentarem um novo campo de estudo e pesquisa, pelas ideias compartilhadas e a contínua adaptação aos desafios encontrados.

À minha companheira de mestrado Andréia Gregório, pelo apoio aos ensaios larvicidas, sendo imprescindível nessa caminhada.

Aos meus colegas do MPGA, que estiveram sempre presentes nos momentos de aprendizado em torcida constante.

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, pela total abertura do seu laboratório para cultivo e fermentação do *Bti*.

À Prof.^a Dr.^a Daniela Navarro, do Departamento de Química Experimental da UFPE; e ao técnico Júlio, por abrirem as portas e disponibilizarem o laboratório para os primeiros ensaios larvicidas.

À Prof.^a Dr.^a Maria Alice Varjal, da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) – Pernambuco/Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), bem como à tecnóloga Ana Paula Araújo, pelo aprendizado e realização dos testes larvicidas.

Aos técnicos do IFPE Cassiano, Enderson, Allan e Ricardo, pelo auxílio no laboratório e na preparação dos testes. Meu muito obrigada! Sem seu apoio, seria bem difícil conseguir concluir os testes somente nos horários noturnos disponíveis para tal.

À Prof.^a Dr.^a Nereide Stela Santos Magalhães e a Milena Sales Ferraz, do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA, que foram responsáveis pela etapa de microencapsulamento desta pesquisa.

Às bolsistas Laura Moura e Sarah Galvão, pelo apoio dispensado nos momentos certos.

A todos que torceram, rezaram e me incentivaram durante essa jornada.

Muito obrigada!

*“Quando se sonha sozinho, é apenas um sonho.
Quando se sonha junto, é o começo da
realidade.”*

(Miguel de Cervantes)

RESUMO

Aedes aegypti é o principal mosquito transmissor de doenças, como dengue, zika, chikungunya e febre amarela para os seres humanos. Métodos de controle envolvem desde a conscientização da eliminação dos focos da reprodução dos mosquitos até a aplicação e o uso de inseticidas e repelentes como proteção individual e coletiva. O uso prolongado de pesticidas químicos vem reduzindo o seu efeito potencial devido a resistência criada pelos mosquitos contra tais produtos. Para minimizar esses efeitos adversos, tem sido constante o uso de produtos naturais e biológicos por apresentarem características larvicidas com alto potencial no combate a propagação de doenças. No entanto, o uso de produtos naturais como os óleos essenciais e os biolarvicidas como o *Bacillus thuringiensis israelensis* apresentam limitações decorrentes a baixa solubilidade em água, alta volatilidade e degradação quando à exposição a luz. Para minimizar tais problemas, técnicas de microencapsulamento são adotadas para atuar como uma proteção, evitando o efeito de exposição inadequada da substância ativa. Este trabalho tem como objetivo avaliar a atividade larvicida do *Bacillus thuringiensis israelensis* microencapsulado com óleo essencial de *Croton rhamnifolioides*. O pó seco de Bti foi obtido através do cultivo da cepa ativa em frascos erlenmeyers contendo meio de cultura em mesa agitadora New Brunswick Scientific. As microesferas de Bti, de óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* e Bti + óleo foram obtidas através do método de coacervação simples através do gotejamento das suspensões em alginato de sódio a 2% e a 1% em meio de CaCl_2 que é o responsável pela troca iônica e a formação das microesferas. Os testes larvicidas das microesferas foram realizados em triplicata e, em paralelo, com o teste de atividade do pó fermentado de Bti. Os ensaios foram realizadas utilizando 20 larvas por teste, em copos contendo 100ml de água destiladas e adicionada 0,1g das microesferas para teste. A CL 50 e CL 90 obtida do pó seco foram, respectivamente, 0,12 mg/L e 0,21 mg/L, e mantida a atividade após um período de um ano de armazenamento a -10°C . As microesferas de Bti, Bti + óleo de *Croton rhamnifolioides* e microesferas do óleo de *Croton rhamnifolioides* em alginato a 2% não apresentaram mortalidade, enquanto as microesferas em alginato a 1% apresentaram 90% de mortalidade em 3×10^4 UFC/g Bti imobilizado. Os resultados obtidos mostraram viabilidade para o uso de microesferas de Bti associado com óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* para o controle de *Aedes Aegypti*. Condições de otimização do processo ainda precisam ser estabelecidas.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*. Biolarvicida. Microencapsulamento. Óleo essencial.

ABSTRACT

Aedes aegypti is the main mosquito transmitting diseases such as dengue, zika, chikungunya and yellow fever to humans. Methods of control involve awareness of the elimination of mosquito breeding foci, application and use of insecticides and repellents as individual and collective protection. Prolonged use of chemical pesticides has been reducing its potential effect due to the resistance created by mosquitoes against such products. To minimize these adverse effects, the use of natural and biological products has been constant because they present larvicidal characteristics with high potential in the fight against the propagation of diseases. However, the use of natural products such as essential oils and biolarvicides such as *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) have limitations resulting from low solubility in water, high volatility and degradation when exposed to light. To minimize such problems, microencapsulation techniques are adopted to act as a protection, avoiding the effect of inadequate exposure of the active substance. This work aims to evaluate the larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis israelensis* microencapsulated with essential oil of *Croton rhamnifolioides*. Bti dry powder was obtained by culturing the active strain in erlenmeyer flasks containing New Brunswick Scientific shaker table culture medium. The Bti microspheres, *Croton rhamnifolioides* essential oil and Bti + oil were obtained by the simple coacervation method by dripping the suspensions in 2% and 1% sodium alginate in CaCl_2 medium which is responsible for the ion exchange and the formation of the microspheres. The larvicidal tests of the microspheres were performed in triplicate and in parallel with the activity test of the fermented powder of Bti. The assays were performed using 20 larvae per test, in flasks containing 100 ml of distilled water and 0.1 g of the microspheres for testing. The CL 50 and CL 90 obtained from the dry powder were, respectively, 0.12 mg / L and 0.21 mg / L, and maintained the activity after one year of storage period at -10°C . Bti, Bti + *Croton rhamnifolioides* oil microspheres and *Croton rhamnifolioides* oil microspheres in 2% alginate showed no mortality, while microspheres in 1% alginate showed 90% mortality in 3×10^4 CFU / g Bti immobilized. The results obtained showed viability for the use of Bti microspheres associated with *Croton rhamnifolioides* essential oil for the control of *Aedes Aegypti*. Process optimization conditions still need to be established.

Keywords: *Aedes aegypti*, biolarvicide, microencapsulation, essential oil

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Ciclo de vida do <i>Aedes Aegypti</i>	19
FIGURA 2 – Representação esquemática das etapas do processo de microencapsulação por coacervação.....	30
FIGURA 3 – Bioensaio com larvas de <i>Aedes aegypti</i> frente a diferentes concentrações ...	36
FIGURA 4 – Sistema de Clevenger modificado para obtenção do óleo essencial.....	37
FIGURA 5 – Encapsulador BUCHI B-390- produção das microesferas.....	39
FIGURA 6 – Microesferas de <i>Bti</i> + alginato a 2% + óleo.....	40
FIGURA 7 – Microscópio de Varredura Eletrônica LEO SRV 32 - ZEISS.....	42
FIGURA 8 – Curva de crescimento, variação de pH e consumo de glicose do experimento 1 (<i>Bacillus</i>)	44
FIGURA 9 - Curva de crescimento, variação de pH e consumo de glicose do experimento 2 (<i>Bacillus</i>)	44
FIGURA 10 - Microesferas de <i>Bti</i> + óleo em alginato a 2%- 40x	48
FIGURA 11 – Microesferas de óleo + alginato a 2%- 40x	49
FIGURA 12 – Superfície microesferas <i>Bti</i> + alginato a 2% + óleo <i>Croton rhamnifolioides</i> (rugosa) - MEV.....	50
FIGURA 13 – Microesferas de <i>Bti</i> + óleo + alginato a 2% - MEV	51
FIGURA 14 – Microesferas de óleo + alginato a 2%- MEV.....	51
FIGURA 15 – Microesferas de <i>Bti</i> + óleo + alginato a 1% - MEV	52
FIGURA 16 – Superfície microesferas <i>Bti</i> + óleo + alginato a 1% - MEV.....	53

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Condições do cultivo de <i>Bti</i> em meio caseína soja	43
TABELA 2 – Viabilidade dos esporos de <i>Bti</i>	45
TABELA 3 –Atividade larvicida – Bioensaios após 4 meses de armazenamento	46
TABELA 4 –Atividade larvicida – Bioensaios após 18 meses de armazenamento	46
TABELA 5 – Atividade larvicida microesferas <i>Bti</i> + óleo + alginato a 1%	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Bti– *Bacillus Thuringiensis Israelensis*

CCGB- Coleção de culturas do gênero *Bacillus* e gêneros correlatos

CL – Concentração Letal

CASO – Caseína soja

FIOCRUZ – Fundação Instituto Osvaldo Cruz

IFPE – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco

LFB – Laboratório de Fisiologia Bacteriana

LIKA – Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

MEV – Microscopia de varredura eletrônica

OMS – Organização Mundial da Saúde

SRCCV - Serviço de Referência em Controle de Culicídeos Vetores

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

WHO – World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Objetivos	16
1.1.1 Objetivo geral	16
1.1.2 Objetivos específicos	16
1.2 Estrutura da Dissertação	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Saúde ambiental	17
2.2 <i>Aedes aegypti</i>	18
2.3 <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>	21
2.4 <i>Croton rhamnifolioides</i>	24
2.4.1 Óleos essenciais	25
2.5 Microencapsulamento	26
3 METODOLOGIA	31
3.1 Obtenção do pó de <i>Bti</i> seco ativo	31
3.1.1 Preparo de meios de cultura	31
3.1.2 Preparo de inóculos de <i>Bti</i>	32
3.1.3 Cultivo do <i>Bti</i> em meio líquido agitado	32
3.1.4 Controle de crescimento	33
3.1.5 Obtenção de pó fermentado seco de <i>Bti</i>	33
3.1.6 Determinação da viabilidade dos esporos do sedimento seco	34
3.1.7 Acompanhamento do grau de esporulação	34
3.1.8 Dosagem da glicose no fermentado	35
3.2 Testes de atividade larvicida	35
3.2.1 Preparo das suspensões do pó bruto seco de <i>Bti</i>	35
3.3 Obtenção do óleo essencial de <i>Croton rhamnifolioides</i>	36
3.4 Preparo das suspensões para o microencapsulamento	37
3.4.1 Preparo das suspensões do <i>Bti</i> + alginato de sódio a 2%	37
3.4.2 Preparo das suspensões para o microencapsulamento do <i>Bti</i> + alginato de sódio a 2% + óleo essencial de <i>Croton rhamnifolioides</i>	38
3.4.3 Preparo das suspensões para o microencapsulamento do óleo essencial de <i>Croton</i> <i>rhamnifolioides</i> + alginato de sódio a 2%	38
3.4.4 Preparo das suspensões do <i>Bti</i> + alginato de sódio a 1%	38

3.5 Produção das microesferas	39
3.6 Quantificação da imobilização da substância ativa nas microesferas	40
3.7 Caracterização das microesferas	41
3.7.1 Aspecto visual	41
3.7.2 Aspectos morfológicos	41
3.7.3 Determinação do tamanho das microesferas no MEV - Microscópio de Varredura Eletrônica	41
3.8 Testes de atividade larvícida	42
3.8.1 Preparo das microesferas para teste larvícida	42
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 Controle de crescimento de <i>Bti</i>	43
4.2 Acompanhamento de esporulação de <i>Bti</i>	45
4.3 Viabilidade dos esporos	45
4.4 Atividade larvícida do pó seco de <i>Bti</i>	46
4.5 Quantificação de <i>Bti</i> encapsulado na microesfera	47
4.6 Caracterização das microesferas	47
4.6.1 Microesferas em alginato a 2%	47
4.6.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	49
4.7 Atividade larvícida das microesferas	53
5 CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	56
ANEXO A - PROBIT <i>Bti</i> (I)	62
ANEXO B - PROBIT <i>Bti</i> (II)	66

1 INTRODUÇÃO

A fragmentação das áreas ambientais tem afetado a saúde humana, e uma das consequências disso é a presença, nos centros urbanos, de insetos que habitavam aquelas áreas, causando danos à população humana, como é o caso do mosquito *Aedes aegypti*.

Mais da metade da população mundial vive, hoje, 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. O controle do vetor ainda é imprescindível para prevenir essas doenças e seu papel em saúde pública é 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 para o controle de insetos (POLANCZYK, 2003). Contudo, o uso destes 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).

O teste de novas abordagens é uma das recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS) para a implementação de técnicas para o controle de mosquitos, com foco na redução da transmissão de doenças (WHO, 2016).

Diante da necessidade de controle de vetores, estudos estão sendo conduzidos para identificar novas alternativas em substituição aos pesticidas químicos, objetivando assim, reduzir o impacto ambiental e a resistência apresentada atualmente pelos mosquitos, resistência essa que diminui a eficiência dos produtos (POLANCZYK, 2003). Entre as alternativas, os agentes biológicos vêm sendo usados nesse combate, a exemplo da aplicação de fungos, bactérias, vírus e extratos de plantas (GWAL et al., 2015; RAMIREZ-LEPE; RAMIREZ-SUERO, 2012).

Pertencem ao grupo de controle biológico as bactérias entomopatogênicas, como *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti), um biolarvicida indicado pela OMS por não ser tóxico ao ser humano, o que o habilita para aplicação em água potável no combate às larvas de mosquitos (BRAGA; VALLE, 2007). Além disso, o Bti apresenta vantagens como não poluir o meio ambiente, preservar a fauna associada e possuir propriedades tóxicas, principalmente contra os vetores da família *Culicidae* (como o inseto *Aedes aegypti*) e *Simuliidae* (PINTO et al., 2009).

O Bti exerce um efeito letal através de uma variedade de toxinas que são ingeridas pelas larvas e ativadas no seu intestino, causando ruptura das membranas celulares e provocando

sua 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). Os óleos essenciais são compostos naturais, voláteis e são extraídos de diferentes variedades de plantas. Sua composição química varia, pois depende de cada espécie e até mesmo de parte da planta, onde se encontra sua composição predominam os derivados terpênicos, como os mono e sesquiterpenos e os fenilpropanoides (MIRANDA et al., 2016). Os óleos essenciais apresentam propriedades biológicas, como ação larvicida, atividade antioxidante, ação analgésica e anti-inflamatória, fungicida e 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 dos óleos, 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 da substância ativa (SILVA et al., 2014). A 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 para resistir à radiação ultravioleta, mas também para melhorar a liberação lenta do produto, assim como estender o período do efeito residual. O alginato de sódio é o método de microencapsulação mais estudado e eficaz. A solução de alginato de sódio contendo o ativo é titulado na presença de CaCl_2 , obtendo a microcápsula (Zhang, 2016),

Sendo assim, com o intuito de estabelecer condições para produção do pó larvicida de Bti, seguido de condições de encapsulamento próprias, de domínio local, em parceria com outras instituições locais este trabalho tem como objetivo estudar o efeito de esporos de *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) microencapsulado associado ao óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* na ação larvicida contra o *Aedes aegypti*.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Analisar a atividade larvicida de formulações de *Bti* microencapsuladas, isoladas e em associação com o óleo essencial de *Croton rhamnifolioides*, frente a larvas de *A. aegypti*.

1.1.2 Objetivos específicos

- Realizar o crescimento microbiano controlado de *Bti* em meio líquido, para produção de esporos/cristais proteicos;
- Obter pó do fermentado bruto, contendo esporos/proteínas para teste larvicida contra *Aedes aegypti*;
- Determinar a viabilidade dos esporos de *Bti* em pó do fermentado bruto seco;
- Produzir microesferas de alginato de sódio contendo pó seco de *Bti* em associação ao óleo essencial de *Croton rhamnifolioides*;
- Testar a atividade larvicida das microesferas frente a larvas de *Aedes aegypti* em estágio L3.

1.2 Estrutura da Dissertação

O trabalho está dividido em cinco seções: Introdução, Revisão bibliográfica, Metodologia, Resultados e discussão, e Conclusão.

Na primeira parte, a introdução consiste em justificar o fundamento do trabalho com a explanação dos objetivos gerais e específicos que serão alvo durante todo o estudo. A segunda parte trata-se da revisão bibliográfica das principais divulgações científicas que servem de base fundamental, teórica e prática no desenvolvimento desta pesquisa, desde as divulgações mais atuais até a que constitui a base histórica sobre o tema.

A terceira parte apresenta a metodologia escolhida, o desenvolvimento do trabalho e os procedimentos guiados para atingir os resultados, expondo de forma esclarecedora para uma possível replicação. O quarto item demonstra os resultados obtidos através da metodologia proposta e o último item mostra os principais resultados obtidos e as devidas conclusões.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Nesta seção estão sendo analisadas as principais obras científicas que são a estrutura para o embasamento teórico e metodológico ao desenvolvimento desta pesquisa. Esta seção está subdividida entre cinco partes: saúde ambiental, *Aedes aegypti*, biolarvicida, óleos essenciais e microencapsulamento.

2.1 Saúde ambiental

A saúde ambiental, que é conhecida como a relação entre o ambiente e o padrão de saúde, tem se apresentado como um grande potencial para realização de pesquisas trans e interdisciplinares, visto que o debate em torno da problemática ambiental e seu impacto na saúde acentuou-se nas últimas décadas. Atualmente, um dos maiores desafios aos pesquisadores consiste em investigar quais as relações entre o movimento de transformações ambientais globais e seus vários desdobramentos, entre os quais se destacam os impactos à saúde da população (BEZERRA, 2017).

Ao longo do tempo, o próprio crescimento desordenado da população gerou uma pressão sobre os recursos naturais e ocasionou um desequilíbrio nas condições sanitárias, praticamente inexistentes. Esse crescimento desordenado e precário atingiu vários Países, favorecendo a proliferação de doenças. Dentre esses países cita-se grandes civilizações, como a da Mesopotâmia, que desenvolveu-se com precária infraestrutura de abastecimento de água e destinação de esgoto. O crescimento e a interligação de sociedades como Grécia, Roma e Pérsia resultaram na disseminação de doenças locais e geraram sucessivas epidemias (FREITAS; PORTO, 2006). Além desses, o Brasil também abriga uma variedade de cenários que condicionam em maior ou menor grau a existência de ambientes suscetíveis a riscos, agravos e doenças, como diferentes tipos de uso do solo, associados às distintas condições ambientais (clima, relevo, vegetação, disponibilidade hídrica), as quais são responsáveis por configurações territoriais que influenciam diretamente a saúde da população. Do sul ao norte do país, presencia-se o surgimento de alguns agravos à saúde que estão diretamente correlacionados ao ambiente, entendido aqui como o meio natural e produzido no qual a sociedade vive em constante processo de modificação (AUGUSTO, 2004).

O setor da saúde tem participado ativamente no debate focalizando o cuidado das pessoas atingidas por patologias, considerando os riscos ambientais a que essas populações estão expostas (BARCELLOS; QUITÉRIO, 2006). Exemplifica-se essa participação pela criação da

Vigilância em Saúde Ambiental pelo Ministério da Saúde, no ano 2000. Antes dessa criação, o Brasil já vinha discutindo políticas públicas, visando integrar as áreas da saúde e do meio ambiente (BEZERRA, 2017).

A vigilância em saúde ambiental, braço operativo dessa política, consiste em um conjunto de ações que proporcionam o conhecimento e a detecção de mudanças nos fatores determinantes e condicionantes do meio ambiente que interferem na saúde humana, com a finalidade de identificar as medidas de prevenção e controle dos fatores de risco ambientais relacionados às doenças ou a outros agravos à saúde. (BRASIL, 2009).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em relatório divulgado em 2016, as más condições ambientais são responsáveis por 12,6 milhões de mortes por ano no planeta. Isso significa que cerca de 23% das mortes no mundo ocorrem por se "viver ou trabalhar em ambientes poucos saudáveis". Alterações na qualidade e disponibilidade de água, ausência de segurança alimentar, ciclos de vetores e contaminação do solo são alguns dos fatores que têm contribuído para o aumento das doenças de veiculação hídrica e por vetores, como malária, dengue, zika, chicungunya, febre amarela (FREITAS et al., 2003).

No Brasil, em 2016, foram registrados 1.054.127 casos prováveis de dengue, 64.349 de chikungunya e 120.161 de doença aguda pelo vírus zika. A notificação de casos suspeitos de chikungunya é observada em 1.358 municípios; e de zika, em 1.605 municípios de todas as regiões. Ressalta-se, no entanto, a concentração das notificações de chikungunya na Região Nordeste, onde todas essas manifestações de doenças são transmitidas pelo *Aedes aegypti*, principal vetor transmissor dessas doenças (BRASIL, 2018).

2.2 *Aedes aegypti*

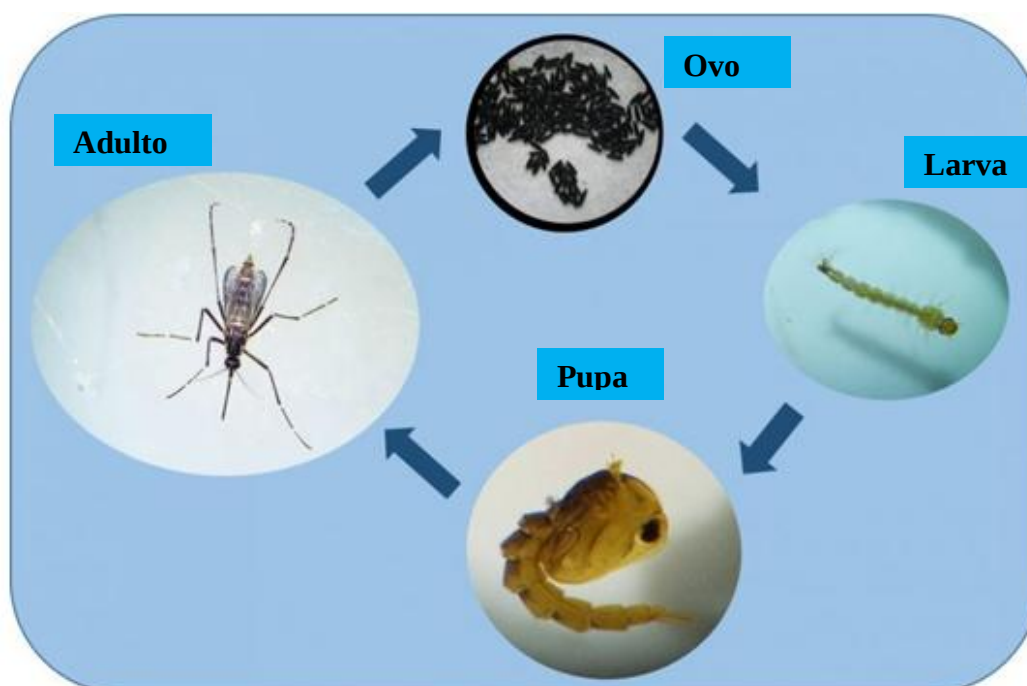
Aedes aegypti é um vetor da família *Culicidae*, um díptero com características hematófagas. Sendo menor do que os mosquitos comuns é preto com listras brancas no tronco, na cabeça e nas pernas. Suas asas são translúcidas e produzem um ruído quase inaudível ao ser humano. Essa espécie é antropofílica, parasita que infecta o ser humano, tem hábitos diurnos, deposita e alimenta seus ovos, preferencialmente, ao amanhecer e no período vespertino (BRAGA; VALLE, 2007).

A sua etologia beneficia sua ampla dispersão, favorecida nos ambientes urbanos, preferencialmente no intra e no peridomicílio humano. Dificilmente são encontrados em

locais onde não há a presença intensa do homem ou em ambientes semisilvestres (ZARA et al., 2016).

O ciclo de vida do mosquito (Figura 1) compreende quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto. A mudança das fases depende da temperatura do local, da disponibilidade de alimentos e da quantidade de larvas disponíveis, devido à própria concorrência das larvas por alimento dentro da água (FIOCRUZ, 2018).

Figura 1 - Ciclo de vida do *Aedes aegypti*



Fonte: Modificado de FIOCRUZ, 2017.

O período larvário, em ótimas condições, não ultrapassa cinco dias. A pupa é uma fase sem alimentos e, além disso, é a fase onde ocorre a transformação para o estágio adulto. Desde o embrião até a fase adulta (ovo, larva e pupa), o *Aedes aegypti* demora, em média, dez dias. Os mosquitos acasalam no primeiro ou no segundo dia após se tornarem adultos (SILVA et al., 2008).

Diante de condições desfavoráveis, o ovo pode durar cerca de um ano. Ou seja, a ausência das condições favoráveis não significa a quebra desse ciclo de vida, uma vez que os ovos permanecem viáveis durante semanas, meses, podendo chegar a mais de 400 dias. O que ocorre é a redução de ovos viáveis ao longo do tempo.

O *Aedes aegypti* alimenta-se de seivas das plantas. Porém, as fêmeas são hematófagas, devido a sua necessidade de sangue para processo de maturação dos ovos. Isso faz com que, ao ingerir o sangue do hospedeiro infectado, ela ingira junto o microrganismo que produz a doença (SILVA et al., 2008).

As fêmeas normalmente estão aptas para a postura de ovos três dias após a ingestão de sangue, passando então a procurar local para desovar. Os ovos não são postos dentro da água, e sim milímetros acima de sua superfície, principalmente em recipientes artificiais. Quando chove, o nível da água sobe, entra em contato com os ovos, que eclodem em pouco menos de 30 minutos. Dai a importância de lavar, com escova ou palha de aço, as paredes dos recipientes que não podem ser eliminados, onde o ovo pode permanecer grudado (FIOCRUZ, 2018).

Ao realizar a postura dos ovos, se a fêmea já estiver infectada pelo vírus da dengue, aumentam as chances de as larvas filhas já nascerem com o vírus, no processo chamado de transmissão vertical (FIOCRUZ, 2018).

Uma grande proliferação do vetor, ocasionada principalmente pelas mudanças demográficas, pelo intenso fluxo migratório rural-urbano, pelo crescimento desordenado nas cidades e pela ausência de boas condições de saneamento básico, acabou gerando um quadro grave e preocupante de expansão das doenças causadas por esses mosquitos (arboviroses) em todo o mundo, tornando-se imprescindível a adoção de estratégias específicas para o combate (ZARA et al., 2016).

Está presente no mundo inteiro dentro das zonas tropicais e subtropicais. Seu aparecimento consta desde o século XVI no Egito e na África, período das grandes navegações. Posteriormente ele foi introduzido no novo mundo durante o período colonial, época do tráfico dos escravos (FIOCRUZ, 2018). Sua primeira denominação foi dada por Linnaeus, em 1762, como *Culex aegypti*. É responsável por importantes doenças humanas transmitidas por mosquitos, como a malária, a febre amarela e a mais conhecida atualmente: a dengue (CHRISTOPHER, 1960).

A dengue prolifera em países tropicais em razão do clima quente e úmido, assim, nesses países há uma necessidade maior da prevenção dessa epidemia. Sendo as condições socioambientais destes países também favoráveis à proliferação do vetor transmissor da dengue, as áreas mais afetadas com a dengue no mundo hoje são: a América do Sul, a Central e a do Norte, além da África, Austrália, Caribe, China, Ilhas do Pacífico, Índia, Sudeste Asiático e Taiwan. Na América do Sul, Brasil, Colômbia, Bolívia, Paraguai, Guiana Francesa, Suriname, Venezuela e Equador são as áreas mais atingidas (SILVA et al., 2008).

Os primeiros relatos de dengue no Brasil datam do final do século XIX, em Curitiba - PR, e do início do século XX, em Niterói - RJ (FIOCRUZ, 2018). Entre 1958 e 1973, o mosquito chegou a ser erradicado do país por duas vezes, contudo, em 1976, houve os primeiros registros da reintrodução do vetor no Brasil, ocasionada por falhas na vigilância epidemiológica e pelo crescimento populacional desordenado. Desde então, o mosquito está presente em todo o país, distribuído em aproximadamente 4.523 municípios (ZARA et al., 2016).

A dengue adquiriu importância epidemiológica no Brasil, durante a metade do século XX, a partir de 1986, quando se propagou uma epidemia no Estado do Rio de Janeiro com a circulação do sorotipo 1, que logo alcançou a Região Nordeste (BRAGA; VALLE, 2007).

Algumas tecnologias têm sido desenvolvidas como alternativas no controle do *A. aegypti*, com mecanismos de ação que se diferenciam por sua forma de atuação, tais como medidas sociais, monitoramento seletivo da infestação, dispersão de inseticidas, novos agentes de controle químico e biológico e procedimentos moleculares para controle populacional dos mosquitos, inclusive considerando-se combinações entre técnicas.

Entre essas alternativas, tem-se observado que o uso continuado de inseticidas químicos tem causado o problema de descontrole da população do mosquito, levando ao surgimento de espécies resistentes a uma grande variedade de inseticidas, além de efeitos indesejáveis como a poluição ambiental e a toxicidade de seres humanos e outros organismos não alvos. Por esses motivos, busca-se o desenvolvimento de outras alternativas que sejam ecológica e funcionalmente corretas, como os biolarvicidas, que são organismos entomopatogênicos de combate ao vetor tal qual o *Bacillus thuringiensis israelensis* (GARCEZ et al., 2013).

2.3 *Bacillus thuringiensis israelensis*

No universo de agentes de controle biológico, as bactérias se destacam pela produção em larga escala e por outras vantagens, como segurança, poder residual, reciclagem mais rápida no ambiente e boa condição de manejo. Atualmente, a bactéria mais utilizada no controle de vetores é o *Bacillus thuringiensis var. israelensis* (*Bti*) (SILVA et al., 2014).

Bacillus thuringiensis israelensis (*Bti*) é uma bactéria gram-positiva, entomopatogênica, que foi isolado pela primeira vez em 1976. A descoberta de que se tratava de um patogênico a dípteros fez com que seu uso fosse ampliado no controle de doenças causadas por vetores (POLANCZYK et al., 2003). Como agente biológico, tem demonstrado alta eficiência no controle de vetores devido ao efeito letal que causa após sua ingestão pelas larvas (LACEY,

2007). O *Bti* exerce seus efeitos letais em larvas através da produção de uma variedade de proteínas tóxicas que são ingeridas pelos organismos alvos. Essas toxinas são, então, ativadas no intestino das larvas, onde causam ruptura das membranas celulares e morte dos organismos (BOYCE et al., 2013).

A bactéria *Bacillus thuringiensis israelensis* sintetiza as proteínas Cry, de acordo com a presença dos genes Cry nas cepas bacterianas que apresentam atividade inseticida a diferentes ordens de insetos. Essas proteínas são produzidas na segunda fase de esporulação da bactéria durante a formação dos esporos, em forma de inclusões cristalinas (POLANCZYK, 2003). As proteínas apresentam peso molecular entre 40 a 140 kDa e são classificadas de acordo com a homologia de sequência de aminoácidos e atividade inseticida específica: As toxinas Cry1 são tóxicas para a classe dos insetos como Lepidoptera; as Cry2 são tóxicas para Lepidoptera e Diptera (ordem de insetos como *Aedes aegypti*); as Cry3, para Lepidoptera; e as Cry4, para Diptera (ROH et al., 2007).

A ação da toxina no intestino da larva dá-se logo após a ingestão das inclusões cristalinas (protoxinas) no meio alcalino. As protoxinas inativas são solubilizadas e clivadas por proteases intestinais, originando fragmentos tóxicos resistentes com aproximadamente 60-70 kDa (BRAVO et al., 2007). As células epiteliais do intestino incham rapidamente e se rompem, causando a morte do animal (HERMAN HÖFTE; WHITELEY, 1989).

O aumento do uso do *Bti* como larvicida contra vetores propagadores de doenças humanas tem ocorrido devido a diversas vantagens frente a outros agentes. Sua alta eficiência contra espécies alvo causa a morte de larvas em até 24 horas e destaca-se por sua boa seletividade e facilidade de produção em larga escala (REGIS et al., 2000). Além disso, o *Bti* tem margem de segurança para organismos não alvo, pois não provoca efeitos danosos contra estes, tornando-o assim apto ao uso em programas de controle de vetores em locais onde a proteção do ecossistema natural também é necessário (RAMIREZ-LEPE; RAMIREZ-SUERO, 2012).

Fatores ambientais e biológicos desempenham papel importante no uso do *Bti*. Entre os fatores bióticos e abióticos, destacam-se a espécie do mosquito, a densidade e idade da larva, o nível de ingestão do biolarvicida, a dosagem de aplicação, a profundidade e a composição da água, entre outros (PORRASPIA et al., 2012).

A atividade larvicida em estágios de larva e pupa do *Aedes aegypti* já foi demonstrada, a exemplo do trabalho de Espindola *et al.* (2008), que mostrou que, após a eclosão das larvas, o desenvolvimento dos estágios larvais e a obtenção de pupa, utilizando tratamento com o *Bti*, a taxa de mortalidade atingida foi, em média, 98% para o estágio larval L4; enquanto que, no estágio de pupa, a taxa de mortalidade obtida foi de apenas 4%. Essa redução é explicada

devido ao fato de que, na fase de pupa, os organismos não se alimentam e, por isso, o *Bti* não consegue agir no sistema digestivo (ESPINDOLA et al., 2008).

O uso de *Bti* como controle de vetor tem esbarrado em algumas desvantagens. O uso desse recurso em grande escala tem altos custos de aplicação e apresenta baixo efeito residual, devido principalmente à exposição direta à luz solar (inativação da toxina pela radiação ultravioleta). Além disso, há outras partículas sólidas e bactérias, como os coliformes fecais existentes na água, que podem competir com o *Bti*, diminuindo as taxas de ingestão das toxinas pelas larvas (POLANCZYK et al., 2003).

O *Bti* tem sido utilizado para o controle de vetores em diferentes tipos de preparações, tais como líquidos, em pó, grânulos, microgrânulos e comprimidos efervescentes, que são aplicados nos locais de reprodução, dependendo da espécie do mosquito e seu biotipo (THIERY; HAMON, 1998).

A produção comercial do *Bti* pode ser obtida a partir do crescimento em meios de cultura com base em fonte de nutrientes complexos. A finalidade do cultivo é a obtenção dos cristais de *Bti*. A toxicidade obtida no final do cultivo depende do meio de cultura e das condições operacionais (RAMIREZ-LEPE; RAMIREZ-SUERO, 2012). A produção dos cristais é influenciada por fatores como a fonte de carbono, sendo a glicose a mais apropriada para o crescimento e a esporulação do *Bti*. Quando a glicose é totalmente consumida na fermentação, a sua ausência pode desencadear o processo de esporulação, pois o uso de uma ou mais fontes de carbono pode afetar a morfologia e a atividade biológica dos cristais (SMITH, 1982).

A importância do meio de cultura no crescimento e na esporulação do *Bti* foi demonstrada em estudo realizado com cepas coletadas no Centro de Controle de Vetores em Pondicherry, Índia. As cepas foram mantidas em meio de cultura ágar, contendo glicose e demais nutrientes. As fases de crescimento e esporulação foram acompanhadas e observou-se que a esporulação começou após 48 horas do início do crescimento. Foram adicionadas larvas individuais de mosquito à dosagem específica ao formulado do *Bti* obtido para teste do biolarvicida. O estudo mostrou que a mortalidade da larva iniciou após 24 horas e que fatores como o aumento da fonte de carbono e nitrogênio no meio de cultura é muito importante para a produção do *Bti*. Além disso, as fases de crescimento e esporulação devem ser cuidadosamente observadas (GWAL et al., 2015).

As formulações de *Bti* têm sido estudadas para avaliar o controle do mosquito em laboratório e no campo de aplicação. Foi reportado que a aplicação de um formulado de *Bti* em um recipiente coberto, sem qualquer exposição à luz solar, em comparação a outro

completamente aberto, apresentou diferentes efeitos larvicidas. O efeito de mortalidade foi reduzido pela sensibilidade do *Bti* à luz solar (VILARINHOS; MONERRAT, 2004).

Na perspectiva de desenvolver produtos no controle de vetores, principalmente aqueles que transmitem doenças, o uso de plantas com atividade inseticida e larvicida tem se mostrado promissor, visto que estes organismos são ricos em substâncias bioativas, principalmente oriundas do metabolismo secundário, que são específicas para cada espécie, ou seja, não apresentam distribuição generalizada (BARRETO, 2005). Uma das tendências atuais nesse sentido é a prospecção de produtos naturais de origem vegetal com propriedades larvicidas (GARCEZ et al., 2013).

O estudo de produtos naturais obtidos de plantas com atividade larvicida contra o *Aedes aegypti* é recente, sendo encontrados trabalhos realizados com o intuito de isolar e caracterizar tais substâncias bioativas a partir da década de 1980. A maior parte dos estudos é realizada com extratos brutos e óleos essenciais (GARCEZ et al., 2013). Das diversas plantas brasileiras que são extraídos os óleos essenciais temos o exemplo de *Croton rhamnifolioides*.

2.4 *Croton rhamnifolioides*

Um dos gêneros produtores de óleos essenciais é o *Croton*, uma espécie da família *Euphorbiaceae*, que constitui o segundo maior gênero desta família, com aproximadamente 1300 espécies diversificadas entre arbustos, árvores e ervas. Quanto à sua localização, tem preferência pelas regiões tropicais e subtropicais (BERRY et al., 2005). Seus maiores representantes encontram-se nas Américas e, na América do Sul, o Brasil tem a maior representação desse gênero com aproximadamente 350 espécies distribuídas em todos os biomas, desde as florestas tropicais da Amazônia e do Atlântico até o semiárido do Nordeste do Brasil (SILVA et al., 2010).

A espécie de *Croton* tem sido largamente usada na medicina popular, especialmente nos locais distantes dos centros urbanos, onde o acesso às medicações farmacêuticas é mais difícil. Entre suas espécies, o *Croton rhamnifolioides* é muito abundante no Nordeste brasileiro e é popularmente conhecido como “quebra-faca” ou “caatinga branca”. O termo “quebra-faca” se deve a seus rígidos arbustos, e a coloração do seu caule deu origem à denominação “caatinga branca” (RANDAU et al., 2004). Entre sua aplicação na medicina popular, destaca-se seu uso contra dores de estômago, vômitos, hemorragias e febres (COSTA et al., 2013). Em sua composição química, inclui-se a presença de alcaloides, terpenoides e flavanoides, estando os terpenoides presentes em todas as partes da planta, e são os

responsáveis pelo agradável aroma apresentado pela espécie (SANTOS et al., 2014). As espécies são aromáticas, o que indica a presença de óleos essenciais voláteis em sua composição.

O óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* possui atividade larvicida contra o *Aedes aegypti* comprovada por testes experimentais (SANTOS et al., 2014).

2.4.1 Óleos essenciais

Desde os tempos remotos, é feito o uso de plantas para fins medicinais. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% da população de países em desenvolvimento utilizam plantas na atenção primária à saúde. No Brasil, acredita-se que 90% da população já utilizaram alguma planta medicinalmente (ROSA et al., 2016). O Brasil possui uma rica biodiversidade, além disso os costumes herdados das culturas indígenas, africanas e europeias no uso de plantas para o tratamento contra doenças contribuem para que este seja considerado uma área estratégica para o desenvolvimento de medidas de controle contra o *Aedes aegypti* (JOHARCHI; AMIRI, 2012).

Com a necessidade de produzir inseticidas eficazes e seguros para a população e para o meio ambiente, os óleos essenciais têm apresentado boa atividade larvicida contra o *A. aegypti*, com aumento da potência entre aqueles com grupamentos químicos mais lipofílicos, sendo compostos considerados inofensivos, visto que já são utilizados como aditivos aromatizantes em alimentos para consumo humano. Importante destacar que esses novos compostos devem, além do efeito larvicida, demonstrar um efeito residual prolongado nos depósitos onde são aplicados. Essa é uma característica importante para a adoção de um determinado composto em atividades de campanha de saúde pública (ZARA et al., 2016).

Os óleos essenciais, provenientes do metabolismo secundário dos vegetais, são considerados misturas de constituintes voláteis, sendo formados principalmente por monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides. Cada vez mais vêm despertando amplo interesse de vários grupos de pesquisa devido à diversidade de atividades biológicas relacionadas a eles, como as ações antibacteriana, antifúngica, larvicida, ovicida, inseticida, antioxidante, entre outras (SHERER, et al., 2009).

De uma forma geral, a bioatividade dos óleos está correlacionada com suas principais substâncias. No entanto, é importante ressaltar que esses metabólitos secundários podem facilitar interações que aumentam ou diminuem a atividade larvicida em comparação com as atividades de seus constituintes isolados (DIAS; MORAES, 2014).

Entretanto, existem algumas limitações para o uso dos óleos essenciais no combate aos mosquitos do *Aedes aegypti*, como baixa solubilidade em água, sensibilidade quanto à exposição a luz e oxigênio e fácil volatilidade sob altas temperaturas (CHUNG et al., 2013). Para isso, o armazenamento correto dos óleos essenciais extraídos de plantas tem sido adotado como medida para a conservação de suas características químicas. Santos *et al.* (2014) demonstrou o efeito larvicida de óleo essencial extraído de *Croton rhamnifolioides* contra as larvas do *Aedes aegypti* em estágio L4. Foi aplicado tanto o óleo fresco quanto o óleo estocado em frasco âmbar, a uma temperatura controlada de -5°C, por três anos, devidamente fechado. Os resultados demonstraram atividade larvicida em ambos os casos com CL50 = 122.3 e 89.03 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, ressaltando assim a importância do monitoramento e controle das condições de armazenagem do óleo para evitar sua degradação devido a exposições indesejadas (SANTOS et al., 2014).

A composição química de um óleo essencial e sua efetividade como atividade larvicida dependem de alguns fatores que podem variar de acordo com o solo, a anatomia vegetal, a sazonalidade, a disponibilidade de água, o ciclo de crescimento da planta e as condições ambientais (RIOS et al., 2017).

Segundo Dias e Moraes (2014), 361 óleos essenciais de 269 espécies de plantas foram testados em seus efeitos de atividade larvicida e mais de 60% destes óleos essenciais foram considerados como ativos (CL50 <100 mg/L), usando a classificação de Cheng *et al.* (2003).

2.5 Microencapsulamento

Os dados expostos evidenciam a necessidade de proteção tanto dos esporos/ proteínas como do óleo essencial para a manutenção do efeito larvicida. Uma das alternativas é o uso da técnica de microencapsulamento de forma a proteger o sistema contra efeitos indesejáveis.

A microencapsulação é uma das formas de sistema de liberação controlada utilizada nas ciências farmacêuticas. Os sistemas de liberação controlada são técnicas usadas para modulação e proteção na liberação de substâncias.

Consiste em um sistema que protege a substância ativa de exposições inadequadas a temperatura, oxidação, umidade, reações indesejáveis, entre outros, permitindo assim que o produto tenha melhor potencial de uso e consiga exercer a função ativa a que está sendo proposto (GONSALVES et al., 2009).

Os primeiros estudos realizados para obtenção de sistemas eficientes tiveram como base o encapsulamento de moléculas. Paul Ehrlich propôs o seu modelo, que ficou conhecido como “Bala Mágica de Ehrlich”. Atualmente, com o mesmo princípio, existem lipossomas, aquassomas, transferssomas, nanocápsulas, microesponjas, entre outros sistemas de liberação (HENRIQUE et al., 2006).

A tentativa de aplicação da técnica de microencapsulação ocorreu em torno de 1930, mas o primeiro produto microencapsulado somente surgiu em 1954. Uma indústria norte-americana comercializou um papel de cópia sem carbono, no qual, sobre a folha de papel, foram depositadas microcápsulas de tinta que, ao receberem a pressão da ponta do lápis, se rompiam, liberando o pigmento e fazendo a segunda via de acordo com a mudança de cor em função do pH (SUAVE et al., 2006).

Quanto ao tamanho, as cápsulas são assim classificadas: macrocápsulas $> 5.000\mu\text{m}$, microcápsulas $0,2$ a $5.000\mu\text{m}$ e nanocápsulas $< 0,2\mu\text{m}$. Em relação a sua forma e construção, são divididas entre microcápsulas e microesferas (SILVA et al., 2014). Microcápsulas são partículas constituídas por um núcleo interno envolvido pelo agente encapsulante; enquanto que, nas microesferas, o agente ativo está distribuído em uma matriz polimérica (SUAVE et al., 2006).

Entre os sistemas de liberação controlada, a microencapsulação é definida como uma tecnologia de embalagem de material sólido, líquido ou gasoso, com uma fina camada de polímero, formando partículas chamadas de microcápsulas. O polímero age como um filme protetor, isolando a substância ativa, ou seja, o núcleo, evitando o efeito de uma exposição inadequada (SILVA et al., 2014).

Os sistemas de liberação controlada são usados em larga escala na indústria farmacêutica, com o objetivo de garantir o transporte do fármaco até o alvo específico na dosagem ideal, contornando as propriedades físico-químicas e aumentando o potencial do efeito terapêutico (GONSALVES, 2009). Além da aplicação no campo farmacêutico, os sistemas de liberação controlada estão sendo usados na liberação de princípios ativos como pesticidas, corantes, aromatizantes, óleos essenciais, entre outros (SUAVE et al., 2006).

A escolha correta do material que constitui o encapsulante é fator principal na garantia da eficiência e estabilidade do encapsulamento. O tipo do material ideal deve apresentar as seguintes características: não reagir com o núcleo, habilidade para selar e reter o agente ativo dentro da cápsula, evitar o contato do núcleo com agentes adversos, evitar algum efeito aromático ou sabor em caso de encapsulamento de alimentos, possuir a propriedade desejada de liberação do núcleo e boa viabilidade econômica (SILVA et al., 2014). Não se conseguem

todas as características em todo o material, por isso é importante saber o tipo de substância que será encapsulada e as propriedades físicas e químicas que influenciam a escolha (FAVARO-TRINDADE et al., 2008). Os materiais mais comuns usados na parede das cápsulas são: carboidratos, gomas, lipídeos, poliésteres, polímeros, proteínas e quitosana (SUAVE et al., 2006).

A liberação do núcleo, substância ativa, é a etapa mais importante no efeito da liberação controlada. Os fatores que influenciam essa liberação estão diretamente ligados às interações do núcleo com o material encapsulante, à volatilidade do núcleo, ao tamanho das partículas e ao grau de viscosidade do material da cápsula (DESAI; PARK, 2005). Os principais mecanismos de liberação do núcleo são a difusão, a degradação, o uso de solventes, o controle do pH, a temperatura e a pressão (AZEREDO, 2005).

A liberação por difusão ocorre quando o material da parede encapsulante está intacto e a liberação do núcleo ocorre através do efeito das propriedades químicas do núcleo e do material encapsulante e algumas propriedades físicas do material encapsulante (SHAHIDI, 1993). A liberação por degradação ocorre pela ação das enzimas, como proteases e lipases, que degradam as proteínas e os lipídeos (AZEREDO, 2005). Na liberação por uso de solventes, o material da parede encapsulante se dissolve ao entrar em contato com o solvente e rapidamente libera o núcleo ou pode se expandir, favorecendo a liberação (SILVA et al., 2014).

Na liberação pelas mudanças no pH, ocorrem alterações na solubilidade do material encapsulante, favorecendo a liberação do núcleo (SILVA et al., 2014).

As alterações na temperatura podem provocar dois tipos de liberação diferentes: a liberação devido à sensibilidade do material, que pode se contrair ou expandir quando expostos a temperatura de sensibilidade; e a fusão do material da parede do encapsulante, proporcionando assim a liberação do núcleo (GOUIN, 2004).

A escolha do método de microencapsulamento mais adequado depende do tipo de substância ativa que se deseja encapsular, do tamanho das partículas, da aplicação, do custo e do mecanismo de liberação que deverá ser utilizado. Os métodos diferenciam-se basicamente pelo envolvimento entre o núcleo e o material encapsulante, visto que isso pode ser de característica química, física ou físico-química (DESAI; PARK, 2005).

Os principais métodos de encapsulamento são: *spray drying*, *spray cooling*, extrusão e coacervação ou separação de fases (SUAVE et al., 2006).

O *spray drying* envolve a formação de uma emulsão, solução ou suspensão contendo o material do núcleo e da parede, seguida de nebulização com circulação de ar quente. O

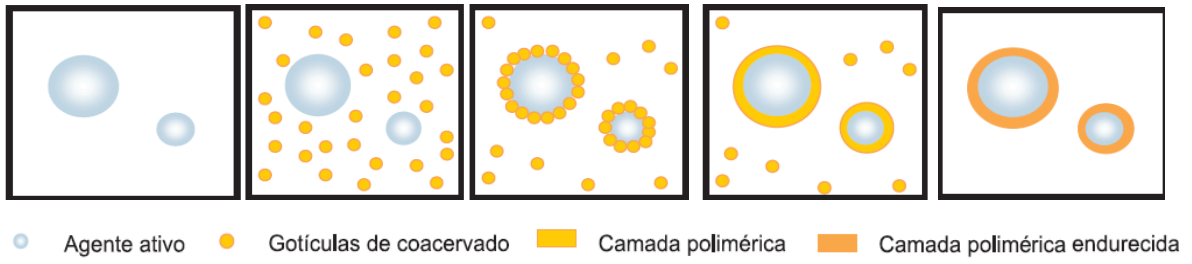
material é encapsulado no núcleo após a evaporação da água instantaneamente em contato com o ar quente (LAOHASONGKRAM, 2011). Algumas vantagens desse método são equipamentos de grande porte, possibilidade de empregar uma ampla variedade de agentes encapsulantes, potencialmente de larga escala, produção, equipamento simples, boa eficiência, redução dos custos de armazenamento e transporte e baixo custo. Tem como principal desvantagem a produção de materiais de tamanho não uniforme (MADENE et al., 2006).

O *spray cooling* é baseado na injeção de ar frio para permitir a solidificação da partícula. As micropartículas são produzidas a partir de uma mistura contendo o núcleo e o material da parede em gotículas. É considerada a tecnologia de encapsulamento mais barata empregando temperaturas mais baixas e com alto potencial para o aumento de escala. No entanto, micropartículas apresentam baixa capacidade de expulsão do núcleo durante o armazenamento (RATHORE et al., 2013).

A extrusão baseia-se em um polissacarídeo que imobiliza o núcleo quando em contato com um íon multivalente. Esse método envolve a incorporação do núcleo em uma solução de alginato de sódio, seguida da extrusão gota a gota através de uma pipeta ou seringa com um endurecimento com solução, como o cloreto de cálcio (SUAVE et al., 2006).

O método de coacervação é a técnica mais antiga e utilizada, e envolve a separação de fases por coacervação. É a técnica que envolve a deposição do polímero em torno do núcleo, alterando as características como pH, temperatura, força iônica e polaridade (AZEREDO, 2005). A coacervação (Figura 2) é denominada simples quando há a presença apenas de um coacervante; enquanto que, na coacervação complexa, tem-se a presença de dois ou mais polímeros de polaridades opostas. Nesta, existem basicamente três importantes fases: formação de três imiscíveis fases, deposição da camada e rigidez da camada (JYOTHI et al., 2010). Esse método é o mais empregado por ser relativamente simples, ter baixo custo no processo e não requerer altas temperaturas ou uso de solventes orgânicos (SILVA et al., 2014).

Figura 2 – Representação esquemática das etapas do processo de microencapsulação por coacervação



Fonte: Suave et al., 2006.

3 METODOLOGIA

Os experimentos de preparo do cultivo bruto seco de *Bti* foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco (IFPE) - campus Recife. Os bioensaios foram realizados em triplicata contendo larvas na fase larvar L3, utilizando grupo de 20 larvas para cada concentração testada no Laboratório de Bioensaio Biológico SRCCV do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, enquanto que as microesferas foram elaboradas no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA-UFPE).

3.1 Obtenção do pó de *Bti* seco ativo

3.1.1 Preparo de meios de cultura

O meio de cultura utilizado para cultivo de *Bti* foi constituído de glicose, extrato de levedura e rico em sais minerais. Foi preparado segundo metodologia modificada apresentada por LOPES *et al.* (2010). A metodologia apresentada neste trabalho consistiu no preparo de 100 mL de meio, porém também foram realizados cultivos em erlenmeyers contendo 150 mL do meio de cultura.

Foram preparadas soluções salinas concentradas de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em água purificada com concentrações de 0,1; 0,1; 0,022; 0,04 e 0,1 g/L, respectivamente. As soluções foram conservadas para estoque sob refrigeração.

Os volumes de 50 mL de solução de extrato de levedura com concentração de 4 g/L e pH ajustado para 7,0 com NaOH 0,1M ou HCl 0,1M foi transferido para erlenmeyers com capacidade de 250 mL. Estes foram previamente tamponados com tampões de algodão e esterilizados em autoclave vertical Phoenix/Luferco, modelo AV SD-30 a 121°C por 20 minutos. Os erlenmeyers estéreis adicionados de solução de extrato de levedura foram levados à autoclave novamente para esterilização do meio a 121°C por 15 minutos.

À parte, preparavam-se 47,5 mL de uma solução de glicose, adicionava-se 0,5 mL de cada solução salina estoque e ajustava-se o pH para 7,0 com NaOH 0,1M ou HCl 0,1M. Utilizando a 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 posteriormente para cada erlenmeyer, contendo o extrato de levedura. Os frascos contendo 100 mL de meio de cultivo foram 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 foram utilizados após verificação de não contaminação no teste de esterilidade.

3.1.2 Preparo de inóculos de *Bti*

A cepa de *Bti* utilizada foi a LFB-FIOCURUZ 584 (IPS 82), gentilmente cedida pelo Dr. Leon Rabinovitch, da Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Oswaldo Cruz, chefe do Laboratório de Fisiologia Bacteriana – LFB, curador da Coleção de Culturas do Gênero *Bacillus* e Gêneros Correlatos – CCGB.

A partir de uma fita impregnada com esporos de *Bti* inoculada em um tubo de ensaio contendo meio líquido de Caseína Soja e incubada em estufa bacteriológica a 30°C +/- 0,5°C por 48 horas foi realizada a transferência de alíquotas da cultura para meio Ágar Caseína Soja inclinado, que foi incubada também a 30°C +/- 0,5°C por 48 horas e conservada sob refrigeração por, no máximo, 2 meses. Para o crescimento em frasco agitado, foi realizada a reativação da cultura de *Bti* sob as mesmas condições de incubação, seguindo a metodologia apresentada por Ramírez-Lepe *et al.* (2003).

Para finalização do preparo do inóculo, foram tomadas alíquotas da cultura recém-ativada e estas foram transferidas para um frasco contendo solução salina estéril, 0,85% m/v, agitadas em vórtex, até que a suspensão adquirisse turvação igual à escala McFarland nº 10, que corresponde a cerca de 3 bilhões de bactérias por mL de meio.

3.1.3 Cultivo do *Bti* em meio líquido agitado

O meio de cultura para *Bti* foi adicionado em frasco erlenmeyer e submetido a agitação em mesa agitadora New Brunswick Scientific, modelo C25KC, com controle de temperatura por 47 horas, ou em agitador orbital BioSan OS-20 no interior de estufa bacteriológica Quimis Q316M4 por 76 horas, ambos a 30°C +/- 0,5°C, sob agitação de 200 rpm (LI *et al.*, 2011).

O volume de inóculo foi baseado na metodologia apresentada por Boniolo *et al.* (2012), cujo inóculo corresponde a 5% do volume inicial do meio de cultura.

Com auxílio de uma pipeta graduada estéril de 10 mL, tomaram-se 5,0 mL da suspensão preparada com padrão de turvação igual ao tubo nº 10 na escala McFarland, e transferiram-se para cada erlenmeyer contendo 100 mL do meio de cultura para cultivo de *Bti*. Quando os

erlenmeyers continham 150 mL de meio de cultura, inoculavam-se 7,5 mL da suspensão e incubavam-se a 30°C +/- 0,5°C com agitação de 200 rpm.

3.1.4 Controle de crescimento

Dos frascos inoculados e incubados, foram tomadas alíquotas únicas de 5 mL nos tempos 0, 7, 19, 23, 27, 31, 43 e 47 h no primeiro experimento; e nos tempos 0, 4, 7, 26, 30, 49, 55, 76 h no segundo experimento. Deste volume, um mililitro foi utilizado para realizar diluições seriadas de base 10 em tubos de ensaio contendo solução salina estéril 0,85% m/v, e 4 mL utilizados para medição de pH com medidor de pH e temperatura Hanna pHep® no momento da coleta. Essas amostras eram congeladas a -10°C para posterior dosagem de glicose. Destas alíquotas também se prepararam esfregaços em lâmina para realização de coloração de Gram.

Para a contagem microbiana, um mililitro das diluições 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} foi transferido para placas de Petri estéreis, em triplicata, e adicionou-se de 15 a 20 mL de meio Ágar Caseína Soja estéril, fundido e resfriado a cerca de 45 a 50°C. O conteúdo das placas era homogeneizado, e as placas deixadas em repouso para solidificar o meio, sendo incubadas em seguida em estufa bacteriológica a 30°C +/- 0,5°C para leitura das UFC/mL em contador de colônias PHOENIX CP 608, com 24 e 48 horas de incubação. Os dados foram utilizados para o número de log UFC/tempo.

3.1.5 Obtenção de pó fermentado seco de *Bti*

Ao término dos cultivos sob agitação, os meios com material crescido foram distribuídos em tubos de centrifugação tipo Falcon estéreis com capacidade de 50 mL. Metade dos tubos foi centrifugado sem lavagem e metade com lavagem com água purificada estéril, seguindo metodologia modificada de Ramírez-Lepe *et al.* (2003). Os tubos foram pesados em balança Coleman JB-600, as massas dos tubos com lavagem foram igualadas acrescentando-se água purificada estéril, e os tubos sem lavagem tiveram suas massas igualadas, transferindo-se alíquotas do cultivo de um tubo para o outro. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 2200 xg em centrífuga de bancada Fanem Excelsa II, modelo 206 BL, durante 10 minutos. Após a centrifugação, descartaram-se os sobrenadantes em hipoclorito de sódio 2% e o sedimento foi seco em estufa a 85°C por 24 horas (BONIOLO *et al.*, 2012).

Os tubos submetidos a lavagem tiveram o sedimento da primeira centrifugação adicionados de aproximadamente 30 mL de água purificada estéril. O sedimento, então, foi

novamente suspenso e realizou-se outra centrifugação. Essa etapa foi realizada três vezes antes da secagem do sedimento em estufa a 85°C por 24 horas. Todos os sobrenadantes foram descartados em hipoclorito de sódio a 2%.

3.1.6 Determinação da viabilidade dos esporos do pó seco

Com auxílio de um almofariz com pistilo estéril, o pó seco contendo esporos de *Bti* foi homogeneizado, pesou-se 0,1 g e foi preparada uma suspensão em 9,9 mL de solução salina estéril 0,85% m/v, seguindo metodologia de Elçin (1995). Homogeneizou-se a suspensão utilizando o agitador de tubos PHOENIX AP 56 e, em seguida, tomou-se 1 mL da suspensão e realizaram-se diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-8} em solução salina estéril 0,85% m/v. Foram inoculados em triplicata, 0,1 mL de cada diluição em placas de Petri contendo meio Ágar Caseína Soja, espalhadas com alça de drigalski e, então, estas foram levadas à estufa bacteriológica na temperatura de 30°C +/- 0,5°C por 36-48 horas para que fosse realizada a contagem de UFC/g.

3.1.7 Acompanhamento do grau de esporulação

Durante todo o experimento, fazia-se a observação do cultivo pelo preparo de esfregaços corado por Gram e observado sob óleo de imersão em microscópio binocular marca Motic®, modelo BA-300.

A coloração de Gram foi realizada após fixação à chama de pequena alíquota do cultivo. O esfregaço era corado com 2 gotas de solução de cristal violeta por 1 minuto, seguido da retirada do excesso do corante com água purificada e a colocação de 3 gotas de lugol também por 1 minuto, com a finalidade de fixar o corante. Em seguida, retirou-se o excesso de lugol com água purificada, gotejou-se etanol comercial gota a gota sobre o esfregaço até que escorressem gotas translúcidas. Após lavagem com água purificada, gotejaram-se 2 gotas de solução de safranina, que ficava por 30 segundos sobre o esfregaço, sendo o excesso do corante lavado com água purificada. Ao término do processo, deixava-se a lâmina secar espontaneamente para posterior observação microscópica para verificação do grau de esporulação do bacilo a cada intervalo de tempo acompanhado.

3.1.8 Dosagem da glicose no fermentado

As amostras mantidas congeladas a -10°C foram retiradas do congelador e esperou-se que retornassem à temperatura ambiente para serem transferidas para tubos de centrífuga em duplicata. Os tubos foram centrifugados a 2200 xg em centrífuga de bancada Fanem Excelsa 3, modelo 280, durante 10 minutos, e foi transferido 0,05 mL de cada amostra para novos tubos contendo 5 mL do Reagente 1 do kit Glicose Liquiform da marca Labtest. Dois tubos foram separados para o branco e o padrão. No primeiro, adicionaram-se 5 mL do Reagente 1; e no segundo, 5 mL do Reagente 1 com 0,05 mL do Padrão contido no kit. Todos os tubos foram homogeneizados em um agitador de tubos PHOENIX AP 56 e colocados em banho-maria digital PolyScience MX28C135-A11B a 37°C por 10 minutos. Aqueles que continham as amostras e o padrão tiveram suas absorbâncias determinadas a 505 nm, acertando o zero com o branco.

3.2 Testes de atividade larvicida

3.2.1 Preparo das suspensões do pó bruto seco de *Bti*

As suspensões do pó bruto seco de *Bti* foram preparadas de acordo com o protocolo WHO em diferentes concentrações para os testes larvicidas.

Pesou-se cada amostra do pó seco de *Bti* separadamente e adicionou-se a um balão volumétrico de 250 mL, contendo aproximadamente 100 mL de água purificada estéril. Agitou-se por 30 minutos em agitador magnético marca Fisatom, modelo 753A. Após esse tempo, realizou-se a imersão em banho de gelo e adicionou-se 1 gota de tween 80% P.S. marca VETEC, lote 22883; agitou-se por 2 minutos para garantir a homogeneidade da suspensão e se aferiu para volume final de 250 mL. (WHO, 2006).

3.2.2 Bioensaios larvicidas

Os bioensaios foram realizados no Laboratório do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães e foram utilizadas larvas de *Aedes aegypti* mantidas no laboratório em temperatura controlada a $+26^{\circ}\text{C}$ ou -1 . Colocaram-se em recipientes plásticos 100 mL de cada suspensão preparada nas concentrações: 0,02 mg/L, 0,05 mg/L, 0,08 mg/L, 0,15 mg/L, 0,20 mg/L, 0,25 mg/L, 0,30 mg/L, 0,35 mg/L e 0,40 mg/L. Adicionaram-se a cada recipiente plástico 20 larvas ativas de

estágio larval L3 (Figura 3). Para cada concentração, foram testadas três réplicas. Para cada bioensaio, realizou-se um controle negativo composto por todos os reagentes presentes na formulação. Determinou-se a mortalidade das larvas a cada 24 horas de exposição do início do teste. As larvas eram consideradas mortas quando não respondiam ao estímulo ou não emergiam à superfície da solução. A observação da atividade deu-se após o período de 24 horas.

Figura 3 – Bioensaio com larvas de *Aedes aegypti* frente a diferente concentrações



Fonte: A Autora, 2018.

3.3 Obtenção do óleo essencial de *Croton rhamnifolioides*

O óleo essencial foi obtido da planta de *Croton rhamnifolioides* coletada no município de Serra Talhada, localizada no sertão de Pernambuco, em meados de janeiro a março de 2017, e fez parte do projeto de pesquisa de Santos (2018).

Para a extração de óleos essenciais, foi utilizada a técnica da hidrodestilação das folhas de *Croton rhamnifolioides*, com duração de duas horas, utilizando uma adaptação do sistema de Clevenger (Figura 4), 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. As folhas secas de *Croton rhamnifolioides* tiveram sua dimensão diminuída e foram introduzidas em um balão de fundo redondo, sendo adicionada posteriormente água destilada.

Figura 4 Sistema Clevenger modificado para obtenção do óleo essencial



Fonte: Santos, 2018

3.4 Preparo das suspensões para o microencapsulamento

3.4.1 Preparo das suspensões do *Bti* + alginato de sódio a 2%

Pesou-se 0,1 g do pó fermentado seco de esporos de *Bti* em cabine de fluxo laminar, fazendo o uso de vidrarias e espátulas estéreis. Adicionaram-se aproximadamente 10 mL de água purificada estéril e realizou-se a diluição agitando-se com bastão de vidro até completar a suspensão. Filtrou-se em papel de filtro estéril da marca Quanty JP-41- faixa preta, de 12,5 cm de diâmetro e 80 g/m² de gramatura, para reter particulados oriundos de restos celulares e evitar possível entupimento no bico dosador do Encapsulador Buchi B 385- Pro. Após essa etapa, adicionou-se 0,4 g de alginato de sódio da SIGMA ALDRICH, Lote MK BP8122V; 0,1 mL de Tween 80% P.S. marca VETEC, lote 22883 estéreis e diluiu-se até o volume final de 20 mL.

3.4.2 Preparo das suspensões para o microencapsulamento do *Bti* + alginato de sódio a 2% + óleo essencial de *Croton Rhamnifolioides*

Pesou-se 0,1 g do pó fermentado seco de esporos de *Bti* em estufa de fluxo laminar, fazendo o uso de vidrarias e espátulas estéreis. Adicionaram-se aproximadamente 10 ml de água purificada estéril e realizou-se a diluição agitando-se com bastão de vidro até completar a suspensão.

Filtrou-se em papel de filtro estéril da marca Quanty JP-41- faixa preta, de 12,5 cm de diâmetro e 80 g/m² de gramatura, para reter particulados oriundos de restos celulares e evitar possível entupimento no bico dosador do Encapsulador Buchi B 385- Pro. Após essa etapa, adicionou-se 0,4 g de alginato de sódio, 0,1 mL de Tween 80% e diluiu-se até o volume final de 20 mL. Adicionaram-se a esta suspensão 2 mL do óleo de *Croton rhamnifolioides* aos poucos, agitando constantemente para manter a homogeneidade.

3.4.3 Preparo das suspensões para o microencapsulamento do óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* + alginato de sódio a 2%

Pesou-se 0,4 g de alginato de sódio, 0,1 mL de Tween 80%, e adicionaram-se 2 mL do óleo de *Croton rhamnifolioides* aos poucos, agitando constantemente em vórtex para manter a homogeneidade. Diluiu-se até o volume final de 20ml.

3.4.4 Preparo das suspensões do *Bti* + alginato de sódio a 1%

Pesou-se 0,1g do pó fermentado seco de esporos de *Bti* em cabine de fluxo laminar, fazendo o uso de vidrarias e espátulas estéreis. Adicionaram-se aproximadamente 10 mL de água purificada estéril e realizou-se a diluição agitando-se com bastão de vidro até completar a suspensão. Filtrou-se em papel de filtro estéril da marca Quanty JP-41- faixa preta, de 12,5 cm de diâmetro e 80 g/m² de gramatura, para reter particulados oriundos de restos celulares e evitar possível entupimento no bico dosador do Encapsulador Buchi B 385- Pro. Após essa etapa, adicionou-se 0,2 g de alginato de sódio, 0,1 mL de Tween 80%, e diluiu-se até o volume final de 20 mL.

3.5 Produção das microesferas

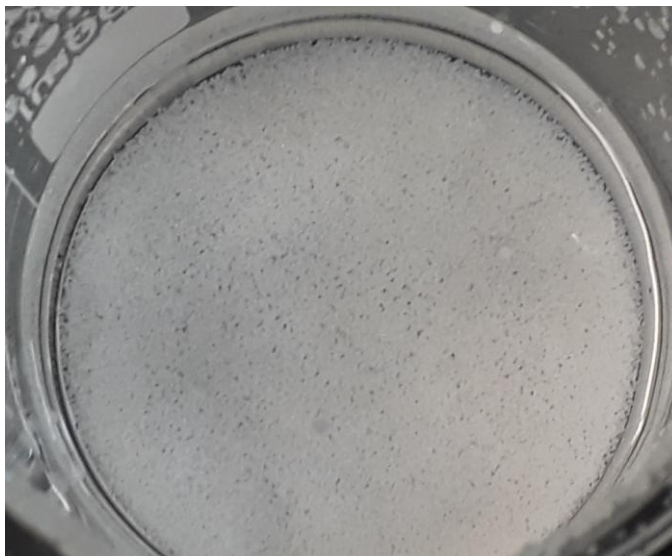
As microesferas de alginato de sódio contendo as substâncias ativas (Bti/Bti+óleo essencial/ óleo essencial) foram obtidas através da técnica de coacervação em etapa única. A suspensão foi gotejada através de uma seringa de 10mL com bico rosqueável em uma solução de cloreto de cálcio a 3% (p/v), através do encapsulador BUCHI B-390, a temperatura ambiente (Figura 5). A abertura interna do bico utilizado foi 0,3 mm, com frequência de 1740 Hz, potência de 980 mV. O gotejamento da suspensão foi controlado por uma bomba de injeção com fluxo de 24 mL/min para as microesferas do Bti e Bti+óleo em alginato a 2% e microesferas de Bti+óleo em alginato a 1%. Para as microesferas de óleo essencial em alginato a 2% foi usada o fluxo de 25 ml/min. Após a formação, as microesferas permaneceram sob agitação por 30 minutos e, posteriormente, foram filtradas e lavadas três vezes com água purificada para eliminar toda a solução de cloreto de cálcio na parede das microesferas (Figura 6).

Figura 5 – Encapsulador BUCHI B-390- produção das microesferas



Fonte: A autora, 2018.

Figura 6 - Microesferas de *Bti* + alginato a 2% + óleo



Fonte: A autora, 2017.

3.6 Quantificação da imobilização da substância ativa nas microesferas

As microesferas de alginato foram submetidas à liberação para quantificação do total imobilizado em relação ao número de UFC/g do *Bti*.

Pesou-se separadamente, em triplicata, em bécker estéril e pré-tarado, a quantidade de 1 mL das microesferas de *Bti* + alginato a 2%, *Bti* + alginato a 2% + óleo de *Croton rhamnifolioides* e de *Bti* + alginato a 1% + óleo de *Croton rhamnifolioides* para determinação da massa seca a 100°C/ 24horas. Em paralelo, 1 mL de cada suspensão de partículas foi dissolvido em 9,0 mL de solução tampão fosfato KH_2PO_4 1,64M, sob agitação em vórtex e repouso por um período de cerca de 30 minutos, até verificação visual da total solubilização das microesferas (BLANCO et al., 2002). Em seguida, foi inoculado em superfície de meio CASO, 0,1 mL das diluições 10-1 a 10-7 de cada suspensão decimal, em duplicata, e incubadas a 35°C por 72 horas para contagem do número de UFC. Ao final das contagens, estas foram corrigidas para uma massa seca de 1g.

3.7 Caracterização das microesferas

As microesferas obtidas foram caracterizadas de acordo com os métodos descritos a seguir.

3.7.1 Aspecto visual

A coloração e a homogeneidade das micropartículas foram observadas visualmente e a verificação de eventuais instabilidades visualmente perceptíveis foi notificada.

3.7.2 Aspectos morfológicos

Fez-se a avaliação dos aspectos morfológicos das partículas a fim de se observar a presença de possíveis aglomerados, bem como a homogeneidade do sistema. Uma alíquota da amostra foi transferida para uma lamínula e, posteriormente, analisada em 40x em lupa estereoscópica.

3.7.3 Determinação do tamanho das microesferas no MEV – Microscópio de Varredura Eletrônica

As análises foram realizadas no Microscópio de Varredura Eletrônica – MEV, modelo LEO SRV-32, marca ZEISS (Figura 7), no Laboratório de Microscopia, em parceria com a empresa Arconic Indústria e Comércio de Metais Ltda., Itapissuma - PE.

Realizou-se uma avaliação de rugosidade e porosidade da superfície das microesferas, bem como a determinação dos diâmetros. Transferiu-se uma alíquota para uma base com fita de carbono, deixou-se em repouso no dessecador à temperatura ambiente até que todo o fluido secasse. Posteriormente, realizou-se a análise.

Figura 7 - Microscópio de Varredura Eletrônica, LEO SRV-32 – ZEISS



Fonte: A Autora, 2018.

3.8 Testes de atividade larvicida

3.8.1 Preparo das microesferas para teste larvicida

Antes de iniciar o preparo, as microesferas foram deixadas em papel de filtro estéril para secagem em meio ambiente. Após a obtenção das microesferas secas, pesou-se 1,0 g e 0,5 g das microesferas diretamente nos recipientes plásticos de 180 mL e cobriu-se com filme para conservação das microesferas.

Adicionaram-se a cada recipiente plástico 100 mL de água destilada e 20 larvas na fase L3. Para cada massa, testaram-se três réplicas. Para cada bioensaio, realizou-se um controle negativo composto por todos os reagentes presentes na formulação. Determinou-se a mortalidade das larvas a cada 24 horas de exposição do início do teste. As larvas eram consideradas mortas quando não respondiam ao estímulo ou não emergiam à superfície da solução. A observação da atividade deu-se após o período de 24, 48 e 72 horas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item estão apresentados os principais resultados obtidos através dos bioensaios realizados, utilizando *Bti* e óleo essencial da planta *Croton rhamnifolioides* encapsulado (utilizando a metodologia de sistemas de liberação controlada) no combate ao mosquito *Aedes aegypti* em sua fase L3. As atividades larvicidas testadas foram realizadas nos laboratórios do AGGEU MAGALHÃES e LIKA, ambos situados na UFPE.

4.1 Controle de crescimento de Bti

As condições de cultivo de Bti estão apresentados na tabela 1, de acordo com os dois experimentos realizados modificando o tempo de cultivo.

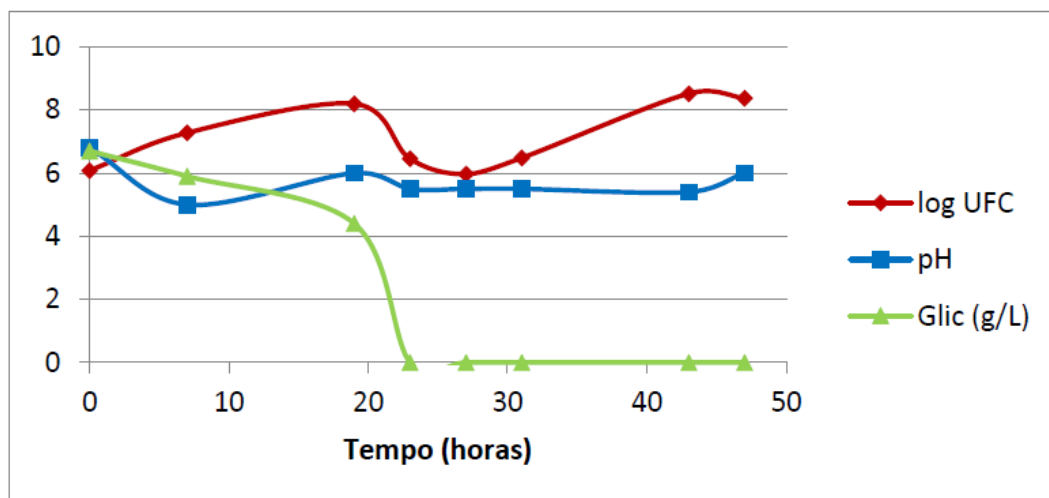
Tabela 1 - Condições de cultivo de *Bti* em meio caseína soja

Condição do Ensaio	Experimento 1	Experimento 2
Volume de meio de cultura (mL)	100	100
Quantidade de frascos	10	6
Tempo de cultivo (horas)	47	76
Temperatura (°C)	30	30
Agitação (rpm)	200	200

Fonte: Moura, 2016

Os dois experimentos resultaram a construção de curvas de crescimento (log UFC/h), de consumo de glicose e de variação de pH em função do tempo. A Figura 8 representa o experimento 1 realizado em frascos com 100 mL de meio de cultura, Constatou-se que houve um crescimento exponencial (fase logarítmica) por cerca de 7 horas de cultivo. Entre cerca de 7 e 19 horas, observou-se uma fase estacionária; e início da fase de declínio após aproximadamente 19 horas de cultivo, devido à depleção da glicose, que alcançou seu consumo total por volta das 23 horas. A contagem máxima de células de *Bti* ocorreu com cerca de 19 horas de incubação.

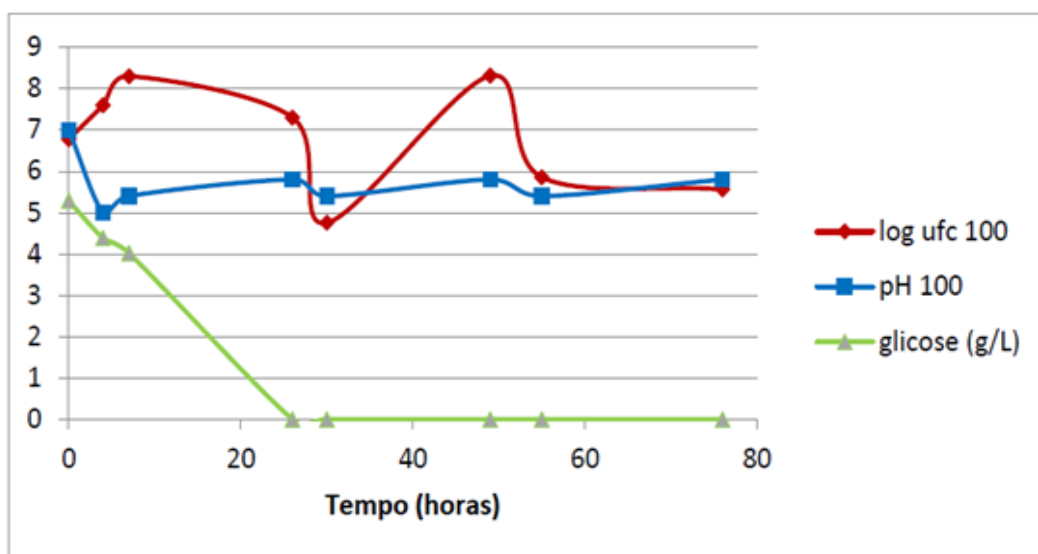
Figura 8 - Curva de crescimento, variação de pH e consumo de glicose do experimento 1 (*Bacillus*)



Fonte: Moura, 2017.

A Figura 9 corresponde às curvas dos parâmetros analisados no experimento 2. Igualmente à curva de crescimento mostradas acima, a fase estacionária teve início com cerca de 7 horas de cultivo. A fase de declínio coincidiu com o consumo total da glicose, o que ocorreu com cerca de 26 horas, semelhante ao Gráfico 1. Esses dados são comparáveis à literatura. Li *et al.* (2011) obtiveram fase logarítmica presente entre 2 e 12 horas, das 12 às 26 horas, fase estacionária, fase de morte após 26 horas, e as denominou de fase vegetativa média, fase de esporulação antecipada e fase de esporulação tardia, respectivamente.

Figura 9 - Curva de crescimento, variação de pH e consumo de glicose do experimento 2 (*Bacillus*)



Fonte: Moura, 2017.

4.2 Acompanhamento da esporulação de *Bti*

Foi constatado que, mesmo não havendo controle de pH durante os cultivos de *Bti*, o mesmo se manteve equilibrado numa faixa de 7 a 5, sem grandes variações. O acompanhamento do grau de esporulação por observação microscópica das lâminas coradas apresentou esporulação nítida e formação dos cristais intracelulares entre 19 e 26 horas de cultivo em todos os experimentos, coincidindo com o período em que se inicia a fase de declínio. O maior grau de esporulação foi observado com 43 horas do experimento 1 e com 30 horas de cultivo no experimento 2, todos inseridos na fase de esporulação tardia dos cultivos. Comparando as lâminas correspondentes aos experimentos 1 e 2, o segundo apresentou maior grau de esporulação, constatando que o cultivo com duração de 76 horas foi mais produtivo com relação à formação de esporos de *Bti* do que o cultivo com duração de 47 horas.

Nas curvas de crescimento, foi observado um pico de crescimento celular incomum, com cerca de 43 e 49 horas dos cultivos realizados. Apesar da glicose e de outros nutrientes do meio já terem exaurido, isso pode ter acontecido devido ao fato de algumas células que começaram a esporular na fase de esporulação precoce já estarem completamente esporuladas na fase de esporulação tardia, sendo assim liberados seus esporos e cristais intracelulares após a lise celular. Com a lise das células, outros materiais intracelulares também são liberados no meio, servindo de fonte de nutrientes para que estes esporos germinassem e produzissem células vegetativas, que esporularam novamente após a depleção dos nutrientes provenientes dos materiais intracelulares liberados no meio (VU et al., 2009).

4.3 Viabilidade dos esporos

Após um período de estocagem a -10°C , foi determinada a viabilidade dos esporos contidos no pó seco obtido ao término de cada cultivo, sendo escolhidas as amostras sem lavagem dos cultivos realizados em 100 mL (Tabela 2).

Tabela 2 - Viabilidade dos esporos de *Bti*

	Experimento 1	Experimento 2
Amostra	Com lavagem	Sem lavagem
Viabilidade de esporos	$9,8 \times 10^6$	$8,5 \times 10^7$
Contagem ao término do cultivo (log UFC)	8	6

Fonte: Moura, 2017.

4.4 Atividade larvícida do pó seco de *Bti*

Foram realizados bioensaios exploratórios de uma amostra não lavada do experimento 1, cujo cultivo foi realizado em 100 mL de meio de cultura por 47 horas. Os resultados obtidos confirmaram a atividade larvícida do material seco contendo esporos e toxinas de *Bti*, apresentando 100% de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* a partir da concentração 0,2 mg/L.

Determinou-se a potência tóxica para o pó seco na amostra não lavada após um período de armazenamento em geladeira comum a -10°C após 4 meses) e após período de 18 meses. Nas tabelas 3 e 4, estão apresentados os valores da potência em UTI/mg e as concentrações letais capazes de eliminar 50% (CL50) e 90% (CL90) dos indivíduos expostos ao larvícida, no período de 24 horas, tendo como referência a potência de 15.000 UTI/ mg da cepa padrão IPS 82. Os dados de mortalidade registrados nos ensaios foram analisados por regressão linear Log-Probit.

Tabela 3 - Atividade larvícida - Bioensaios após 4 meses de armazenamento

Datas de bioensaios	CL50 (intervalo de confiança de 95%)	CL90 (intervalo de confiança de 95%)
24/04/2017	0,10 (0,096 - 0,112)	0,17 (0,15 - 0,18)
25/04/2017	0,15 (0,15 - 0,17)	0,25 (0,233-0,277)
16/05/2017	0,12 (0,11-0,13)	0,21 (0,19-0,232)

Fonte: Modificado de Araújo, 2017.

Tabela 4 - Atividade larvícida - Bioensaios após 18 meses de armazenamento

Datas de bioensaios	CL50 (intervalo de confiança de 95%)	CL90 (intervalo de confiança de 95%)
26/10/2018	0,095 (0,086 – 0,105)	0,183 (0,163 – 0,213)
27/11/2018	0,141 (0,130-0,152)	0,228 (0,213-0,248)

Fonte: Modificado de Araújo, 2018.

Obtiveram-se, nos ensaios de probits após 4 meses de armazenamento, os seguintes resultados: CL50 média = 0,12 mg/L, com limite inferior e superior de 0,096 mg/L e 0,15 mg/L), respectivamente. A CL 90 média foi de 0,21 mg/L, com a limites inferior e superior de 0,18 e 0,277, respectivamente.

Para as amostras após 18 meses de armazenamento, o ensaio de probits mostrou os seguintes resultados: CL50 = 0,118 mg/L, com limites inferior e superior de 0,086 mg/L e 0,152 mg/, enquanto a CL 90 foi de 0,205 mg/L, com a variação de limite inferior e superior de 0,163 mg/L e 0,248 mg/L respectivamente, entre os valores mais baixos e mais altos. A potência estimada para o produto foi de 1.500 UTI/mg, para as amostras testadas dos dois períodos.

Com esses resultados pôde-se comprovar que as potências tóxicas larvicidas de CL50 (0,12 mg/L) e CL 90 (0,21 mg/L), foram mantidas para os tempos de armazenamento entre 4 meses e 18 meses. Esses resultados mostraram-se satisfatórios quanto à metodologia usada, de baixo custo e de pequena escala em laboratório, para a obtenção do pó fermentado seco e manutenção em geladeira comum em temperatura de -10°C.

4.5 Quantificação de *Bti* encapsulado na microesfera

Após a solubilização e inoculação das microesferas, os resultados encontrados em UFC/g foi de 7×10^4 para *Bti* + alginato 2%; de 3×10^4 para *Bti* + alginato 2% + óleo; e de 2×10^4 para *Bti* + alginato + óleo 1%, mostrando uma regularidade no encapsulamento do *Bti* nas diferentes condições testadas.

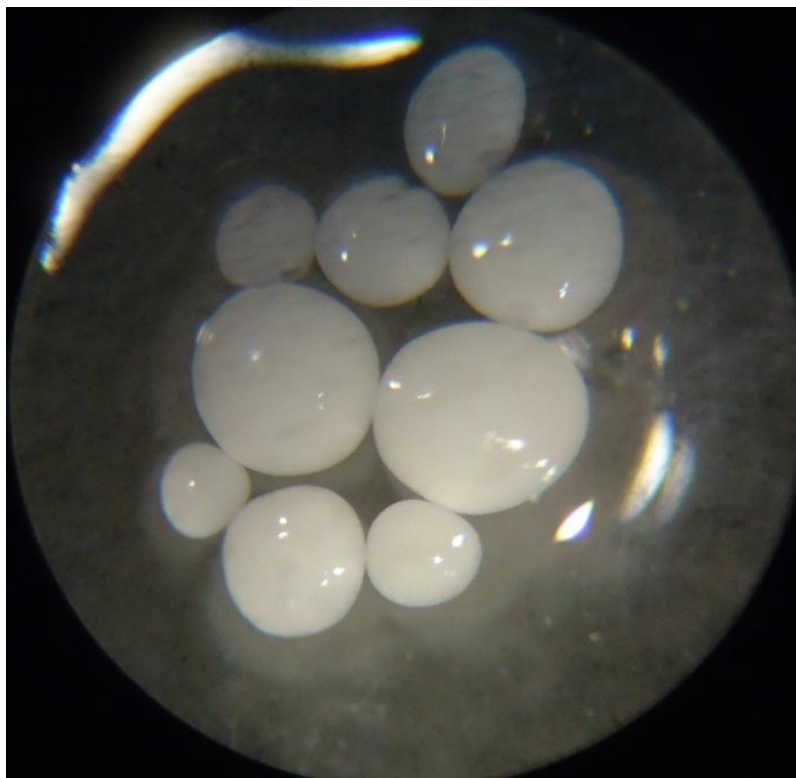
Resultados similares foram constatados por Prabakaran (2001) ao imobilizar esporos de *Bti* com o uso de alginato de sódio e solução de CaCl_2 . Cujas imobilizações também foram na ordem de 10^4 UFC.

4.6 Caracterização das microesferas

4.6.1 Microesferas em alginato a 2%

A morfologia externa das microesferas do *Bti* + alginato a 2% e *Bti* + alginato a 2% + óleo de *Croton rhamnifolioides* apresentou-se esférica com bordas uniformes e delimitadas. Aglomerados não foram observados (Figura 10).

Figura 10 - Microesferas *Bti* + óleo em alginato de sódio a 2% – 40x

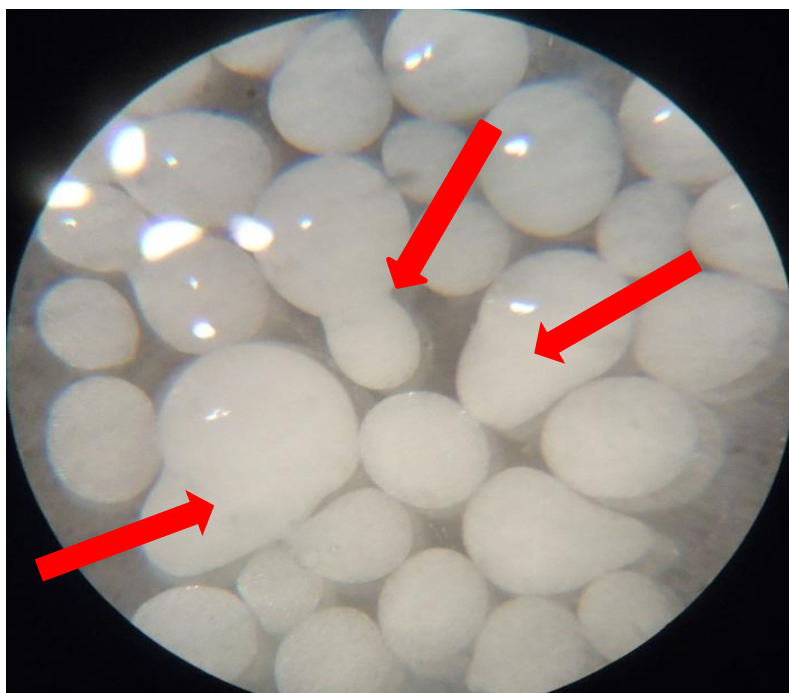


Fonte: Lima, 2018.

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. É possível observar as microesferas que são caracterizadas pelo sistema matricial, que é uma matriz única, em que o material ativo se encontra disperso e/ou solubilizado na matriz polimérica, não sendo possível identificar um núcleo diferenciado, dando características a este sistema formado (LIMAYEN; CHARCOSSET; FESSI, 2004).

As microesferas do óleo de *croton rhamnifolióides* + alginato de sódio a 2% não se apresentaram uniformes, com um alongamento em suas bordas fazendo alusão a um aglomerado ou má formação (Figura 11). O fenômeno de aglomerado foi reportado para microesferas de alginato obtidas por geleificação externa devido à adição de cloreto de cálcio à emulsão da água/ óleo, que pode induzir à ruptura do sistema emulsão equilíbrio (SHANMUGANATHAN, 2008).

Figura 11 - Microesferas óleo + alginato a 2% – 40x

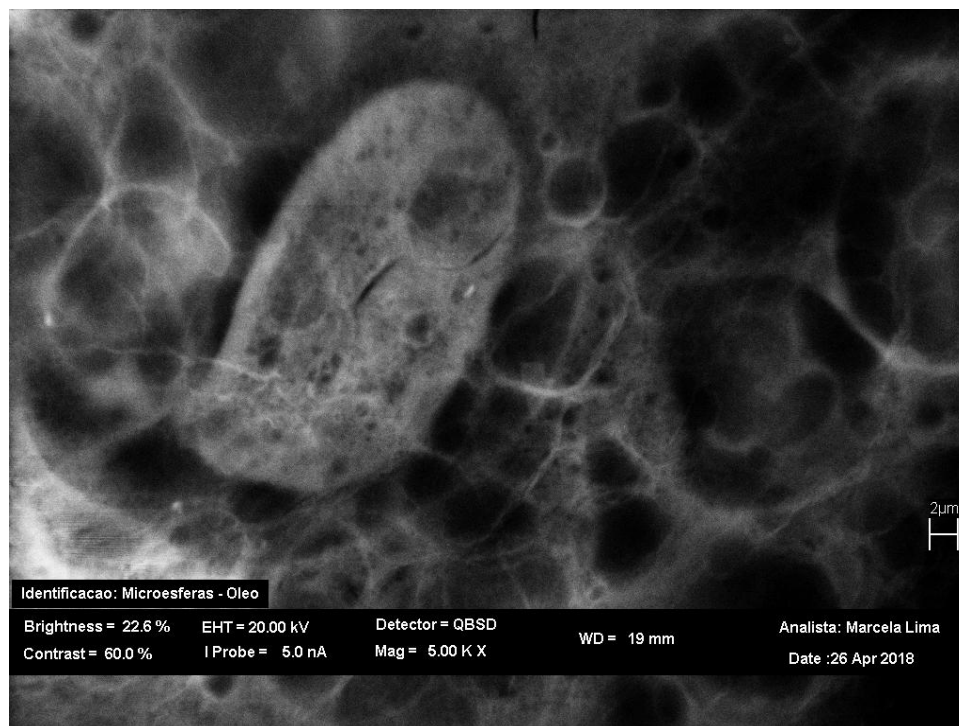


Fonte: Lima, 2018.

4.6.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens obtidas via MEV indicaram que as microesferas possuem superfície porosa e confirmaram a morfologia esférica e as bordas uniformes para as microesferas de *Bti* + alginato a 2% + óleo. Enquanto que, nas microesferas de óleo + alginato de sódio a 2%, confirma a presença de um alongamento de suas bordas caracterizando o aglomerado. A superfície apresentou-se rugosa (Figura 12).

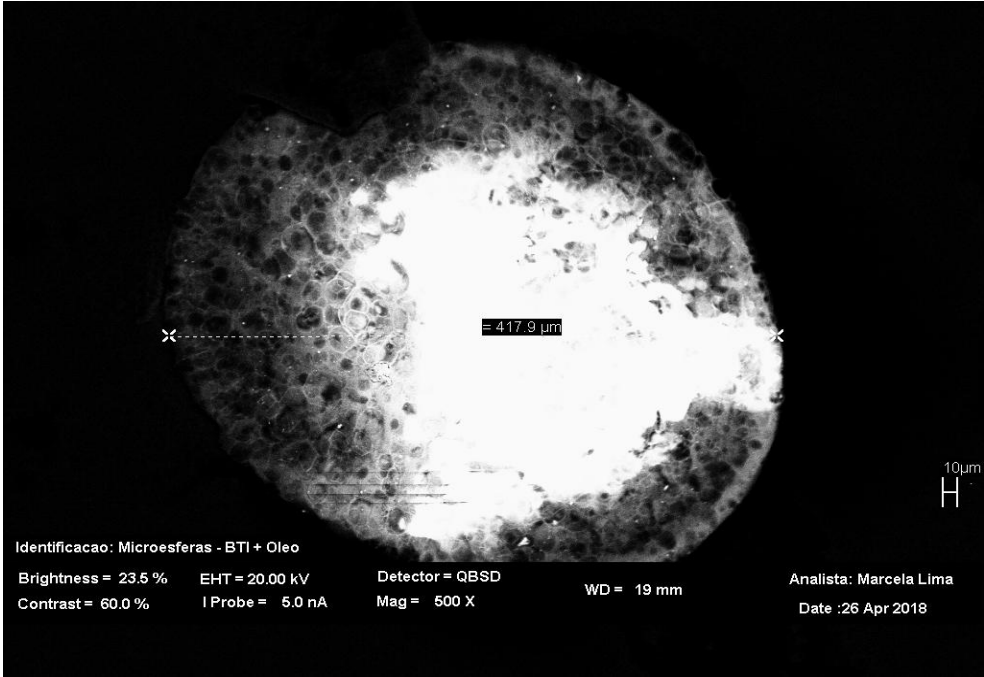
Figura 12 - Superfície de microesferas Bti+ alginato a 2% + óleo de Croton rhamnifolioides (rugosa) MEV



Fonte: Lima, 2018

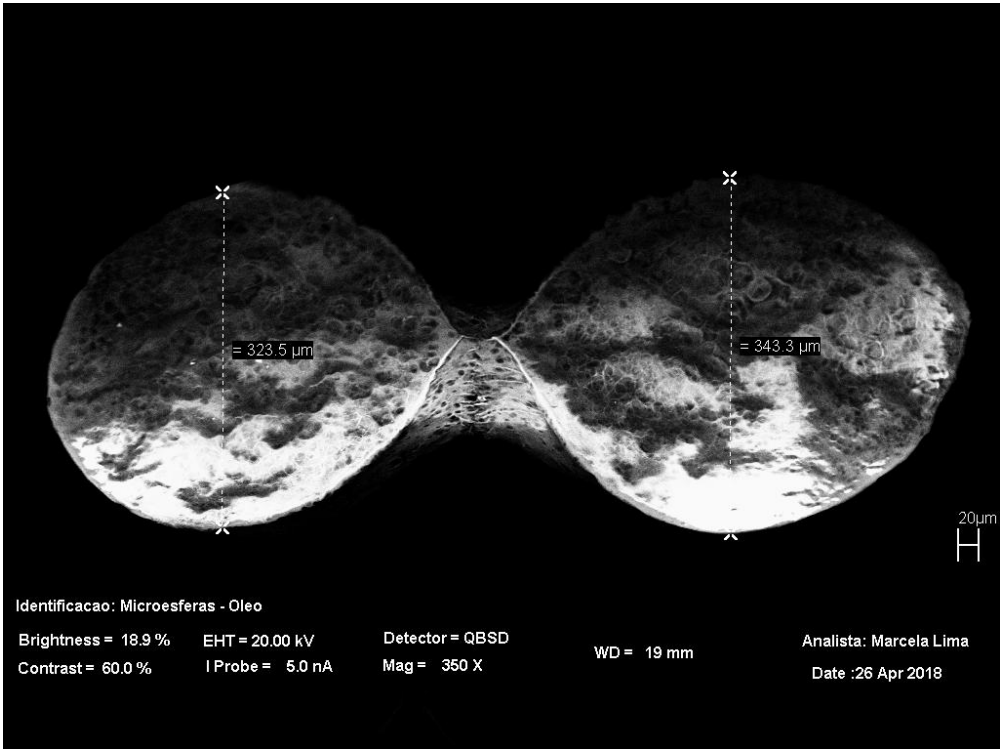
Houve variação no tamanho das microesferas Bti + óleo + alginato a 2% com uma média em 356 μm e máximo de 417,6 μm (Figura 13). Para as microesferas de óleo + alginato, o diâmetro médio encontrado foi de 323,5 μm (Figura 14). O encapsulador Buchi B95-pro envolve a tecnologia de vibração baseada na quebra 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 aspersão e tensão do eletrodo), o que influencia diretamente a produção uniforme de microesferas no microencapsulador é a viscosidade da solução polimérica (BIANCO, 2016).

Figura 13 - Microesferas *Bti* + óleo + alginato a 2%- MEV



Fonte: Lima, 2018.

Figura 14 - Microesferas óleo + alginato a 2%- MEV

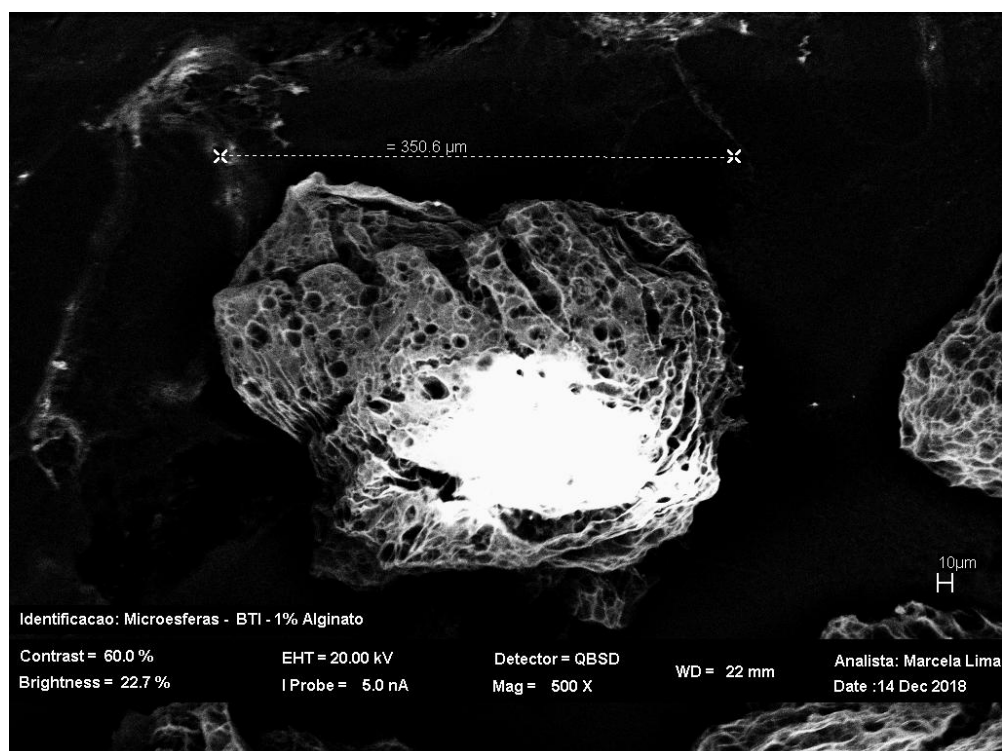


Fonte: Lima, 2018

Para as microesferas de *Bti* + óleo + alginato a 1%, as características obtidas foram similares às microesferas com parede a 2%, com exceção da padronização dos diâmetros obtidos. As microesferas apresentaram-se uniformes, circulares, sem aglomerados, com diâmetro consistente em média 316,8 μm (Figura 15) e superfície porosa (Figura 16).

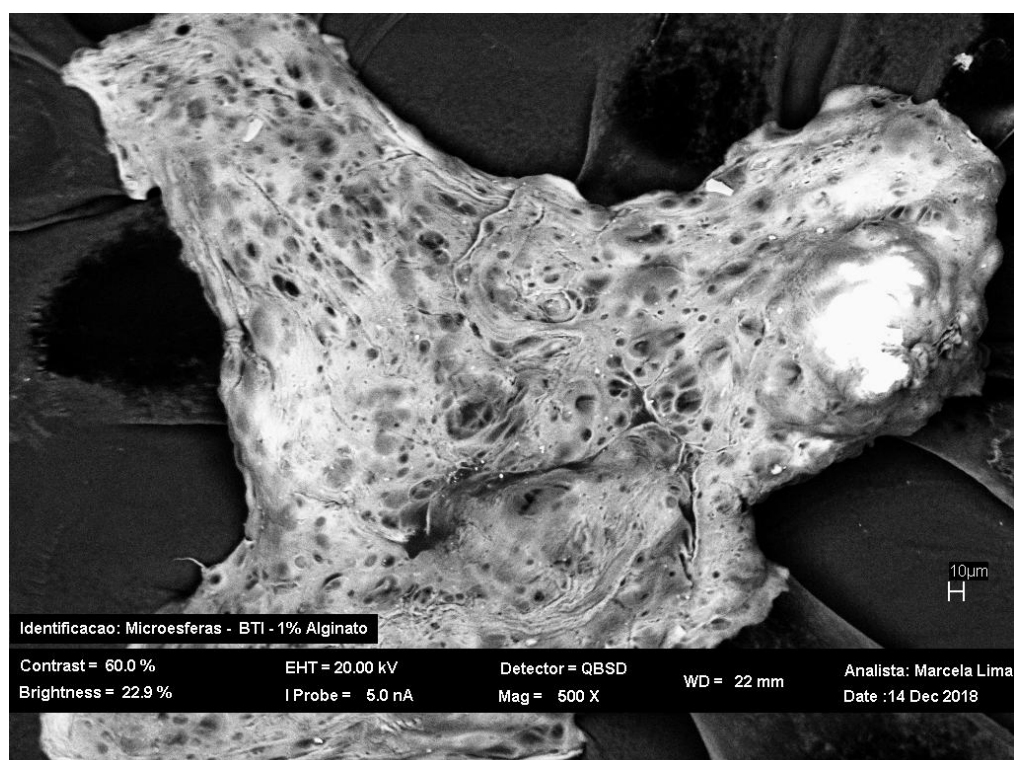
Em Nemethova (2014), foram testadas diferentes concentrações do alginato 0,5-4,0% para evidenciar o efeito da viscosidade do polímero na uniformidade dos diâmetros. Em viscosidade na faixa de 50 a 200 cP, foram obtidos diâmetros entre 200 e 600 μm . Com esses resultados, os autores indicam vários aspectos práticos importantes, necessitando do uso de um polímero específico na produção de microesferas com tamanho definido. Primeiramente, sua viscosidade deve ser levada em conta principalmente quanto ao alcance dos bicos aplicáveis e, assim, definir a gama de tamanhos alcançáveis de microesferas produzidas. Se muito alta, a viscosidade pode causar entupimento gradual de bicos específicos, o que consequentemente determina o diâmetro mínimo aplicável do bocal e, portanto, o tamanho mínimo possível de microesferas. Além disso, quanto maior a viscosidade, menor o efeito de vibração sobreposta na produção de microesferas. Por outro lado, viscosidade muito baixa pode levar a limitações em termos de incapacidade para produzir microesferas esféricas usando bicos particulares.

Figura 15 - Microesferas de *Bti* + óleo +alginato a 1%- MEV



Fonte: Lima, 2018.

Figura 16 - Superfície de microesferas de *Bti* + óleo + alginato a 1%- MEV



Fonte: Lima, 2018.

4.7 Atividade larvica das microesferas

Foram realizados três bioensaios das microesferas de *Bti* + óleo + alginato a 2%, microesferas de óleo + alginato a 2% e de *Bti* + alginato a 2%. Nenhum dos ensaios apresentou mortalidade frente às larvas do mosquito *Aedes Aegypti* após 24 horas de exposição. Diante dos resultados obtidos, não foram considerados satisfatórios os testes com as microesferas de *Bti* + óleo + alginato a 2% e partiu-se para testar as microesferas de *Bti* + óleo + alginato com a parede mais fina a 1%. Os resultados dos bioensaios estão demonstrados abaixo em % taxa de mortalidade das larvas, para as massas de 0,5 g e 1,0 g nos tempos 24, 48 e 72 horas.

Tabela 5 - Atividade larvica - Microesferas de *Bti* + óleo + alginato a 1%

Massa da microesfera	24 horas	48 horas	72 horas
0,5 g	40%	50%	50%
1,0 g	60%	80%	90%

Fonte: A autora, 2018.

Conforme mostrado na tabela 5, 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.

5 CONCLUSÃO

Diante dos testes realizados com as microesferas de Bti com óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* foi possível concluir:

As etapas em bancada para produção de pó ativo de Bti foram realizadas com o uso de técnica simples de secagem em estufa, sem a necessidade de metodologia de elevado custo como a liofilização;

O pó bruto seco de Bti pode ser conservado no congelador de refrigerador comum a -10 (dez)° C mantendo as suas características de atividade larvica após um período de 18 meses de armazenamento;

É viável o microencapsulamento do Bti com óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* em alginato de sódio para o controle do mosquito *Aedes aegypti*;

As microesferas do Bti com óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* em alginato a 2% não possui atividade larvica contra o *Aedes aegypti*;

As microesferas do Bti com óleo *Croton rhamnifolioides* em alginato a 1% possui atividade larvica contra o *Aedes aegypti*.

A atividade larvica 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*.

Não houve interferência entre o Bti e o óleo essencial no preparo das microesferas;

O processo de microencapsulamento pode ser otimizado, variando as concentrações do alginato de sódio para encontrar a melhor eficiência de encapsulamento e da atividade larvica no controle do *Aedes aegypti*.

REFERÊNCIAS

- AUGUSTO, L. G. S. Saúde e ambiente. In: BRASIL. Ministério da Saúde. **Saúde no Brasil: contribuições para a agenda de prioridades de pesquisa**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, p. 197-224, 2004.
- AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. *Alimentos e Nutrição*, v.16, n.1, p. 89-97, 2005. Disponível em: <<http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/view/106/119>>. Acesso em: 30 jun. 2016. DOI: ISSN 0103-4235.
- BARCELLOS, C.; QUITÉRIO, L. Vigilância ambiental em saúde e sua implantação no Sistema Único de Saúde. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 170-177, 2006.
- BARRETO, C. F. *Aedes aegypti* - Resistência a inseticidas químicos e novas alternativas de controle. **Revista Eletrônica da Faculdade de Montes Belos**, v. 1, n. 2, p. 62-73, 2005.
- BERRY, P. E.; HIPPI, A. L.; WURDACK, K. L.; VAN, E. E.; RIINA, R. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonaeae (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and trnL-trnF sequence data. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 92, n. 9, p. 1520-1534, 2005.
- BEZERRA, A.C.V. Vigilância em saúde ambiental no Brasil: heranças e desafios. **Saúde Sociedade São Paulo**, v.26, n.4, p.1044-1057, 2017.
- 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.
- BLANCO, Maria Guadalupe Maldonado; WONG, Luiz Jesús Galán; PADILLA, Cristina Rodríguez; MARTÍNEZ, Humberto Quiroz. Evaluation of polymer-based granular formulations of *Bacillus thuringiensis israelensis* against larval *Aedes aegypti* in the laboratory. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 18, n. 4, p. 352-358, 2002.
- 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.
- 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.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. Ministério da Saúde. **Subsídios construção política em saúde ambiental**. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/subsidios_construcao_politica_saude_ambiental.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2018.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. Ministério da Saúde. **Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD)**. Brasília (DF). 2002. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pncd_2002.pdf>. Acesso em: 01 dez. 2018.

L, A.; SARJEET, S. G.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control, **Toxicon**, 49 (4), p. 423-425, 2007.

CAVALC, P.A.M.; LOLIS, M.I.G.A.; REIS, B.; BONATO, C.M. Homeopathic and larvicide effect of Eucalyptus cinerea essential oil against *Aedes aegypti*. **Brazilian Archives Biology and Technology and Internacional Journal**, n. 53, p.835-843, 2010

CHENG, S. S.; CHANG, H. T.; CHANG, S. T.; TSAI, K. H.; CHEN, W. J. (2003) Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. **Bioresour Technol**, 2003.

CHRISTOPHERS, S.R. *Aedes aegypti* (L.), the Yellow Fever Mosquito. Its life history, bionomics and structure. London: **Cambridge University Press**; 1960

CHUNG, K. S.; SEO, J. Y.; LIM, J. H.; PARK, H. H.; YEA, M. J.; PARK, H. J. Microencapsulation of essential oil for insect repellent food packaging system. **Journal of food science**, v. 78. n. 5, 2013.

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.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Recent Developments in Microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, p. 1361-1394, 2005.

DIAS, C. N.; MORAES, D. F. C. Essential oil and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: Review. **Parasitology Research**, v. 113, p. 565-592, 2014.

ESPÍNDOLA, C. B.; GUEDES, R. N.; SOUZA, R. C. P. Avaliação da eficácia do *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* no controle de formas imaturas do *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) em ambiente de laboratório. **EntomoBrasilis**, 2008.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 11, n. 2, p. 103-112, 2008.

FIOCRUZ. **Dengue**. Disponível em: <<http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/oportunista.html>>. Acesso em: 10 out. 2018.

FIOCRUZ. **Dengue**. Disponível em:

<<http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/sobreovirus.html> >. Acesso em: 16 out. 2018.

FREITAS, C. M. Problemas ambientais, saúde coletiva e ciências sociais. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 1, p. 137-150, 2003.

FREITAS, C. M.; PORTO, M. F. Saúde, ambiente e sustentabilidade. Rio de Janeiro: **Fiocruz**, 2006

GARCEZ, W.S.; GARCEZ, F.R.; SILVA, L.M.G.E.; SARMENTO, U.C.S. Substâncias de origem vegetal com atividade larvicida contra *Aedes aegypti* **Revista virtual química**, v.5, n.5, p.363-393, 2013.

GONSALVES, J. K. M. C; COSTAL, 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.

GOUIN, S. Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends **Trends in Food Science & Technology**, p. 330–347, 2004.

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.

HENRIQUE, J. S.; FALCARE, R. S.; LOPES, P. S. Sistemas de liberação controlada. **Revista Pharmacia Brasileira**, 2006.

HERMAN HOFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, p. 242-255, 1989.

JOHARCHI, M.R.; AMIRI, S.M. Taxonomic evaluation of misidentification of crude herbal drugs marketed in Iran **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 2, n. 2, 2012.

JYOTHI, N. V. ; PRASANA, P. M.; SAKARKAR, S. N.; PRABHA, K. S.; RAMAICH, P. S.; SRAWAN, G. Y. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. **Journal of Microencapsulation**, p. 187-197, 2010.

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. **Parasitol Research**, 110: 1173-1178, 2012.

LACEY, L. A. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *bacillus sphaericus* for mosquito control. **Journal of the American Mosquito Control Association**, 2007.

LAOHASONGKRAM, K. et al. Microencapsulation of Macadamia oil by spray drying. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 1660-1665, 2011.

LI, Xiaohui, DING, Xuezhhi, XIA, Liquiu, SUN, Yunjun, YUAN, Can, YIN, Jia. Proteomic Analysis of *Bacillus thuringiensis* Strain 4.0718 at Different Growth Phases. **The Scientific World Journal**, v.2012, 2011

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

LOPES, J.; ARANTES, O. M. N.; CENCI, M. A. Evaluation of a new formulation of *Bacillus thuringiensis israelensis*, **Braz. J. Biol.**, v. 70, n. 4, 2010.

MADENE, A. et al. Flavor encapsulation and controlled release – a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, n. 1, p. 1-21, 2006.

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

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

POLANCZYK, 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.

PORRASPITA, C. O. C.; RIZO, A. G.; DIAZ, Z. M.; IBANEZ, A. C.; AGUILA, V. B.; PEREZ, M. D.; ARMAS, R. G. Influence of biotic fators on the efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against *Aedes aegypti* (Diptera: Culidae) **Revista Cubana de Medicina Tropical**, 64 (3) 235-243, 2012.

RAMÍREZ-LEPE, M.; RAMÍREZ-SUERO, M. Biological Control of Mosquito Larvae by *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis*. **Insecticides - Pest Engineering**. ISBN 978-953-307-895-3, p. 239-262, 2012.

RAMIREZ-LEPE, M.; AGUILAR, O.; RAMIREZ-SUERO, M.; ESCUDERO, B. Protection of the spore-toxin complex of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* from ultraviolet irradiation with aluminum CMC encapsulation and photoprotectors. **Southwestern entomologist**, v. 28, n. 2, jun. 2003.

RANDAU, K. P.; FLORÊNCIO, D. C.; FERREIRA, C. P.; XAVIER, H. S. Estudo farmagnóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 2, p. 89-86, 2004.

RATHORE, S.;DESAI,P.M.;LIEW,C.V.;CHAN,L.W.;HENG,P.W.S. Microencapsulation of microbial cells. **Journal of Food Engineering**,v. 116, n. 2, p. 369-381, 2013.

REGIS, L.; SILVA, S. B.; MELO-SANTOS, M. A. V. The use of bacterial larvicides in mosquito and black fly control programmes in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, Suppl I: 207-210, 2000.

- RIOS,N.;STASHENKO,E.E.;DUQUE,J.E.; Evaluation of the insecticidal activity of essential oils and their mixtures against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) **Revista Brasileira de Entomologia**, p.307–311, 2017.
- 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**, 17 (4), p. 547-559, 2007.
- ROSA, C.S.; VERAS, K.S.; SILVA, P.R.; LOPES NETO, J.J; CARDOSO, H.L.M.; ALVES, L.P.L.; BRITO, M.C.A.; AMARAL, F.M.M; MAIA, J.G.S.; MONTEIRO, O.S.; MORAES, D.F.C. M Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti* L. e *Artemia salina* Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* **Revista Brasileira Plantas Medicinai**s, Campinas, v.18, n.1, p.19-26, 2016
- SANTOS, K. N. G.; DUTRA, K. A.; LIRA, C. S.; LIMA, B. N.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G.; MARANHÃO, C. A.; BRANDÃO, S. S. F.; NAVARRO, D. M. A. F. Effects of *Croton rhamnifolioides* Essential Oil on *Aedes aegypti* Oviposition, Larval Toxicity and Trypsin Activity. **Journal Molecules**, p. 16573-16587, 2014.
- SANTOS S. R.; SILVA, V. B.; MELO, M. A.; BARBOSA, J. D.; SANTOS, R. L.; SOUSA, D. P. et al. Toxic effects on and structure-toxicity relationships of phenylpropanoids, terpenes, and related compounds in *Aedes aegypti* larvae. **Vector Borne Zoonotic Dis.** 2010 dez; 10(10): 1049–54.
- SHAHIDI, F.; HAN, Xiao-Qing. Encapsulation of food ingredients. **Food science and nutriotion**, 33(6), p. 501-547, 1993.
- SHANMUGANATHAN,S.;SHANUMUGASUNDARAM,N;ADHIRAJAN,N.;RAMYAA,L. T.S.; BABU,M. Preparation and characterization of chitosan microspheres for doxycycline delivery. **Elsevier**,v.73,p. 201-211,2008.
- SHERER, R.;WAGNER,R.;DUARTE,M.C.T.;GODOY,H.T. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 11, n. 4, p. 442-49, 2009.
- SILVA, J. S.; SALES, M. F.; GOMES, A. P. S.; CARNEIRO-TORRES, D. S. Sinopses das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, p. 441–453, 2010.
- SILVA, P. T.; FRIES, L. L. M.; MENEZES, C. R.; HOLKEM, 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.
- SILVA,J.S.;MARIANO,Z.F.;SCOPEL,I. A dengue no Brasil e as políticas de combate ao *Aedes aegypti*: uma tentativa de erradicação às políticas de controle. **Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde** 3(6):163-175, Jun/2008.

SMITH, R. A. Effect of strain and medium variation on mosquito toxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*. **Canadian Journal Microbiology** v. 28, 1089-1092 1982.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V.; Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente** v. 7, 2006.

THIERY, I.; HAMON, S. Bacterial control of mosquito larvae: Investigation of stability of *Bacillus Thuringiensis Israelensis* and *Bacillus Sphaericus* standard powders. **Journal of the American Mosquito Control Association**, p. 472- 476, 1998.

VILLARINHOS, P. T. R.; MONNERAT, R. Larvicidal persistence of formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to control larval *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, p. 311-314, 2004.

VU, K.D., TYAGI, R.D., VALÉRO, J.R., SURAMPALLI, R.Y. Impacto of diferente pH control agents on biopesticidal activity of *Bacillus thuringiensis* during the fermetation of starch industry wastewater. **Bioprocess Biosystem Engineering**, v.32, p. 511-519, 2009.

WHO, **Mosquito control**: can it stop Zika at source? Disponível em: <<http://www.who.int/emergencies/zika-virus/articles/mosquito-control/en/>>. Acesso em: 30 jun. 2016.

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

ZARA,A.L.S.A.;SANTOS,S.M.;FERNANDES- VIEIRA E.S.; CARVALHO, R.G.; COELHO,G.E.Estratégias de controle *Aedes aegypti* : uma revisão **Epidemiologia Serviço de Saúde**, Brasília, 25(2):391-404, abr-jun 2016

ANEXO A – PROBIT BTI (I)

PROBIT mort OF n WITH conc

/LOG 10

/MODEL PROBIT

/PRINT FREQ CI

/CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).

Probit Analysis

Bti Data: 27/09/2018

Notes

Output Created		29-Out-2018 17h12min23s
Comments		
Input	Data	C:\Users\anaaraujo\Documents\SRCCV\Probit\IFPE\planilha BTI.sav
	Active Dataset	DataSet1
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	9
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics are based on all cases with valid data for all variables in the model.
Syntax		PROBIT mort OF n WITH conc /LOG 10 /MODEL PROBIT /PRINT FREQ CI /CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).
Resources	Processor Time	00h0min0s
	Elapsed Time	00h0min0s

[DataSet1] C:\Users\anaaraujo\Documents\SRCCV\Probit\IFPE\planilha BTI.sav

Warnings

Relative Median Potency Estimates are not displayed because there is no grouping variable in the model.

Data Information

		N of Cases
Valid		6
Rejected	Missing	2
	LOG Transform Cannot be Done	0
	Number of Responses > Number of Subjects	0
Control Group		1

Convergence Information

	Number of Iterations	Optimal Solution Found
PROBIT	11	Yes

Parameter Estimates

	Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a	conc	1,530	,176	8,695	,000	1,185	1,875
	Intercept	1,504	,186	8,073	,000	1,318	1,691

a. PROBIT model: $\text{PROBIT}(p) = \text{Intercept} + BX$ (Covariates X are transformed using the base 10,000 logarithm.)

Chi-Square Tests

		Chi-Square	df ^a	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	3,820	4	,431 ^b

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b. Since the significance level is greater than ,150, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Cell Counts and Residuals

	Number	conc	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Probability
PROBIT	1	0,02	60	11	8,210	2,790	,137
	2	0,05	60	18	18,811	-,811	,314
	3	0,08	60	23	25,864	-2,864	,431
	4	0,15	60	32	35,782	-3,782	,596
	5	0,25	60	44	43,210	,790	,720
	6	0,40	60	52	48,886	3,114	,815

	Probability	95% Confidence Limits for conc		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	0.01	,003	,001	,006
	0.02	,005	,002	,009
	0.03	,006	,003	,011
	0.04	,007	,003	,013
	0.05	,009	,004	,014
	0.06	,010	,005	,016
	0.07	,011	,006	,018
	0.08	,013	,006	,019
	0.09	,014	,007	,021
	0.1	,015	,008	,023
	0.15	,022	,013	,031
	0.2	,029	,019	,040
	0.25	,038	,026	,049
	0.3	,047	,034	,060
	0.35	,058	,044	,073
	0.4	,071	,055	,088
	0.45	,086	,068	,106
	0.5	,104	,084	,129
	0.55	,126	,102	,158
	0.6	,152	,123	,196
	0.65	,186	,148	,247
	0.7	,229	,180	,317
	0.75	,287	,219	,417
	0.8	,369	,273	,570
	0.85	,494	,351	,823
	0.9	,715	,479	1,312
	0.91	,782	,516	1,469
	0.92	,861	,559	1,661
	0.93	,958	,611	1,902
	0.94	1,079	,675	2,213
	0.95	1,235	,755	2,631
	0.96	1,449	,862	3,224
	0.97	1,762	1,014	4,142

	0.98	2,286	1,258	5,780
	0.99	3,446	1,764	9,783

ANEXO B – PROBIT *BTI (II)*

PROBIT mort OF n WITH conc

/LOG NONE

/MODEL PROBIT

/PRINT FREQ CI

/CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).

Probit Analysis

Bti 12/12/2018

Notes

Output Created		12-Dez-2018 14h34min4s
Comments		
Input	Active Dataset	DataSet0
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	9
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics are based on all cases with valid data for all variables in the model.
Syntax		PROBIT mort OF n WITH conc /LOG NONE /MODEL PROBIT /PRINT FREQ CI /CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).
Resources	Processor Time	00h0min0s
	Elapsed Time	00h0min0s

Warnings

Relative Median Potency Estimates are not displayed because there is no grouping variable in the model.

Data Information

		N of Cases
Valid		7
Rejected	Missing	2
	Number of Responses > Number of Subjects	0
Control Group		1

Convergence Information

	Number of Iterations	Optimal Solution Found
PROBIT	8	Yes

Parameter Estimates

Parameter		Estimate	Std. Error	Z	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a	conc	14,647	1,133	12,925	,000	12,426	16,868
	Intercept	-2,064	,180	-11,477	,000	-2,244	-1,884

a. PROBIT model: $\text{PROBIT}(p) = \text{Intercept} + BX$

Chi-Square Tests

		Chi-Square	df ^a	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	3,418	5	,636 ^b

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b. Since the significance level is greater than ,150, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Cell Counts and Residuals

	Number	conc	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Probability
PROBIT	1	,000	60	0	1,170	-1,170	,020
	2	,050	60	7	5,489	1,511	,091
	3	,080	60	11	11,167	-,167	,186
	4	,150	60	35	33,174	1,826	,553
	5	,200	60	48	48,394	-,394	,807
	6	,250	60	55	56,696	-1,696	,945
	7	,300	60	60	59,406	,594	,990

Confidence Limits

		95% Confidence Limits for conc		
	Probability	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	0.01	-,018	-,049	,005
	0.02	,001	-,027	,022
	0.03	,013	-,013	,032
	0.04	,021	-,003	,040
	0.05	,029	,005	,047
	0.06	,035	,012	,052
	0.07	,040	,019	,057
	0.08	,045	,024	,061
	0.09	,049	,029	,065
	0.1	,053	,034	,069
	0.15	,070	,053	,084
	0.2	,083	,068	,097
	0.25	,095	,080	,107
	0.3	,105	,092	,117
	0.35	,115	,102	,126
	0.4	,124	,112	,135
	0.45	,132	,121	,144
	0.5	,141	,130	,152
	0.55	,150	,138	,161
	0.6	,158	,147	,170

0.65	,167	,156	,180
0.7	,177	,165	,190
0.75	,187	,175	,202
0.8	,198	,185	,214
0.85	,212	,197	,229
0.9	,228	,213	,248
0.91	,232	,216	,253
0.92	,237	,220	,258
0.93	,242	,225	,264
0.94	,247	,229	,270
0.95	,253	,235	,277
0.96	,260	,241	,285
0.97	,269	,249	,295
0.98	,281	,260	,309
0.99	,300	,276	,331