

GISLENE LUIZA WEIMANN

**ESTUDO DE TÉCNICAS DE PRODUÇÃO DE PARTÍCULAS DE
POLI (ÁCIDO LÁCTICO) E POLI (ÁCIDO LÁCTICO-CO-GLICÓLICO) E
EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE BIOINSETICIDA MODELO**

JOINVILLE - SC

2014

GISLENE LUIZA WEIMANN

**ESTUDO DE TÉCNICAS DE PRODUÇÃO DE PARTÍCULAS DE
POLI (ÁCIDO LÁCTICO) E POLI (ÁCIDO LÁCTICO-CO-GLICÓLICO) E
EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE BIOINSETICIDA MODELO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em Engenharia de Processos na Universidade da Região de Joinville - UNIVILLE.

Orientadora: Dra. Denise Abatti Kasper Silva

JOINVILLE – SC

2014

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

W422e Weimann, Gislene Luiza
Estudo de técnicas de produção de partículas de poli (ácido láctico) e poli (ácido láctico-co-glicólico) e efeito da incorporação de bioinseticida modelo / Gislene Luiza Weimann; orientadora Dra. Denise Abatti Kasper Silva – Joinville: UNIVILLE, 2014.

78 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Engenharia dos Processos –
Universidade da Região de Joinville)

1. Biopolímeros. 2. Polímeros biodegradáveis. 3. Bioinseticida. 4. Ácido láctico
I. Silva, Denise Abatti Kasper (orient.). II. Título.

CDD 632.951

Termo de Aprovação

“Estudo de técnicas de produção de partículas de Poli(ácido láctico) e Poli(ácido láctico-co-glicólico) e efeito da incorporação de bioinseticida modelo.”

por

Gislene Luiza Weimann

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos, área de concentração Engenharia de Processos e Tecnologias Limpas e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em Engenharia de Processos.



Prof. Dra. Denise Abatti Kasper Silva
Orientadora (UNIVILLE)

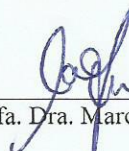


Prof. Dra. Ana Paula Testa Pezzin
Coordenadora do Programa de Mestrado em Engenharia de Processos (UNIVILLE)

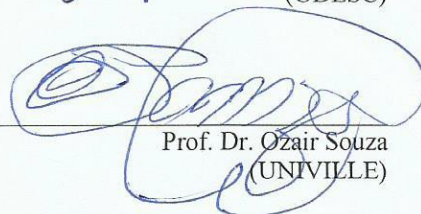
Banca Examinadora:



Prof. Dra. Denise Abatti Kasper Silva
Orientadora (UNIVILLE)



Prof. Dra. Marcia Margarete Meier
(UDESC)



Prof. Dr. Ozair Souza
(UNIVILLE)

Joinville, 26 de junho de 2014.

“Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes”.
Isaac Newton

DEDICATÓRIA

*Ao meu falecido pai, **Afonso Weimann.**
À minha mãe, **Waltrudes Murara Weimann.**
Aos meus tios, **Marilda e Dirceu Scholz.**
Ao meu amor, **Guilherme Vieira.***

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre me guiando, e pela graça recebida de encerrar mais uma etapa na minha vida, renovando os meus caminhos para um novo amanhecer.

Agradeço sinceramente a Prof.^a Dra. Denise Abatti Kasper Silva, orientadora no seu verdadeiro significado, pela paciência e amizade, pela orientação e ensinamentos e por acreditar em mim. Será sempre lembrada!

Sou eternamente grata a minha mãe, primeiramente, porque me proporcionou a educação e a formação que me tornaram a mulher que sou e em segundo lugar, pelo apoio e incentivo para a conclusão deste trabalho. Essa vitória é nossa! Agradeço ao meu pai (*in memoriam*) que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos e sempre vivo ao meu coração.

Aos meus tios, Marilda e Dirceu, pelos seus apoios, carinho, compreensão e paciência.

Agradeço especialmente ao meu namorado Guilherme, por seu sorriso de cada dia, que me dá força para seguir o caminho até o fim.

A bolsista Priscila Thaize Santos pela dedicação, responsabilidade e o valioso auxílio no laboratório. As técnicas, Cláudia Hack e Michele Formolo, pelos inúmeros socorros e análises.

À Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, ao corpo docente do Mestrado em Engenharia de Processos, pelo conhecimento e amizade adquiridos durante o curso e a CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

À Universidade Estadual de Santa Catarina – UDESC, em especial ao Laboratório de Microscopia Eletrônica, pelas análises fundamentais a realização deste trabalho.

A toda a minha família e amigos queridos que estão sempre presentes e me contagiam com sua alegria.

À Belinha, Juju, Fred, Lola, Clarinha, Nina e Juca, por me amarem exatamente do jeito que sou e revigorarem as minhas energias em certos momentos.

A todas as pessoas que de uma forma direta ou indireta contribuíram para realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

Aos membros da banca, por aceitarem avaliar este trabalho e me ajudarem a corrigir possíveis enganos.

RESUMO

Dia a dia os aspectos ambientais relacionados a produtos e processos são mais exigidos. A aplicação de biopolímeros degradáveis como matriz para proteger e estabilizar agentes ativos neles incorporados está presentes na literatura e no mercado, especialmente no setor de agrotóxicos, pois permite manter o caráter tóxico do bioinseticida em infectar o organismo-alvo, protegendo-o do meio ambiente. Neste trabalho, avaliou-se os efeitos da aplicação de frequência sônica e do ultrassom na produção de partículas de poli (L-ácido láctico) (PLLA) e poli(ácido láctico-co-glicólico)(PLGA 75-25) sobre a incorporação de bioinseticida bacteriano, *Bacillus thuringiensis* subespécie *israelensis* (*Bti*) e algumas características do material produzido. Três técnicas de preparação de partículas foram testadas: (A) com agitação magnética; (B) agitação magnética combinada com frequência sônica e (C) agitação magnética com frequência sônica e banho de gelo. Em todas as três metodologias, a proporção de PLLA/PLGA variou de 100/0 até 50/50. As partículas com e sem *Bti* foram caracterizadas a partir das análises de estabilidade térmica por ATG, morfologia por MEV e o efeito da composição das amostras sobre a densidade. Para as partículas com *Bti*, além das caracterizações, foi determinada a atividade biológica do *Bti* incorporado nas partículas e sobrenadante pelo método de contagem do número de unidade formadora de colônias. O maior rendimento, em massa de partículas, foi pelo método A. As morfologias das partículas variaram de acordo principalmente entre os métodos de obtenção e as formar irregulares sugere a necessidade de melhorar o equilíbrio da formulação. Todas as partículas, independente do método de obtenção apresentaram estabilidade térmica acima de 250 °C e densidade inferior a 0,5 g/L. Além disso, as amostras obtidas com *Bti*, pelo método A, mantiveram o maior rendimento dentre as demais, porém parte do *Bti* permaneceu no sobrenadante. Os rendimentos das amostras obtidas pelo Método A foram de 85 %, no método B foram de 20 % e pelo método C foi 10 %, contudo houve melhor incorporação do *Bti*. O conjunto de resultados sugere que a aplicação de ondas sônicas favoreceu a incorporação do bioinseticida, reduziu em aproximadamente 20 °C a estabilidade térmica, e a densidade das partículas geradas.

Palavras chaves: polímeros biodegradáveis; encapsulamento; inseticida bacteriológico; estabilidade térmica; morfologia; densidade.

ABSTRACT

Every day the environmental aspects related to products and processes are more required. The biodegradable biopolymers application as a matrix to protect and stabilize active agents incorporated therein is present in the literature and in the market, especially in the pesticides section, it allows to keep the biopesticide toxicity character in infecting the target organism, protecting it from the environment. In this work the effects of the sonic frequency and ultrasound application in the production of poly particles (L-lactic acid) (PLLA) and poly (co-glycolic acid) (PLGA 75-25) under the incorporation of a bacterial biopesticide, *Bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis* (Bti) and a few characteristics of the produced material were assessed. Three particles preparation technics were tested: (A) magnetic agitation; (B) magnetic agitation combined with sonic frequency and (C) magnetic agitation with sonic frequency and ice bath. In all the three methodologies the PLLA/PLGA proportion varied from 100/0 to 50/50. The particles with Bti and without Bti were characterized by thermic stability analysis by ATG, morphologic by MEV and the effect of the samples under the density. For particles with Bti, besides the characterization it was determined the Bti biological activity incorporated in the supernatant and in the particles by the method of the colony formation unit number counting. The biggest particle mass yield was determined by the Method A. The particle morphology varied specially according to the obtainment and irregular forms methods which suggest the need to improve the formulation balance. All the particles, irrespective of the obtained method presented thermic stability above 250 °C and density below 0,5 g/L. Besides, the samples obtained with Bti by the method A maintained a biggest yield among the other, however part of the Bti remained in the supernatant. The sample yield obtained by method A was 85 %, in method B was 20 % and in method C was 10 %, although there was a better Bti incorporation. The set of results suggest that the application of sonic waves favored the biopesticide incorporation, reduced thermic stability nearly 20 °C and the generated particles density.

Key words: biodegradable polymers; encapsulation; bacteriological insecticide; thermic stability; morphology; density.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Diferentes morfologias de micropartículas obtidas por encapsulação: (a) microcápsula, (b) microesfera, (c) microcápsula multicamadas, (d) microesferas multicamada e multinuclear.	6
Figura 2. Representação esquemática das micropartículas.	7
Figura 3. Colônia de <i>Bacillus thuringiensis</i>	9
Figura 4. Micrografia eletrônica de transmissão do <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt) (2 μm) em fase de.....	10
Figura 5. Modo de ação da <i>Bacillus thuringiensis</i> em Lepidoptera: (1) Ingestão da bactéria; (2)	11
Figura 6. Estrutura química do a) L-ácido láctico e b) D- ácido láctico.	14
Figura 7. Representação esquemática do método coacervação: A – Deposição das partículas sólidas ou líquidas; B – Introdução da fase de separação; C – Deposição das migrogotas na superfície; D – Formação da membrana de revestimento.....	18
Figura 8. Diferentes tipos de emulsão	19
Figura 9. Curva de ATG (linha cheia) e primeira derivada (linha tracejada) para o poli(acetado de vinila), medida feita sob nitrogênio e com taxa de aquecimento de 20 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$	24
Figura 10. Etapas da metodologia	27
Figura 11. Diâmetro e altura interna da tampa do cadinho do ATG.	35
Figura 12. Percentual de rendimento de cada amostra, (a) método A; (b) método B e (c) Método C.....	38
Figura 13. Curvas de ATG do polímero (PLLA) e co-polímero (PLGA).....	39
Figura 14. Curvas termogravimétricas das partículas dos métodos, (a) Método A; (b) método B e (c).....	41
Figura 15. Caracterização morfológica das partículas com ampliação de 500 x, (a) método A; (b) método B e (c) método C.	44
Figura 16. Densidade aparente das partículas e seus respectivos desvios-padrões.	46
Figura 17. Percentual de rendimento de cada amostra, com <i>Bti</i> , (a) método A; (b) método B e (c) método C.....	48
Figura 18. Plaqueamento do agente encapsulado; (a) <i>Bti</i> pelo método A; (b) <i>Bti</i> pelo método B;.....	49
Figura 19. Relação do plaqueamento das partículas, (a) método A; (b) método B; (c) método C.	51
Figura 20. Relação do plaqueamento dos sobrenadantes, (a) método A; (b) método B; (c) método C.....	52
Figura 21. Curvas termogravimétricas das partículas dos métodos com <i>Bti</i> , (a) método A; (b) método B e (c) método C.	54
Figura 22. Caracterização morfológica das partículas contendo bioinseticida com ampliação de 500 X, (a) método A; (b) método B e (c) método C.	56
Figura 23. Densidade das partículas com <i>Bti</i> e seus respectivos desvios-padrões.	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Materiais Encapsulantes.....	13
Tabela 2. Propriedades dos polímeros e copolímeros derivados do ácido láctico e ácido glicólico.....	15
Tabela 3. Métodos de produção de partículas.....	16
Tabela 4. Planejamento experimental das amostras do método A.....	29
Tabela 5. Planejamento experimental das amostras do Método B.....	30
Tabela 6. Planejamento experimental das amostras do Método C.....	32
Tabela 7. Resultado global dos métodos contendo bioinseticida.....	33
Tabela 8. Resultado global dos métodos contendo <i>Bti</i>	59

LISTA DE QUADRO

Quadro 1. Resultados obtidos por alguns autores que estudaram encapsulamento de agrotóxicos	20
---------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Análise termogravimétrica – ATG
Bacillus thuringiensis – *Bt*
Bacillus thuringiensis israelensis - *Bti*
Cristais proteicos – *Cry*
Emulsão água em óleo – A/O
Emulsão água-óleo-água – A/O/A
Emulsão óleo em água – O/A
Emulsão óleo-água-óleo – O/A/O
Luria-Bertani – LB + Ágar
Massa por volume – m/v
Microscopia eletrônica de varredura – MEV
Poli(ácido glicólico) – PGA
Poli(ácido láctico) – PLLA
Poli(ácido láctico-co-glicólico) – PLGA
Poliacetato de vinila – PVA
Temperatura de fusão – T_m
Temperatura de início de degradação extrapolada – Tonset
Temperatura máxima de degradação – $T_{máx}$
Transição vítrea – T_g
Unidades formadoras de colônia – UFC

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	3
1. OBJETIVOS	5
1.1. Objetivo geral	5
1.2. Objetivos específicos.....	5
2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA	6
2.1. Encapsulação	6
2.1.1. Agentes encapsulados	8
2.1.2. Bioinseticida	8
2.1.2.1. Caracterização do <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt)	9
2.1.3. <i>Bacillus thuringiensis</i> subspécie <i>israelensis</i> (<i>Bti</i>)	11
2.2. Agentes encapsulantes	12
2.2.1. Poli (ácido láctico) (PLLA)	14
2.2.2. Poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA)	15
2.3. Métodos de encapsulação	16
2.3.1. Emulsificação seguida da evaporação do solvente	17
2.4. Caracterização de materiais	22
2.4.1. Análise térmica	23
2.4.2. Análise morfológica	24
2.4.3. Determinação de densidade do material	25
3. METODOLOGIA	26
3.1. Materiais	26
3.2. Métodos.....	26
3.3. Obtenção das partículas	27
3.3.1. Método A	27
3.3.2. Método B	29
3.3.3. Método C	31
3.4. Determinação da atividade do <i>Bti</i>	33
3.4.1. <i>Bti</i> puro	33
3.4.2. Partículas e sobrenadante	34
3.5. Análises térmicas.....	34
3.6. Análises físicas	34
3.6.1. Caracterização morfológica das partículas	35
3.6.2. Densidade aparente das partículas	35
3.7. Análise de variância (ANOVA) sobre as médias aritméticas e os desvios-padrões das densidades aparentes das amostras	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1. Determinação da técnica de produção de partículas	37
4.2. Caracterização das partículas de acordo com os métodos de produção e composição da matriz polimérica.....	37
4.3. Caracterização das partículas com modelo de bioinseticida para incorporação dos métodos de produção e composição da matriz polimérica	47
CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
APÊNDICE 01 – Identificação da amostra conforme a composição e método.	71
APÊNDICE 02 – Dados da análise de ATG do polímero (PLLA) e co-polímero (PLGA).72	

APÊNDICE 03 – Dados da análise de ATG das partículas sem <i>Bti</i>	73
APÊNDICE 04 – Dados da análise de ATG das partículas com <i>Bti</i>	74
ANEXO 01 – Preparação do meio LB + Agar	75

INTRODUÇÃO

Com o aumento do desequilíbrio ambiental, o alto índice de matéria orgânica despejada em riachos com correnteza e elevado nível de nutrientes, contribuem para o crescimento excessivo da população de borrachudos da espécie *Simulidium pertinax*. Dentre as formas de controle biológico dessa população está a utilização de um bioinseticida a base de *Bacillus thuringiensis* subespécie *israelensis* (*Bti*), em virtude de essa bactéria possuir cristais formados na esporulação, os quais são responsáveis pela paralisia do intestino da larva do *Simulidium*, matando assim, a praga-alvo.

Entretanto, o *Bti*, embora eficaz, apresenta fotosensibilidade, o que pode diminuir seu tempo de atuação em campo. Dentre as estratégias para reduzir essa fotosensibilidade está à preparação de formulações tais como sólido granular, emulsão e microencapsulação.

A escolha do método de microencapsulação mais adequado depende do tipo do material ativo, da aplicação e do mecanismo de liberação desejado para a sua ação. A diferença básica entre os métodos existentes está no tipo de envolvimento ou aprisionamento do material ativo pelo agente encapsulante, visto que a combinação entre o material e o agente ativo pode ser de natureza física (*spray drying*, leiteo fluidizado), química (polimerização) ou físico-química (coacervação, emulsificação) (SUAVE *et al.*, 2006). A aplicação de técnicas de encapsulamento são frequentes na área farmacêutica (ALSINA *et al.*, 2009) sendo também aplicada para herbicidas (BEACH *et al.*, 2006) e pesticidas (PAULA *et al.*, 2010). Isto porque essas formulações apresentam aspectos positivos para sua aplicação, como: o tamanho das microesferas e o princípio ativo liberado em uma taxa controlável ao meio aplicado. Entretanto, as formulações sólidas contendo o agente ativo, *Bti*, não são prontamente encontradas, por isso a relevância deste trabalho.

As formulações sólidas apresentam vantagens, como o fácil manuseio e a aplicação. As formulações devem atender os seguintes critérios: devem ter a liberação do bioinseticida por degradação, evaporação ou dissolução de forma minimizada em relação às outras técnicas, apresentar baixa toxicidade em corpo hídrico, ser hidrolisável de forma a permitir a modulação na liberação do agente ativo e ter flotabilidade (BAJPAI *et al.*, 2002).

Polímeros biodegradáveis, tais como poli (ácido láctico) (PLLA) e o poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), são poliésteres relativamente hidrofóbicos, instáveis em condições úmidas e podem ter uma cinética de degradação modificada pela concentração relativa entre os polímeros utilizados. Esses polímeros degradam *in vivo* tanto enzimaticamente, quanto por reações de hidrólise, com formação de produtos não tóxicos reabsorvíveis (LI *et al.*, 2005). Esses polímeros apresentam baixa toxicidade (os subprodutos da decomposição são ácido láctico, ácido glicólico, dióxido de carbono e água), e são usuais em trabalhos de sistema de liberação de agentes ativos como fármacos, entre outros (ERBETTA *et al.*, 2011).

O processo de microencapsulação com o PLLA e PLGA, em estudo, oferecem vantagens na estabilidade, modulação, degradação e boa eficiência na encapsulação (RAJEEV *et al.*, 2009).

Nesse contexto, o interesse principal deste trabalho foi estudar os efeitos da aplicação de frequência sônica (ultrassom) na produção de partículas de Poli (ácido láctico) e Poli (ácido láctico-co-glicólico) sobre a incorporação de um bioinseticida modelo nas composições.

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo geral

Avaliar a influência da aplicação de alta energia na produção de partículas em matriz polimérica biodegradável (PLLA e blendas de PLLA/PLGA) e avaliar a influência a incorporação da bactéria *Bacillus thuringiensis* subespécie *israelensis* (*Bti*) sobre as características térmicas, morfológicas e físicas dessas formulações.

1.2. Objetivos específicos

- Produzir partículas com diferentes proporções dos polímeros, PLLA e PLGA, na matriz empregando como fonte de energia a agitação magnética e o ultrassom;
- caracterizar as formulações quanto às suas propriedades térmicas morfológicas e físicas;
- avaliar como modelo de bioproduto a capacidade de incorporação do bioinseticida bacteriano *Bti* nas diferentes partículas obtidas;
- verificar os efeitos da incorporação do *Bti* nas formulações sobre as propriedades térmicas, morfológicas e físicas das partículas produzidas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Encapsulação

Encapsulação pode ser definida como um processo de empacotamento de materiais sólidos, líquidos ou gasosos em partículas extremamente pequenas, as quais podem liberar o conteúdo de forma controlada e sob condições específicas (FÁVARO-TRINDADE *et al.*, 2008).

O tamanho das partículas pode variar de poucos nanômetros até vários micrômetros e a forma também é bastante variável em função do método e do agente encapsulante utilizado para prepará-las (FÁVARO-TRINDADE *et al.*, 2008). Podendo ser classificadas por tamanho em 3 categorias: macro- ($> 5.000 \mu\text{m}$), micro- ($0,2 - 5.000 \mu\text{m}$) e nanocápsulas ($<0,2 \mu\text{m}$) (BAKER, 1986). Fisicamente, caracterizam-se pela forma esférica e aspecto sólido. As micropartículas servem para transportar vários compostos bioativos, tais como fármacos, vitaminas, peptídeos, aromatizantes, corantes, óleos essenciais, nutrientes e pesticidas (BANSODE *et al.*, 2010). Na estrutura interna e morfologia, as micropartículas podem ser divididas em dois tipos específicos: as microcápsulas e as microesferas (Figura 1) (SILVA *et al.*, 2003).

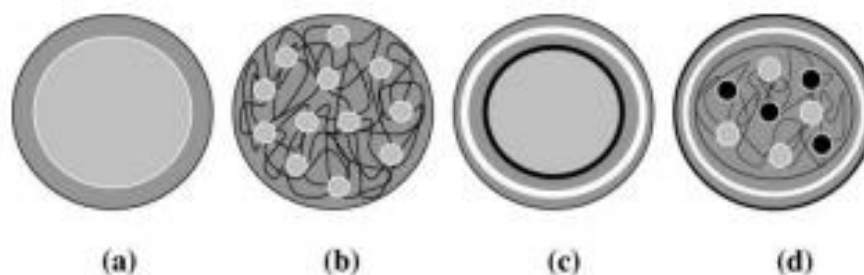


Figura 1. Diferentes morfologias de micropartículas obtidas por encapsulação: (a) microcápsula, (b) microesfera, (c) microcápsula multicamadas, (d) microesferas multicamada e multinuclear.

Fonte: NESTERENKO *et al.*, 2013.

Conforme Figura 2, o sistema do tipo reservatório apresenta uma estrutura muito elementar: o núcleo, ou núcleos, é bem definido e envolto por um filme polimérico. Por outro lado, as microesferas são sistemas que apresentam uma estrutura do tipo matricial. Neste tipo de partícula não é possível diferenciar o núcleo (sistema monolítico) e as cápsulas, e a substância a encapsular pode estar adsorvida à superfície da partícula ou encapsulada no seu interior (SILVA *et al.*, 2003).



Figura 2. Representação esquemática das micropartículas.

Fonte: SILVA *et al.*, 2003.

A encapsulação encontra também aplicações no setor de agrotóxicos, visando tornar a eficácia dos pesticidas adequada para o controle de pragas no campo, pragas tais como: insetos, ácaros, roedores, nematóides e plantas daninhas. A encapsulação obtida nesta área é a combinação do agente pesticida com o agente encapsulante, que o protege e liberta de acordo com a necessidade de controlar a peste. Os pesticidas a serem encapsulados incluem uma vasta gama, podendo ser substâncias inorgânicas, substâncias orgânicas de baixo peso molecular e substâncias de elevado peso molecular, tais como: peptídeos, proteínas e microbianos (micropesticidas) (GOERTZ, 2000).

A microencapsulação dos agro-químicos apresenta vantagens em relação às formulações convencionais, pois transmite uma maior segurança para o meio ambiente, trabalhadores e consumidores por minimizar o tempo de exposição do usuário durante o seu manuseio bem como evitar o escoamento das substâncias para fonte de água (GOERTZ, 2000; TSUJI, 2001; BAJPAI *et al.*, 2002).

Um dos passos importantes para realizar o processo de encapsulação é a escolha adequada do encapsulante e a definição do método de microencapsulação que

produza microesferas com menor custo (SHAHIDI *et al.*, 1993).

2.1.1. Agentes encapsulados

As partículas podem possuir núcleo, no qual se encontram os compostos ativos. O material a ser encapsulado (núcleo) pode ser chamado de material de recheio ou fase interna (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007).

O núcleo interno pode apresentar-se tanto no estado líquido, sólido ou gasoso. Logo, pode ser constituído por uma mistura de diversos agentes, como: estabilizantes, diluentes, agentes moduladores da liberação (VENKATESAN *et al.*, 2009).

2.1.2. Bioinseticida

A comercialização de bioinseticidas corresponde a cerca de 5% do mercado mundial de pesticidas. Porém, o uso destes produtos vem crescendo dez vezes mais do que o uso de inseticidas químicos (BRAR *et al.*, 2006). As bactérias destacam-se como promissoras no controle biológico sendo que, entre esses microrganismos, o *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) é o mais utilizado. Estima-se que os produtos à base dessa bactéria correspondam a cerca de 90% do mercado mundial de bioinseticidas (VILAS-BÔAS *et al.*, 2007) (ANGELO *et al.*, 2010).

Entre as vantagens dos bioinseticidas destacam-se: alta especificidade, menor risco ambiental e à saúde humana, menor frequência de resistência nos insetos alvo e a possibilidade do entomopatógeno se multiplicar no ambiente e, com isso, aumentar sua permanência. Como desvantagem principal destaca-se maior suscetibilidade às condições ambientais, o que pode ser atenuado com o uso de boas formulações e estudos para aplicação dos produtos, a fim de torná-los mais resistentes às condições ambientais e com maior tempo de prateleira (ANGELO *et al.*, 2010).

Eles são quimicamente e biologicamente ativos que podem alterar a formulação física e matar as espécies-alvo, sem prejudicar outros insetos (ou seja, aumentar a sua seletividade e reduzir a dose efetiva bioinseticida necessário) (BRAR *et al*, 2006).

2.1.2.1. Caracterização do *Bacillus thuringiensis* (Bt)

Pertencente à família *Bacillaceae*, a qual engloba a maioria das espécies formadoras de esporos, *B. thuringiensis* sendo um bastonete Gram-positivo, com célula vegetativa de 1,0 a 1,2 μm de largura por 3,0 a 5,0 μm de comprimento, geralmente móveis, conforme a Figura 3. O esporo dessa bactéria possui formato elipsoidal e localiza-se na região central ou paracentral quando no interior da célula-mãe, Figura 4. A espécie é aeróbia não estrita com faixa de temperatura de crescimento entre 10 e 45 $^{\circ}\text{C}$. A principal característica que distingue a espécie das outras do mesmo gênero é a presença intracelular de um cristal protéico, cuja produção foi descoberta somente em 1953 por Hannay (ANGELO *et al.*, 2010).

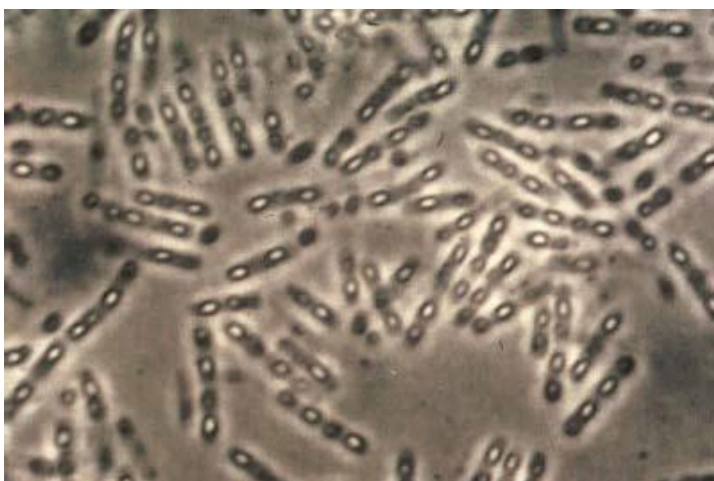


Figura 3. Colônia de *Bacillus thuringiensis*
Fonte: Adaptado de SILVA, 2007.

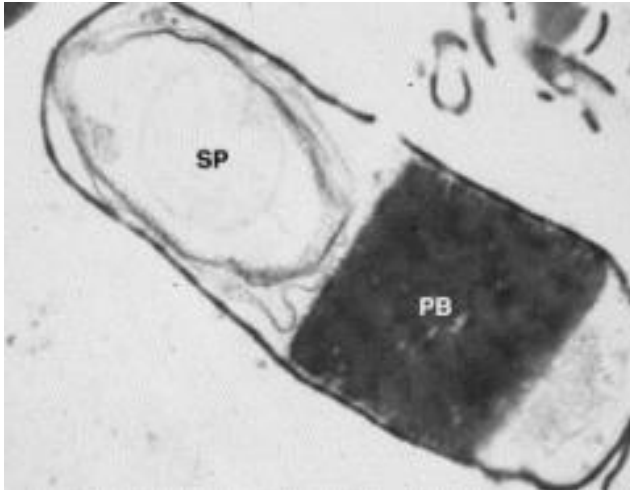


Figura 4. Micrografia eletrônica de transmissão do *Bacillus thuringiensis* (Bt) (2 μ m) em fase de esporulação SP – esporo; PB (Corpo proteico; δ -endotoxinas)

Fonte: MAAGD *et al.*, 2001.

A produção de cristais protéicos representa uma característica típica de *B. thuringiensis* e, em geral, ocorre durante a esporulação. Estes cristais apresentam atividade entomopatogênica para várias espécies de insetos, destacando-se as Ordens dos lepidópteros, dípteros e coleópteros (BRAR *et al.*, 2006; ANGELO *et al.*, 2010).

Os cristais de *B. thuringiensis* são formados principalmente por proteínas denominadas Cristal (*Cry*), antigamente conhecidas como δ -endotoxinas. Ao final da esporulação, o cristal protéico corresponde a cerca de 20% a 30% do peso seco da célula, sendo liberado no momento da lise celular (ANGELO *et al.* 2010).

As proteínas *Cry* são consideradas como os principais constituintes dos cristais que caracterizam *B. thuringiensis*, são codificadas por genes que geralmente se localizam em plasmídios e, com menor frequência, no cromossomo bacteriano. Atualmente estão descritas 436 proteínas *Cry*, sendo que a cada ano novas proteínas são descobertas. Somente no ano de 2008 foram descritas 42 novas proteínas, de acordo com a definição mais aceita, uma proteína é considerada *Cry*, quando forma uma inclusão paraesporal (cristal) em *B. thuringiensis*, exibe algum grau de toxicidade a insetos alvos, ou apresente sequência de aminoácidos similar a uma proteína *Cry* já descrita (ANGELO *et al.*, 2010).

As proteínas *Cry* são sintetizadas na forma de protoxinas, assim, sua ação depende de processos de ativação, que ocorrem no interior do aparelho digestor do inseto, conforme a Figura 5. Atualmente, há dois modelos, baseados em dados

experimentais, que explicam o modo de ação das toxinas *Cry*. As primeiras etapas desses dois modelos são idênticas: após a ingestão dos cristais, esses são solubilizados no intestino do inseto, local com pH alcalino, liberando as protoxinas que são clivadas por proteases do próprio inseto, resultando em toxinas ativas, com cerca de 60 a 70% do tamanho da protoxina. A toxina ativa é capaz de ligar-se a receptores específicos presentes nas microvilosidades das células intestinais do inseto (ANGELO *et al.*, 2010).

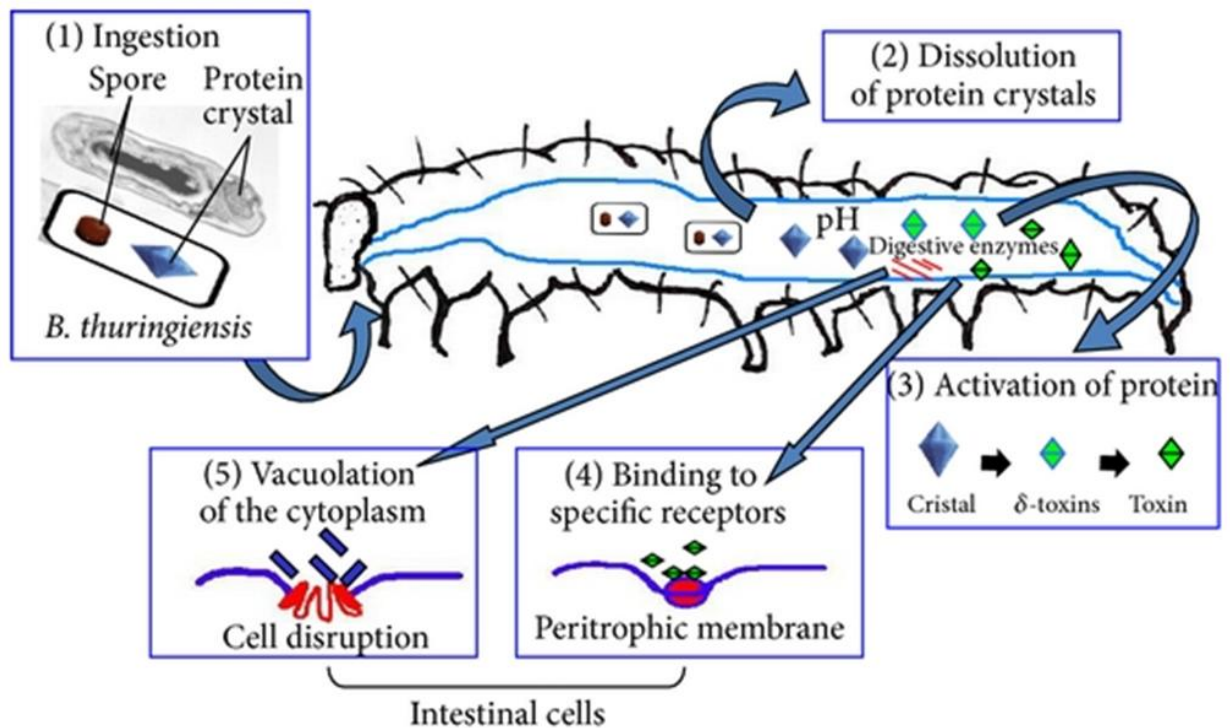


Figura 5. Modo de ação da *Bacillus thuringiensis* em Lepidoptera: (1) Ingestão da bactéria; (2) Solubilização dos cristais; (3) Ativação da proteína; (4) Ligação das proteínas com as toxinas; (5) Formação da membrana dos poros e morte celular

Fonte: FIUZA *et al.*, 2012.

2.1.3. *Bacillus thuringiensis* subspécie *israelensis* (*Bti*)

No início da década de 1970, a bactéria entomopatogênica *B. thuringiensis* era usada exclusivamente no controle de insetos-praga na agricultura. Posteriormente, a descoberta em Israel de um isolado patogênico a dípteros, denominado de *B. thuringiensis* var. *israelensis* (DE BARJAC, 1978; BECKER, 2000), iniciou o uso dessa

bactéria no controle de vetores de doenças de importância mundial, pertencentes aos gêneros *Culex*, *Aedes*, *Anopheles* e *Simulium* (ROSSI, 2007).

B. thuringiensis pode multiplicar-se em ambientes favoráveis como, por exemplo, insetos-alvo e solos ricos em nutrientes (ARONSON e SHAI, 2001). As bactérias do gênero *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) tem sido utilizadas como princípio ativo de bioinseticida por sua patogenicidade e especificidade sobre larvas de *Simulium pertinax* (borrachudos) (SANTOS *et al.*, 2010).

Em decorrência de pesquisas sobre novas linhagens de bioinseticidas a base de *Bt*, descobriu-se o *Bti*, que consiste em um micro-organismo inoculo para Lepidopteros, mas altamente tóxico para Dípteros (SILVA, 2007). Segundo Melo *et al.* (2000), revelaram que essa bactéria esporulada apresentou atividade tóxica contra *Anopheles sergentii* Theobald, *Uranotaenia unguiculata* Edwards, *Culex univitattus* Theobald, *Aedes aegypti* Linnaeus e *Culex pipiens* Linnaeus.

No Brasil, as primeiras experiências com agentes biológicos resumiram-se em avaliar sua eficiência no controle de simúlideos. Em 1986, devido aos resultados promissores, iniciou-se a substituição dos organofosforados por produtos a base de *Bti*. O estado do Rio Grande do Sul foi o pioneiro no uso deste bioinseticida. Desde então, tornou-se a única alternativa no controle de simúlideos. Uma questão limitante é que embora eficaz, o inseticida bacteriano industrializado possui um “tempo de prateleira” menor que um inseticida não bacteriano dificultando sua comercialização (SILVA, 2007).

2.2. Agentes encapsulantes

Um dos principais fatores que influenciam a estabilidade de compostos encapsulados é a natureza do material encapsulante (ROSENBERG *et al.*, 1990). A escolha do material a ser utilizado deve levar em consideração uma série de fatores, como: propriedades físicas e químicas do núcleo (porosidade, solubilidade etc.) e da parede (viscosidade, propriedades mecânicas, transição vítrea, capacidade de formação de filme etc.), compatibilidade do núcleo com a parede, mecanismo de controle e fatores econômicos (BRAZEL, 1999). Conforme a Tabela 1 segue alguns materiais encapsulantes muito utilizados.

Tabela 1. Materiais Encapsulantes

Material	Exemplos
Carboidratos	Amido, dextrinas, açúcar, xarope de milho, celulose.
Gomas	Goma arábica, alginato de sódio, carragena.
Lipídeos	Cera, parafina, triestearina, ácido esteárico, monoglicerídeos e diglicerídeos, óleos e gorduras hidrogenadas.
Poliésteres naturais	Poli(hidroxicanoatos), tais como poli(3-hidroxibutirato) P(3HB), poli(3-hidroxivalerato) P(3HV) e seus copolímeros.
Polímeros sintéticos	Poli(D,L-ácido láctico) (PDLA), poliacrilatos, copolímeros de polietileno-co-propileno, poli(ε-caprolactona) (PCL).
Polímeros biodegradáveis	Poli(ácido láctico) (PLLA), Poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA).
Proteínas	Glúten, caseína, gelatina, albumina.
Quitosana	Fonte alternativa extraída da casca de crustáceos,

Fonte: Adaptado SUAVE *et al.*, 2006.

As principais aplicações dos polímeros degradáveis estão centradas em duas grandes áreas: médica e ambiental. Dentre as aplicações médicas mais importantes têm-se: liberação controlada de fármacos (BUZZI, 2009), reconstrução de ligamentos e regeneração de órgãos. Na área agrícola, as pesquisas sobre as aplicações de polímeros biodegradáveis estão voltadas principalmente para embalagens, liberação controlada de pesticidas ou inseticidas (WEIMANN *et al.*, 2010) e filmes protetores de mudas (FRANCHETTI *et al.*, 2006).

A liberação imediata de ativos pelas formulações comercializadas levou ao desenvolvimento de formulações de liberação controlada dos herbicidas, de forma a favorecer sua eficiência e diminuir seu potencial de contaminação. Uma importante tecnologia nesse contexto é a utilização de sistemas nanoestruturados a partir de polímeros biodegradáveis (SOUZA *et al.*, 2012).

Dentre os poliésteres alifáticos, os homo e copolímeros de lactato e glicolato (PLA, PGA, PLGA, PLLA), poli-ε-caprolactona (PCL) e os poli-hidroxicanoatos (PHA)

podem ser usados no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados para encapsulação e liberação controlada de compostos bioativos (DURÁN *et al.*, 2006).

2.2.1. Poli (ácido láctico) (PLLA)

O poli (L ácido láctico) (PLA) é um polímero da família dos éster alifáticos e é biodegradável, pois possui cadeias carbônicas hidrolisáveis (FRANCHETTI *et al.*, 2006).

O PLA pode ser obtido na forma semicristalina utilizando como monômero de partida o ácido láctico, ou ácido 2-hidroxi propanóico (MOTTA, 2002). Devido à quiralidade do carbono α do ácido láctico, é possível a síntese química de compostos enantioméricos, levógero (L-) e destrógero (D-) rotatórios, mostrados na Figura 6 (BARBANTI *et al.*, 2005).

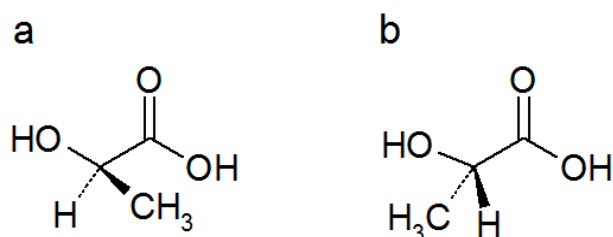


Figura 6. Estrutura química do a) L-ácido láctico e b) D- ácido láctico.

Fonte: GUPTA *et al.*, 2007.

O homopolímero PLLA é um polímero semicristalino com uma região de temperatura de transição vítrea (T_g) e temperatura de fusão (T_m) nas faixas dos 55 °C e 175 °C, respectivamente. O PLLA amorfo tem uma massa específica de 1,248 g/cm³ enquanto o cristalino tem densidade de 1,290 g/cm³. O PLLA é solúvel na maioria dos solventes orgânicos como o tetrahidrofurano, solventes clorados, benzeno, acetonitrila e dioxano (GARLOTTA, 2001).

Com o objetivo de melhorar as propriedades físico-químicas e biológicas do PLLA, um dos métodos mais utilizados é a produção de blendas com diferentes polímeros (degradáveis ou não) (RASAL *et al.*, 2010). Pode-se definir uma blenda

polimérica como sendo uma mistura física ou mecânica de dois ou mais homopolímeros ou copolímeros com diferentes estruturas químicas (AJJI *et al.*, 1996).

2.2.2. Poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA)

Poli (ácido glicólico) (PGA), poli (ácido láctico) e seu copolímeros, poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) são da família poliéster alifático linear e é um biomaterial largamente utilizado para varias aplicações médicas (BULTE *et al.*, 2001; GAO *et al.*, 2004).

O poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) é relativamente hidrofóbico, instável na presença de umidade e biodegradável a subprodutos atóxicos (ácido láctico, ácido glicólico, dióxido de carbono e água), produzidos a partir de recursos renováveis (MOTTA, 2006). Além da biodegradabilidade, os copolímeros de PLGA apresentam resistência e flexibilidade. A degradação destes polímeros ocorre por hidrólise randômica (não enzimática), o que resulta em decréscimo da massa molecular, seguindo da redução das propriedades mecânicas, da fragmentação e perda de massa até que o polímero seja totalmente degradado (NETZ, 2004).

A temperatura de transição vítrea (T_g) dos diferentes PLA e PLGA se encontra acima de 36 °C, conforme a Tabela 2, e nessas condições apresentam na forma cristalina. Desse modo, a cadeia se apresenta como uma estrutura relativamente rígida, proporcionando uma força mecânica significativa e permitindo que sejam formulados como sistemas de liberação de princípios ativos. Essa característica é um fato determinando da velocidade de degradação dos polímeros já que está relacionada ao grau de cristalinidade e à organização das cadeias poliméricas. Portanto, o polímero que apresenta maior T_g , geralmente se degrada mais lentamente (JAIN *et al.*, 1998).

Tabela 2. Propriedades dos polímeros e copolímeros derivados do ácido láctico e ácido glicólico *in vivo*.

Polímero ou copolímero	Temperatura de transição vítrea (°C)	Temperatura de fusão (°C)	Tempo de degradação aproximado (meses)
PLGA 50:50	45 – 50	Amorfo	2

PLGA 75:25	60	Amorfo	2 – 4
PLGA 85:15	45	Amorfo	5
D,L – PLLA	57 – 59	Amorfo	12 – 16
L – PLLA	60 – 67	172 – 174	18 – 24
PGA	36	230	2 – 4

* O tempo de degradação pode variar de acordo com a área de superfície, porosidade e massa molecular do sistema.

Fonte: LEWIS, 1990.

A taxa de degradação do PLGA varia conforme a proporção dos ácidos láctico e glicólico na matriz polimérica e a massa molecular do polímero. A utilização do PLGA tem sido extensivamente investigada como biomaterial para liberação controlada de fármacos e para suporte na engenharia de tecidos, já que este polímero apresenta taxas de degradação controláveis e excelente biocompatibilidade (NAIR e LAURENCIN, 2007).

2.3. Métodos de encapsulação

Segundo Bansode *et al.* (2010), a seleção do método de microencapsulação depende de alguns aspectos, tais como:

- Propriedades físico-químicas, tanto do material a encapsular como do agente encapsulante;
- aplicação ou finalidade da partícula;
- tamanho, textura e forma da partícula;
- mecanismo de libertação do material a ser encapsulado.

Vários métodos podem ser utilizados para encapsulação, entre os quais se destacam os seguintes, conforme a Tabela 3:

Tabela 3. Métodos de produção de partículas

Processos	Método de Encapsulação	Natureza do material do núcleo	Tamanho da partícula (µm)
Processo químico	Polimerização	Líquido / Sólido	1 – 500
Processo Físico			

		Spray drying	Líquido / Sólido	600
		Leito fluidizado	Sólido	> 100
Processo	Físico- Químico	Separação de fases	Líquido / Sólido	3 – 5000*
		Emulsificação seguida da evaporação do solvente	Líquido / Sólido	5 – 5000*

* 5000 µm não corresponde ao tamanho limite, esse método também pode ser aplicado para macroencapsulação.

Fonte: Adaptado de BRASILEIRO, 2011.

2.3.1. Emulsificação seguida da evaporação do solvente

A coacervação é uma técnica de encapsulação que se baseia na formação de um complexo insolúvel compostos por dois biopolímeros diferentes, mediante a alteração das condições do meio (pH, força iônica, etc) ocorrendo à deposição do complexo ao redor do ativo, formando um filme, responsável pela retenção, proteção e liberação do ativo (ALVIM *et al.*, 2010). É considerada uma tecnologia em potencial para a microencapsulação de flavorizantes, Figura 7 (SINHA *et al.*, 2004).

Segundo Buffo *et al.* (2001) a coacervação envolve três fases:

- Fase líquida que atua como veículo;
- fase do material a ser encapsulado;
- fase do encapsulante.

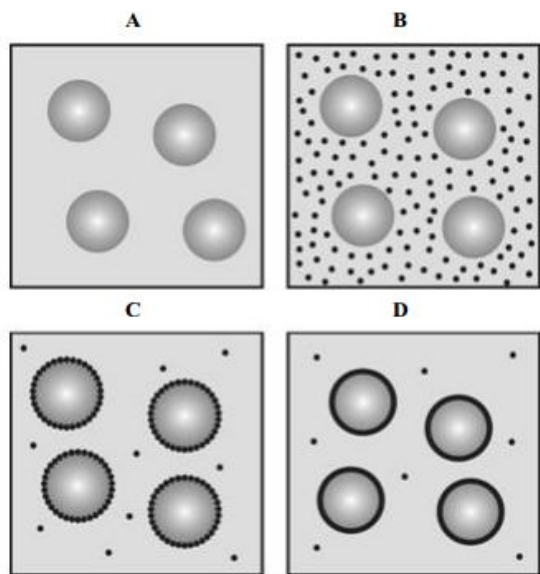


Figura 7. Representação esquemática do método coacervação: A – Deposição das partículas sólidas ou líquidas; B – Introdução da fase de separação; C – Deposição das migrogotas na superfície; D – Formação da membrana de revestimento.

Fonte: SINHA *et al.*, 2004.

Segundo Martina (2005), as emulsões são dispersões coloidais formadas por duas fases, uma fase designada de interna, dispersa ou descontínua, e por outra que rodeia as gotículas, designada de externa, dispersante ou contínua. Para além destes dois componentes existe um terceiro designado de agente emulsivo, o qual contribui para tornar a emulsão mais estável, pois se interpõe entre a fase dispersa e dispersante, retardando assim a sua separação, e que constitui a interfase. Desta forma, trata-se de sistemas termodinamicamente instáveis sendo necessário um considerável aporte de energia para obtê-las, geralmente energia mecânica.

Inicialmente, prepara-se uma fase orgânica, constituída por um solvente orgânico apolar no qual é dissolvido o polímero e incluído o princípio ativo por dissolução ou dispersão. Prepara-se também uma fase aquosa, que contém um tensoativo do tipo O/A, como, por exemplo, o Poli(acetato de vinila) (PVA) (ESSA *et al.*, 2013). Submete-se a emulsificação, por agitação de ambas as fases, seguindo-se a exposição da emulsão recém preparada a uma fonte de energia elevada, como, por exemplo, o ultrassom ou a homogeneização a alta pressão. Por fim, promove-se a remoção do solvente orgânico, ocorrendo à precipitação do polímero na fase externa aquosa e conseqüente formação das partículas (WAG *et al.*, 2013).

As duas principais técnicas de evaporação do solvente, a partir de uma emulsão, envolvem a formação de uma emulsão simples, do tipo óleo/água (O/A) ou água/óleo (A/O), ou de uma dupla emulsão, do tipo água/óleo/água (A/O/A), seguida pela eliminação do solvente. A escolha entre os dois métodos depende das características físicas e químicas do composto ativo a ser incorporado (MARTINA, 2005), conforme ilustrados na Figura 8.

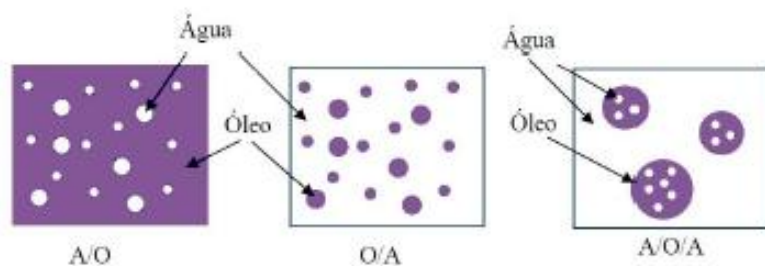


Figura 8. Diferentes tipos de emulsão

Fonte: Adaptado de SALAGER, 2014.

As emulsões do tipo A/O consistem em gotas de água dispersas em uma matriz contínua de óleo, entretanto as emulsões do tipo O/A consistem de gotas de óleo dispersas em água. As emulsões múltiplas do tipo A/O/A, por exemplo, são pequenas gotas de água alojadas dentro de gotas maiores. Este sistema por sua vez, está imerso em uma matriz de água (PAL, 1999).

O solvente orgânico presente é depois removido por evaporação sob agitação contínua. As micropartículas formadas são posteriormente submetidas a operações complementares, como a separação, a lavagem e a secagem (ZANETTI *et al.*, 2002).

De acordo com Ito *et al.*, (2007), a aplicação do método de emulsão água-óleo-água para a produção de microesferas, em matriz de PLGA, para a incorporação de substâncias hidrossolúveis como açúcares e alguns peptídeos e proteínas é uma boa estratégia.

No caso de agrotóxicos, o efeito do encapsulamento se reflete no prolongamento da atividade por conta da liberação controlada dos princípios ativos. Há ainda outros benefícios como: a redução da volatilização, da fitotoxicidade e da degradação ambiental, além, da questão de segurança, pois os pesticidas encapsulados reduzem o perigo de intoxicação a que o usuário é exposto (BRAR *et al.*, 2006).

O Quadro 1 apresenta um resumo com os principais resultados obtido por alguns autores que estudaram a obtenção de partículas pela técnica de encapsulação agrotóxicos.

Quadro 1. Resultados obtidos por alguns autores que estudaram encapsulamento de agrotóxicos

Método de obtenção	Compostos	Estrutura obtida	Resultados	Referência
Coacervação	Fase oleosa: Vaselina líquida, éter etílico e monoleato de sorbitan (3 % m/v). Fase aquosa: Alginato de sódio (4 % m/v) e <i>Bacillus subtilis</i> . Vertendo em Cloreto de Cálcio (10 % m/v)	Microesferas	A encapsulação do esporo microbiano foi satisfatória que a composição não afetou a propriedade biológica.	BREGNI <i>et al.</i> , 2000
Emulsificação O/A/O	Fase oleosa: alginato de sólido (2 - 5 % m/v), óleo vegetal (0,2 – 2 % m/v) e Span 80. Fase aquosa: <i>Aeromonas</i>	Micropartículas	Partículas com diâmetros inferior a 50 mm foram obtidos através de um método de emulsão, resultando em eficácia de incorporação da bactéria.	RODRIGUES <i>et al.</i> , 2005

	<i>hydrophila</i> , solução salina. Fase oleosa: óleo vegetal com Span 80			
<i>Spray dryer</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> , manitol, dextrina e dióxido de silício	Pó	A técnica de microencapsulação por <i>spray dryer</i> aumentou a estabilidade da enzima, mas as micropartículas apresentaram formas irregulares	SANTOS, 2012
Nanoprecipitação	Fase orgânica: PCL, acetona, Span®60, Miritol e atrazina. Fase aquosa: Tween®80 e água deionizada	Nanocápsulas	Mostrou-se eficaz para o preparo de formulações de nanocápsulas de PCL contendo o herbicida atrazina	SOUZA <i>et al.</i> , 2012

Bregni *et al.* (2000) estudaram microesferas incorporando, *Bacillus subtilis*. As microesferas foram preparadas pelo método de separação de fases coacervação, preparou-se inicialmente a emulsão primária com vaselina líquida, éter etílico e monoleato de sorbitan verteu-se em solução de alginato de sódio. Após a preparação, houve o exame microscópico para a confirmação. As microesferas foram preparadas por coacervação, com base no estágio intermediário de emulsão primária. As micropartículas foram reticuladas ao alginato de sódio vertendo em solução de cloreto de cálcio. Lavou as microesferas com água destilada, filtrou e secou-se em 37 °C.

Assim, os estudos mostraram que o encapsulamento dos esporos do *Bacillus subtilis* foi satisfatório com alginato de sódio.

O método de emulsificação em O/A/O foi utilizado por Rodrigues *et al.* (2005) utilizou *Aeromonas hydrophila* como alternativa para a imunização do sistema digestivo de peixes. As micropartículas foram preparadas pelo método base de emulsificação, empregando na fase oleosa: óleo vegetal, Span 80, fase aquosa: alginato de sódio e *Aeromonas hydrophila* e fase oleosa: óleo vegetal e Span 80 e alginato de sódio. Formou-se micropartículas estáveis com tamanhos inferiores 50 µm e com eficiência de encapsulação de 100 %.

Santos (2012) estudou microencapsulação do fungo *Fusarium oxysporum* por meio *spray drying*, visando à estabilidade da formulação e investiga benefícios dessa técnica. Usaram-se três variáveis (temperatura, pH e a composição) e em quatro composições de *Fusarium oxysporum* puro, *Fusarium oxysporum* com manitol, *Fusarium oxysporum* e dextrina e *Fusarium oxysporum* e dióxido de silício coloidal. O estudo do pó demonstrou que a técnica resultou grande benefício no armazenamento, estabilidade e propriedades físicas do encapsulado.

Souza *et al.*, (2012) descrevem a preparação e caracterização de nanocápsulas de PCL contendo herbicida atrazina, observando a influência de elementos utilizados na fase orgânica nos parâmetros tamanho, polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulamento. Na fase orgânica usou-se PCL, acetona, Span 60, miritol e atrazina e fase aquosa, Tween 80 e água deionizada, houve a dissolução dos componentes com auxílio do evaporador rotativo, a fim de obter uma concentração de atrazina. Nota-se a importância da avaliação destes parâmetros em diferentes tempos de armazenagem das formulações melhorando a estabilidade das mesmas. Portanto, o método de nanoprecipitação mostrou-se eficaz para o preparo de formulações de nanocápsulas de PCL contendo o herbicida atrazina, demonstrando uma técnica com potencial para obter sistemas mais seguros para a aplicação do herbicida no meio ambiente.

2.4. Caracterização de materiais

As aplicações de diferentes técnicas de análise permitem caracterizar os materiais. Dentre as técnicas mais utilizadas para caracterizar materiais poliméricos

estão às análises térmicas DSC e ATG, pois uma permite obter tais como se dá por diferentes técnicas de análise.

2.4.1. Análise térmica

A análise térmica pode ser definida como um grupo de técnicas nas quais uma propriedade física de uma substância é medida em função da temperatura a uma programação controlada de temperatura e sob uma atmosfera específica, geralmente em atmosfera inerte (CANEVAROLO, 2004).

Uma das ferramentas mais utilizadas para o estudo da estabilidade térmica dos polímeros é a análise termogravimétrica (ATG). Esta análise é definida como um processo contínuo que envolve a medida da variação de massa de uma amostra em função da temperatura e/ou tempo enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada de temperatura (LUCAS *et al.*, 2001).

Esta técnica possibilita conhecer as alterações que o aquecimento pode provocar na massa da substância, permitindo estabelecer a faixa da temperatura em que elas adquirem composição química, fixa, definida e constante; a temperatura em que começa a se decompor, acompanhar o andamento de reações de desidratação, oxidação, combustão, decomposição, etc. (CANEVAROLO, 2004).

A ATG é uma técnica muito utilizada na caracterização do perfil de degradação de polímeros e de outros materiais. A exposição à temperatura elevada pode, algumas vezes, alterar a estrutura química e, por consequência, as propriedades físicas dos materiais, conforme a Figura 9 (MOTHÉ *et al.*, 2009).

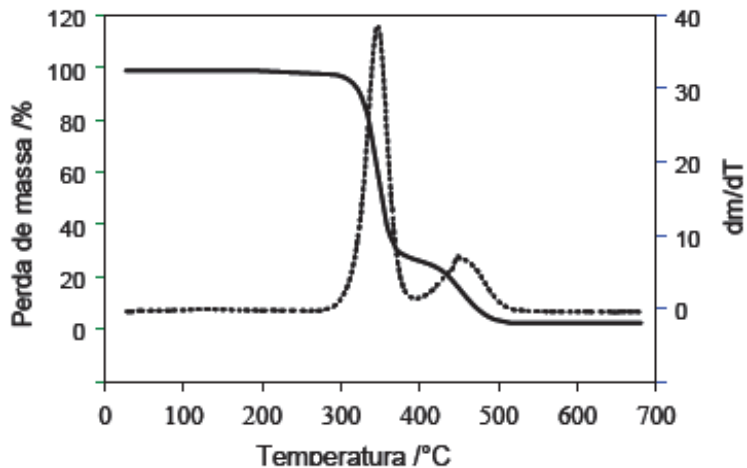


Figura 9. Curva de ATG (linha cheia) e primeira derivada (linha tracejada) para o poli (acetato de vinila), medida feita sob nitrogênio e com taxa de aquecimento de 20 °C min⁻¹.

Fonte: PAOLI, 2009.

A redução da massa da amostra, devido à formação de produtos voláteis durante a degradação a elevadas temperaturas, é monitorada em função do tempo. Quando o aquecimento é realizado sob atmosfera inerte ocorre degradação não oxidativa e sob atmosfera de oxigênio ocorre degradação oxidativa (DAL CASTEL, 2008).

2.4.2. Análise morfológica

As várias técnicas de microscopia eletrônica são hoje as principais ferramentas disponíveis para o estudo da estrutura fina e da morfologia de materiais (CANEVAROLO, 2004).

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é, sem dúvida, o microscópio eletrônico mais versátil, devido às suas várias características. É geralmente utilizado para o estudo de estruturas superficiais ou subsuperficiais de amostras com dimensões relativamente grandes. As imagens têm alta profundidade de foco, o que significa obter diferentes relevos da superfície da amostra. O MEV também produz imagens de alta resolução, o que garante obter alta ampliação de detalhes próximos sem perda de nitidez. A preparação de amostra e a obtenção de imagens são relativamente simples. A combinação destas características justifica o fato desta técnica ser hoje muito utilizada na pesquisa dos materiais (CANEVAROLO, 2004).

2.4.3. Determinação de densidade do material

A densidade de um material reflete sua estrutura química e a sua organização molecular. Assim, as regiões cristalinas são mais compactas, enquanto as regiões amorfas são mais volumosas (VICENTE, 2009).

Em vários processos a análise da densidade dos materiais é importante, devido à partícula ser medida e subdividido de acordo com seu volume e, assim, as variações na densidade podem causar variações no peso e dose (HICKEY *et al.*, 2003).

3. METODOLOGIA

3.1. Materiais

- Materiais encapsulantes: Poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) 75:25 %, poli(acetato de vinila) (PVA) e Diclorometano grau HPLC > 99,8 % fornecidos pelo laboratório da Sigma Aldrich e Poli (ácido láctico) (PLLA) foi fornecido pela Natural Works[®].
- Material encapsulado: Bioinseticida bacteriano, *Bacillus thuringiensis* subespécie *israelensis* (*Bti*), produzido pelo grupo Processos Biotecnológicos da UNIVILLE, em cultivo submerso em regime semicontínuo, com controle de pH (mantido em 7,0), temperatura (30 °C), agitação (450 - 750 rpm) e aeração (0,5 vvm). Após cultivo, o caldo foi centrifugado conforme proposto por Silva (2007) e a massa microbiana úmida conduzida para encapsulamento.

3.2. Métodos

A Figura 10 apresenta todas as etapas dos métodos que compõem este trabalho de dissertação.

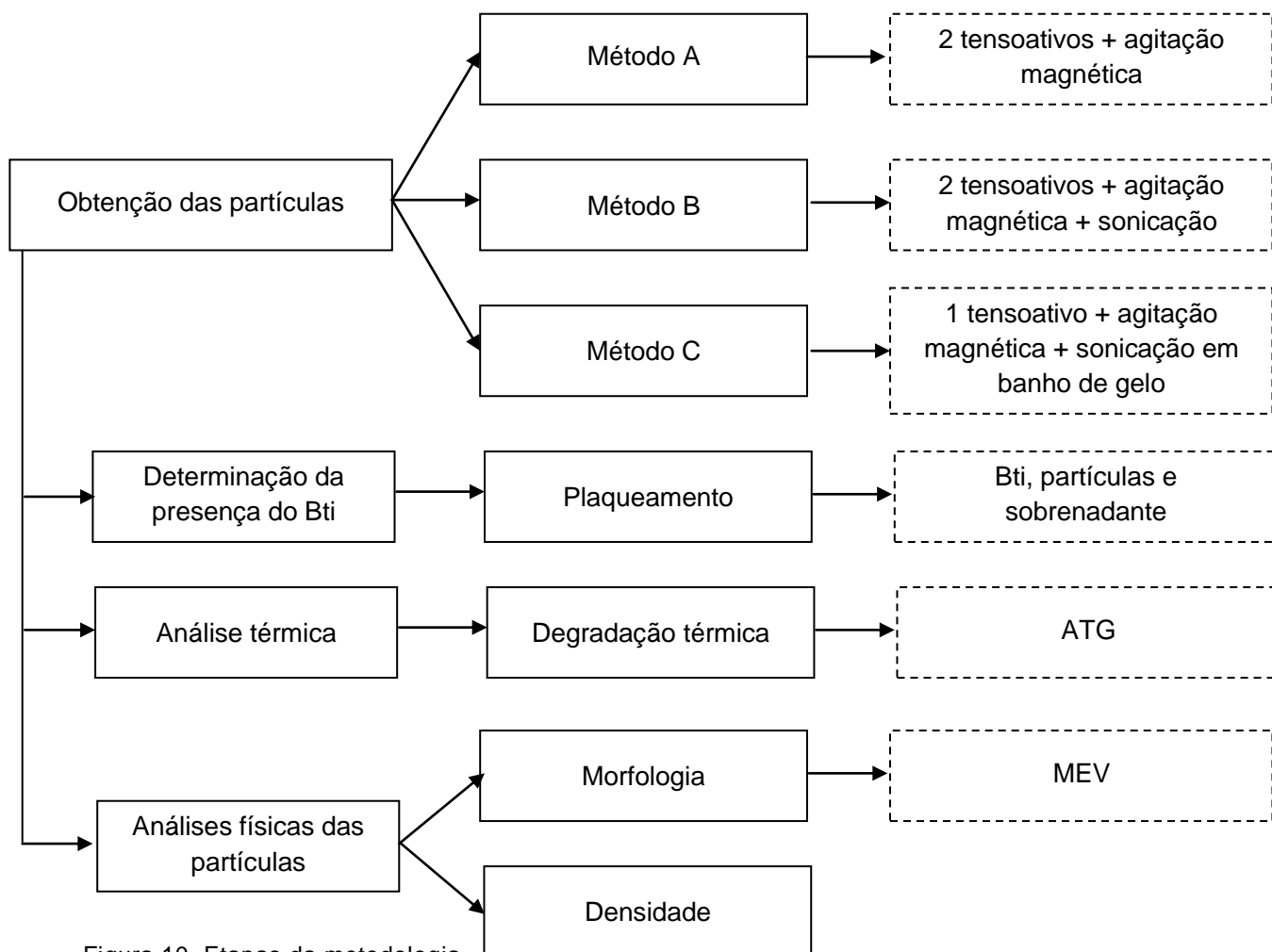


Figura 10. Etapas da metodologia
 Fonte: Primária, (2014).

3.3. Obtenção das partículas

3.3.1. Método A

Para a produção das partículas foi adaptada a formulação sugerida por Ito *et al.*, (2007), a qual era composta por uma fase orgânica contendo PLGA e Sunsoft 818H dissolvido no diclorometano, uma fase aquosa de água com dextran. Em seguida, a fase polimérica foi vertida sobre a solução aquosa e assim, a emulsão foi preparada com um homogeneizador mecânico em 10.000 rpm por 90 s. A primeira emulsão foi adicionada em 190 mL de 1,0 % (m/v) de PVA, e foi homogeneizado novamente em mesmas

condições, formando uma emulsão água-óleo-água. A emulsão foi vertida em 100 mL de água destilada, e ficou em agitação a 250 rpm por 6 h em temperatura ambiente.

Nesse processo de obtenção de partículas, inicialmente preparou-se uma emulsão água em óleo (A/O). Para isso, em um tubo de ensaio acrescentou-se 0,5 g de polímeros, 0,0752 g do tensoativo Sunsoft H818 e 8,0 mL de diclorometano, como solvente, levando-se ao vortex até a completa homogeneização. Em outro tubo de ensaio acrescentou-se 1,0 mL de água deionizada, levou-se os tubos ao agitador de microtubos, tipo vortex modelo VM 3000, até a homogeneização total, vertendo-se, em seguida, essa mistura na mistura polimérica. Como fase externa, em um Becker, coberto com papel alumínio, preparou-se 180,0 mL de uma solução PVA 1,0 % (m/v) com o auxílio de um agitador magnético, 78HW-1 (Biomixer), velocidade de aproximadamente 500 rpm, gotejou-se a emulsão (A/O) na solução de PVA, obtendo-se uma emulsão água-óleo-água (A/O/A). Finalizando foi acrescentado 100,0 mL de água deionizada na emulsão, deixou-se 24 h sob agitação magnética em temperatura ambiente, até a conclusão do processo de evaporação do solvente.

Em seguida, a mistura foi filtrada a vácuo empregando membranas 0,8 µm e 0,45 µm previamente secas e pesadas. As membranas com o lodo da filtração foram acondicionadas em estufa, Q317M do fabricante Quimis[®], pré-aquecida a 30 °C por 1 h, e então pesados novamente.

Para a produção das partículas contendo o bioinseticida acrescentou-se 0,1 g na primeira fase aquosa, etapa A/O.

Como forma de avaliar se o *Bti* não ficou na fase externa, realizou-se o plaqueamento do sobrenadante das amostras contendo *Bti*.

Realizou-se planejamento experimental, em que foram definidas as alterações na composição de cada amostra, conforme a Tabela 4.

Tabela 4. Planejamento experimental das amostras do método A

Amostra	Porcentagem de PLLA (%)	Porcentagem de PLGA (%)	<i>Bti</i>
PLLA_sBti_A	100	-	-
PLLA_cBti_A	100	-	+
90_10_sBti_A	90	10	-
90_10_cBti_A	90	10	+
80_20_sBti_A	80	20	-
80_20_cBti_A	80	20	+
70_30_sBti_A	70	30	-
70_30_cBti_A	70	30	+
60_40_sBti_A	60	40	-
60_40_cBti_A	60	40	+
50_50_sBti_A	50	50	-
50_50_cBti_A	50	50	+

(-) Ausente

(+) Presente

Após a obtenção das partículas, realizou-se a porcentagem de rendimento das partículas, conforme a Equação 1.

$$\% = \frac{(M_1 + M_2)}{M_3} * 100$$

Equação 1

Sendo:

M_1 = Massa retida na membrana 0,8 μm ;

M_2 = Massa retida na membrana 0,45 μm ;

M_3 = Balanço de massa (entrada) considerou-se 2,375 (0,5 g Polímero + 0,752 g Sunsoft + 1,8 g PVA).

3.3.2. Método B

O método B, também foi baseado no método descrito por Ito *et al.*, (2007), tendo como diferencial ao método A, além da agitação magnética, a aplicação do ultrassom.

Para este processo, inicialmente preparou-se uma mistura polimérica; em um tubo de ensaio acrescentou-se 0,5 g de polímero e 0,0752 g de Sunsoft H818 e foi dissolvido com 8,0 mL de diclorometano, levou-se ao agitador de tubos, tipo vortex, até a completa homogeneização, e acrescentou-se 1,0 mL de água deionizada, na mistura polimérica, e homogeneizou-se novamente. Em um Becker, adicionou-se 90,0 mL de PVA (1,0 % (m/v)) em um agitador magnético, com velocidade aproximadamente de 500 rpm, e gotejou-se a mistura na solução de PVA, obtendo uma emulsão água-óleo-água. Acrescentou-se 50,0 mL de água deionizada à mistura e agitou-se aproximadamente por 1 h. Após, sonicar em equipamento da Bandelin, modelo sonopuls HD 2200 ponteira MS 75, por 1 min a 55 – 60 W, a amostra ficou em repouso aproximadamente 8 h.

Em seguida, centrifugou-se a emulsão durante 20 min a 2200 força G e transferiu-se as partículas do fundo do tubo Falcon para a placa de Petri, as partículas foram secas na estufa a 30 °C, logo após pesou-se e posteriormente armazenou-se as partículas no dessecador. O sobrenadante foi centrifugado novamente e repetiram-se as mesmas etapas descritas anteriormente por duas vezes.

Nas amostras contendo bioinseticida, acrescentou 0,1 g *Bti* na primeira fase aquosa.

Realizou-se um planejamento experimental, como exemplificando a Tabela 5.

Tabela 5. Planejamento experimental das amostras do método B.

Amostra	Porcentagem de PLLA (%)	Porcentagem de PLGA (%)	<i>Bti</i>
PLLA_sBti_B	100	-	-
PLLA_cBti_B	100	-	+
90_10_sBti_B	90	10	-
90_10_cBti_B	90	10	+
80_20_sBti_B	80	20	-
80_20_cBti_B	80	20	+
70_30_sBti_B	70	30	-
70_30_cBti_B	70	30	+
60_40_sBti_B	60	40	-

60_40_cBti_B	60	40	+
50_50_sBti_B	50	50	-
50_50_cBti_B	50	50	+

(-) Ausente

(+) Presente

Após a obtenção das partículas, realizou-se a porcentagem de rendimento das partículas, de acordo com a Equação 2.

$$\% = \frac{(M_1 + M_2 + M_3)}{M_4} * 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

M_1 = Massa retida na primeira centrifugação;

M_2 = Massa retida na segunda centrifugação;

M_3 = Massa retida na terceira centrifugação;

M_4 = Balanço de massa (entrada) considerou-se 2,375 (0,5 g Polímero + 0,752 g Sunsoft + 1,8 g PVA).

3.3.3. Método C

As partículas foram preparadas pela técnica de evaporação do solvente usando a técnica de emulsão (O/A), descrita por Gomes (2009), foi preparado nanopartículas, utilizando um modelo de fármaco na incorporação, o ciprofloxacina. O procedimento é semelhante ao descrito por Ito *et al.*, (2007) entretanto acrescenta banho de gelo durante a sonificação.

Preparou-se a mistura polimérica com de 0,1 g de polímero, em 20 ml de diclorometano, em um frasco com tampa para evitar a evaporação do diclorometano (CH_2Cl_2). Colocou-se a solução à temperatura ambiente sob agitação lenta e constante. Após dissolução completa do polímero, deixou-se o frasco em repouso absoluto por, 24 a 28 h para relaxação das cadeias polimérica. A solução aquosa de PVA foi preparada num Becker, com 1,7 g de PVA em 100 mL de água destilada. Adicionou-se a mistura

polimérica na solução de PVA e utilizou-se o sonificador de haste durante 1 min a 55 – 60 W, para obter uma emulsão. Para evitar a evaporação do CH₂Cl₂ durante a utilização do sonificador, usou-se um banho de gelo.

Em seguida, a emulsão foi coberta com parafilme contendo perfurações, mantido à temperatura ambiente sob agitação lenta e constante durante pelo menos 24 h, para a lenta evaporação do solvente. Após, centrifugou-se esta emulsão durante 20 min a 2200 G e transferiu-se as partículas do fundo do falcon para a placa de Petri, as partículas foram secas na estufa a 30 °C, posteriormente pesou-se e armazenou-se no dessecador. O sobrenadante foi centrifugado novamente e repetiram-se as mesmas etapas descritas anteriormente por duas vezes.

Da mesma forma que nos métodos anteriores, nas amostras contendo bioinseticida, acrescentou 0,1 g de *Bti* na primeira fase aquosa.

Como forma de avaliar se o *Bti* não ficou na fase externa, realizou o plaqueamento do centrifugado das amostras contendo *Bti*.

Realizou-se um planejamento experimental, como exemplifica a Tabela 6.

Tabela 6. Planejamento experimental das amostras do método C.

Amostra	Porcentagem de PLLA (%)	Porcentagem de PLGA (%)	<i>Bti</i>
PLLA_sBti_C	100	-	-
PLLA_cBti_C	100	-	+
90_10_sBti_C	90	10	-
90_10_cBti_C	90	10	+
80_20_sBti_C	80	20	-
80_20_cBti_C	80	20	+
70_30_sBti_C	70	30	-
70_30_cBti_C	70	30	+
60_40_sBti_C	60	40	-
60_40_cBti_C	60	40	+
50_50_sBti_C	50	50	-
50_50_cBti_C	50	50	+

(-) Ausente

(+) Presente

Após a obtenção das partículas, realizou-se a porcentagem de rendimento das partículas, conforme a Equação 3.

$$\% = \frac{(M_1 + M_2 + M_3)}{M_4} * 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

M₁ = Massa retida na primeira centrifugação;

M₂ = Massa retida na segunda centrifugação;

M₃ = Massa retida na terceira centrifugação;

M₄ = Balanço de massa (entrada) considerou-se 1,8 (0,1 g Polímero + 1,7 g PVA).

3.4. Determinação da atividade do *Bti*

3.4.1. *Bti* puro

Para analisar o efeito dos métodos sobre a atividade do *Bti*, submeteu-se o bioinseticida a três diferentes condições, Tabela 7.

Tabela 7. Resultado global dos métodos contendo bioinseticida.

Método	Interferência no plaqueamento
Método A	O <i>Bti</i> não sofreu nenhuma interferência da potência ultrassônica
Método B	Sonificação por 1 min a 55 – 60 W
Método C	Sonificação por 1 min a 55 – 60 W em banho de gelo

Para verificar a influência sobre a atividade procedeu-se o plaqueamento, no qual, 0,1 mL do *Bti*, foram mantidos em solução salina 0,9 % (m/v) por 24 h sob-refrigeração recoberto com papel alumínio. A seguir foi retirada uma alíquota de 0,1 mL das soluções e inoculada em 25 mL do meio Luria-Bertani (LB) + Ágar, (ANEXO 01) em duplicata e mantidas a 30 °C por 24 h.

Após 24 h, removeram-se as placas de Petri inoculadas da estufa e identificaram-se as unidades formadoras de colônia (UFC). Posteriormente, as placas de Petri inoculadas foram esterilizadas e devidamente descartadas.

3.4.2. Partículas e sobrenadante

Para esse fim foi usado o método de plaqueamento, no qual, 0,1 mL das soluções sobrenadantes de cada amostra e 0,1 g de amostras, contendo *Bti*, foram mantidos em solução salina 0,9 % (m/v) por 24 h sob-refrigeração recoberto com papel alumínio. A seguir tirou uma alíquota de 0,1 mL das soluções e inoculada em 25 mL do meio Luria-Bertani (LB) + Ágar, em duplicata e mantidas a 30 °C por 24 h.

Após 24 h, as placas de Petri inoculadas da estufa foram deslocadas e identificaram-se as unidades formadoras de colônia (UFC). Posteriormente, as placas de Petri inoculadas foram esterilizadas e devidamente descartadas.

3.5. Análises térmicas

A análise termogravimétrica (ATG) foi realizada a uma razão de aquecimento de 10 °C/min, da temperatura ambiente (± 25 °C) até 450 °C, em cadinho de platina e atmosfera de nitrogênio a uma vazão de 50 mL/min. O equipamento empregado foi um Q50 da TA Instruments®. A massa das partículas e dos polímeros PLLA e PLGA (75:25) foram analisadas variou entre 5 a 10 mg. Por meio dessa técnica, foi possível determinar a temperatura de início de degradação (T_{onset}), utilizou-se a segunda derivada para identificar a temperatura de máxima degradação ($T_{máx}$) e variação de massa em função da temperatura (% perda de massa).

3.6. Análises físicas

3.6.1. Caracterização morfológica das partículas

Inicialmente, as amostras foram secas 30 °C por 1 h e foi analisada morfológicamente, por meio do microscópio eletrônico de varredura (MEV) JSM 67017F do fabricante JEOL, no laboratório de Microscopia eletrônica, da UDESC campus Joinville – SC, e para esse método, as amostras foram fixadas em um suporte metálico, por meio de uma fita adesiva de carbono dupla face e recobertas com uma fina cama de ouro (marca Sputter Coater, modelo Bal-Tec SCD 050) sob vácuo durante 120 segundos. A visualização foi realizada em aumentos de 50 a 1.000 x, com uma tensão de 10 kV.

3.6.2. Densidade aparente das partículas

A determinação da densidade aparente das amostras foi realizada com auxílio da tampa do cadinho de platina, modelo T 120907 da marca TA Instruments®. Inicialmente realizou-se a determinação do volume interno do recipiente, por meio das medidas do diâmetro e altura, com o auxílio de um paquímetro, conforme a Figura 11.

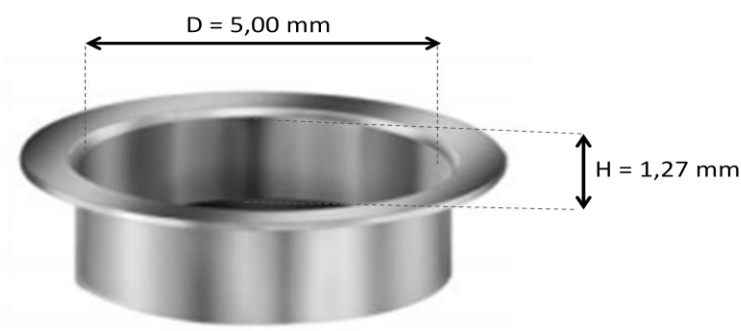


Figura 11. Diâmetro e altura interna da tampa do cadinho do ATG.

Tampa do cadinho do ATG - Fonte: <http://www.tainstruments.com>, web, 2014.

O teste de densidade foi conduzido sob temperatura ambiente de 25 °C (± 2 °C) iniciou a pesagem, em uma balança analítica marca Shimadzu modelo AX200. Foram realizadas triplicadas, posteriormente calculou-se a média aritmética e desvio padrão de cada amostra analisada.

3.7. Análise de variância (ANOVA) sobre as médias aritméticas e os desvios-padrões das densidades aparentes das amostras.

A análise estatística foi obtida utilizando-se o software Origin (versão 8.0), por meio do Teste de Tukey, o nível de confiança de 95%. Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação da técnica de produção de partículas

Para a seleção dos métodos de produção das partículas a serem adaptadas para o estudo usou-se seguintes critérios:

- Procedimento que não envolve aquecimento acima de 30 °C;
- os métodos de preparação das partículas fossem de emulsão em A/O;
- que conduzissem à produção de partículas com densidade inferior à da água.

Seguindo esses critérios, a obtenção das partículas apresentam as seguintes características: a melhor flotabilidade, pois o produto gerado será utilizado na superfície de corpos hídricos; utilizaram-se composições que não afetassem o meio ambiente e inerte ao encapsulado, polímero e copolímero biodegradável e que houvesse o controle de liberação da incorporação do bioinseticida, PLLA com PLGA 75:25; usou-se PLGA 75:25 pois tem menor peso molecular do que o PLGA 50:50.

A partir desses critérios e propriedades desejadas, definiram-se, com base, os seguintes métodos, aquele descritivo por Ito *et al.*, (2007) denominados método A e método B e o sugerido por Gomes (2009) denominado método C.

Como forma de organizar a discussão dos resultados, dividiu-se a análise dos resultados em duas sessões, a primeira com os três métodos e suas caracterizações e em seguida, os mesmos métodos com o modelo de incorporação e suas caracterizações, quanto às suas propriedades térmicas, morfologias e físicas e a capacidade de incorporação do *Bti*.

4.2. Caracterização das partículas de acordo com os métodos de produção e composição da matriz polimérica

A Figura 12 apresenta os percentuais de rendimento separados por método de obtenção e para cada composição da matriz.

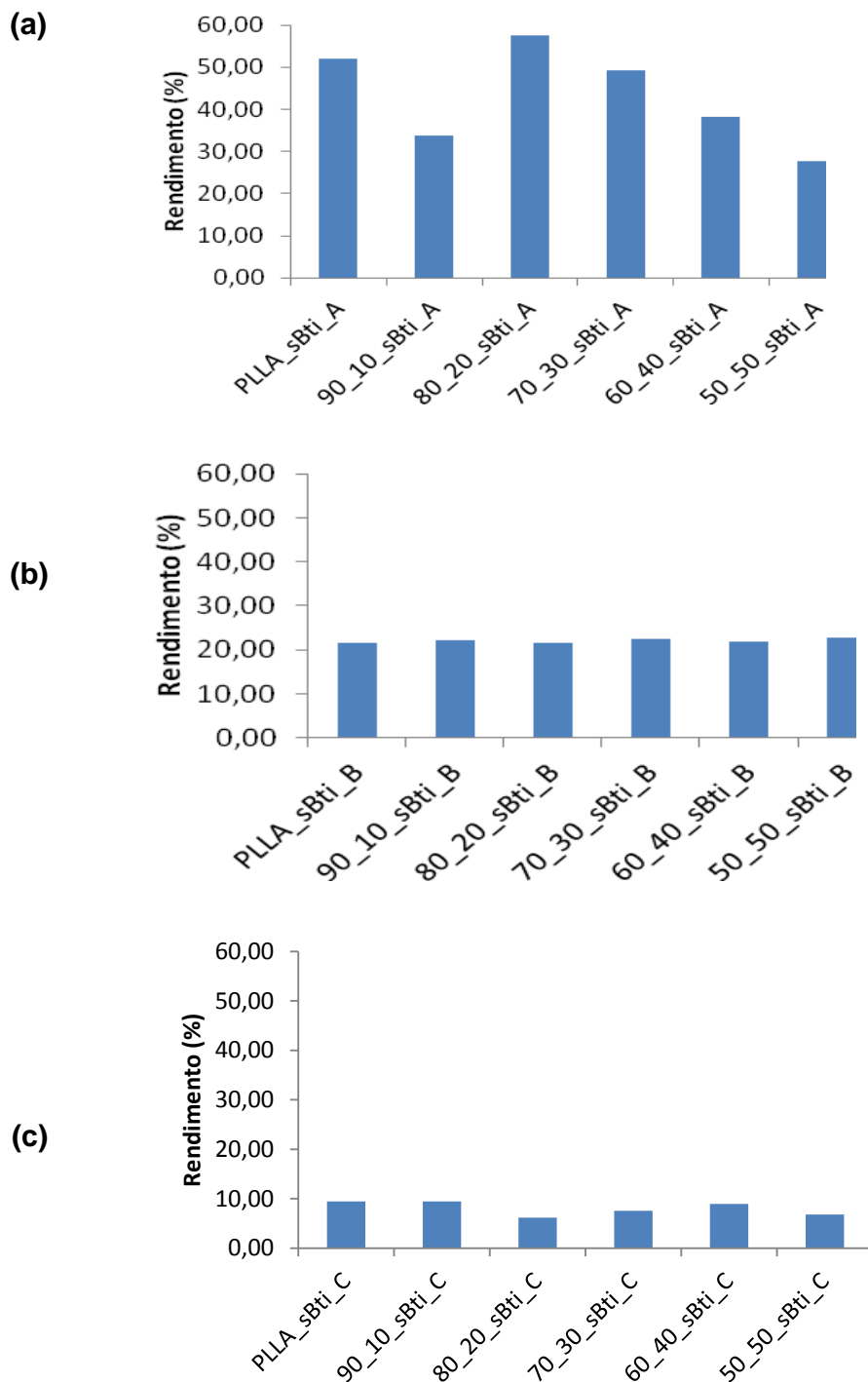


Figura 12. Percentual de rendimento de cada amostra, (a) método A; (b) método B e (c) método C.

Observou no método A, a amostra 80_20_sBti_A apresentou o maior de rendimento, com aproximadamente 57,5 %, comparadas com as outras amostras e a amostra 50_50_sBti_A, 27,5 %, proporcionou o menor rendimento. Em seguida, no método B prontamente a amostra 50_50sBti_B apresentou o maior rendimento, com

21,5 %, e a amostra PLLA_sBti_B com o menor rendimento, 20,0 %. Entretanto no método C, a amostra PLLA_sBti_C expressou o maior rendimento, com 9,5 %, prontamente, 90_10_sBti_C representou o menor rendimento nesse método, com 5,5 %.

Em relação à estabilidade térmica a Figura 13 expõe as curvas de ATG dos polímeros (PLLA) e do copolímero (PLGA).

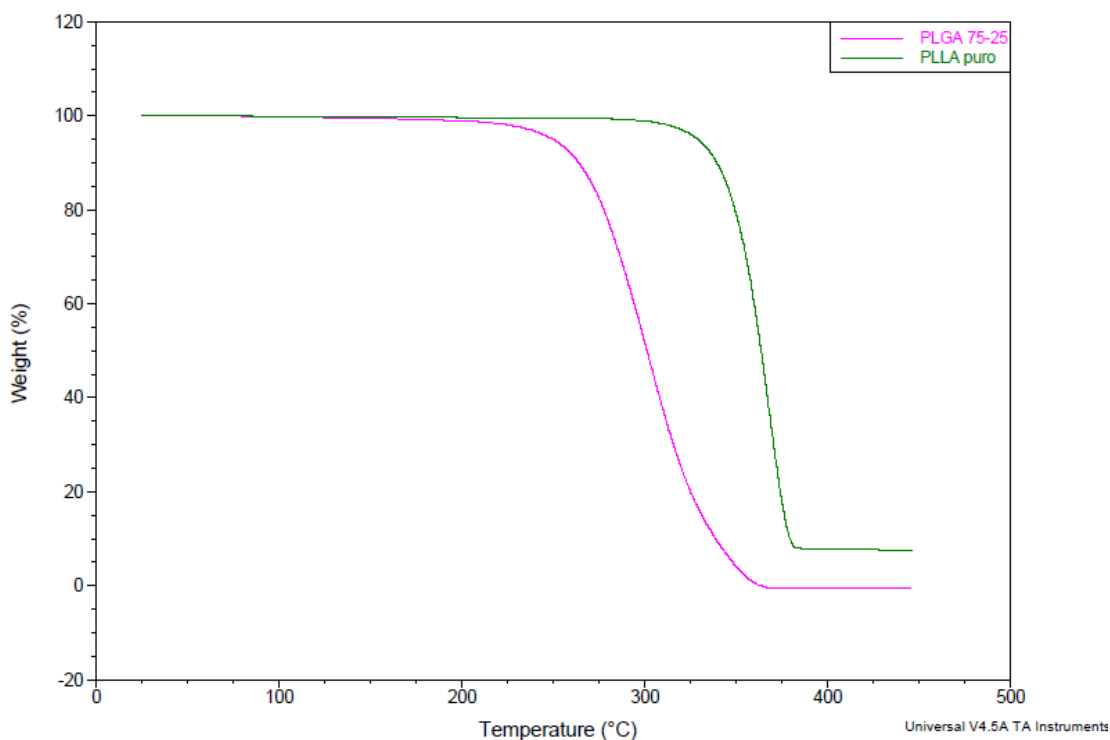


Figura 13. Curvas de ATG do polímero (PLLA) e co-polímero (PLGA).

O perfil de degradação térmica do PLLA e PLGA mostrou a ocorrência de 1 evento, o PLLA apresentou o T_{onset} 346,9 °C e o copolímero PLGA 75-25 o T_{onset} foi igual a 268,44 °C. Estes valores foram superiores ao encontrado nas literaturas, T_{onset} 329,8 °C do PLLA (CHEN *et al.*, 2003) e do PLGA o evento térmico ocorreu a partir de 247 °C (SALIBA, 2007). Este comportamento pode ser explicado pela diferença nas características do material, como por exemplo, a sua massa molar. A estabilidade térmica de materiais poliméricos pode variar em função da sua massa molar e estrutura química (LUCAS *et al.*, 2001).

Com relação à temperatura de degradação máxima ($T_{\text{máx}}$) para o PLLA encontrou-se 367,6 °C.

Segundo Ferreira *et al.*, (2012), esse valor enquadra-se em seu estudo, a temperatura máxima de degradação foi próxima de 340 e 400 °C. Já, o PLGA mostrou-se mais baixa do PLLA com o T_{máx} igual a 301,12 °C. Confrontado com Saliba (2007), a temperatura de degradação máxima apresentou-se superior, a 254 °C. Esse valor se enquadra no estudo realizado por Ferreira *et al.*, (2012), para o qual a temperatura máxima de degradação de PLLA de diferentes massas molares foi entre 340 a 400 °C. Já, para PLGA mostrou-se mais baixa que a temperatura do PLLA com o T_{máx} igual a 301,12 °C. Confrontado com Saliba (2007), a temperatura de degradação máxima apresentou-se superior, a 254 °C.

Na Figura 14 são apresentados os resultados obtidos na análise de estabilidade térmica, das composições dos métodos em estudo, método A (a), método B (b), e método (c). No Apêndice 02 é apresentada uma tabela com os parâmetros determinados a partir dessas curvas.

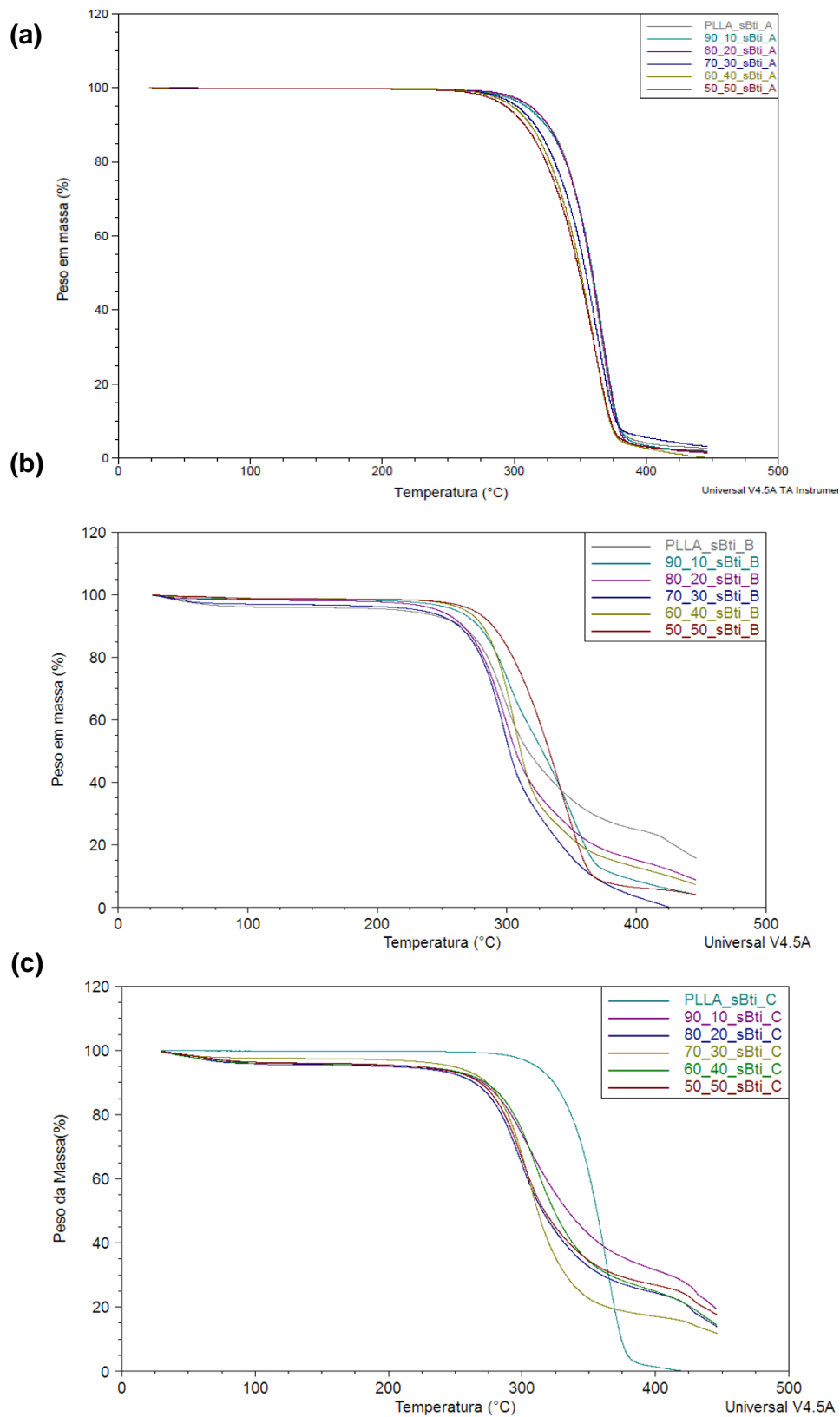


Figura 14. Curvas termogravimétricas das partículas dos métodos, (a) método A; (b) método B e (c) método C.

Para as curvas termogravimétricas registradas para as 6 amostras obtidas pelo método A, observaram-se que as T_{onset} estão entre 324 e 340 °C (50_50_sBti_A e 80_20_sBti_A). O método B, o T_{onset} apresentaram entre 280 (PLLA_sBti_B) e 324 °C (60_40_sBti_B). No método C, a amostra 80_20_sBti_C apresentou o T_{onset} com 279 °C, já a amostra 70_30_sBti_C com 324 °C.

Entretanto, a $T_{\text{máx}}$ no método A, oscilou entre 360 a 366 °C das amostras 50_50_sBti_A e 90_10_sBti_A. No método B, o $T_{\text{máx}}$ apresentou entre 297 a 361 °C, PLLA_sBti_B e 90_10_sBti_B respectivamente. Já, no método C o $T_{\text{máx}}$ apresentou entre 297 a 309 °C, nas amostras 80_20_sBti_C e 60_40_sBti_C.

A perda de massa (%) relacionada no método A foram próximos a 100 %, sendo que a amostra 60_40_sBti_A mostrou a maior perda de massa com 99 %, e a amostra PLLA_sBti_A menor perda de massa com 96 %. A perda de massa no método B, demonstraram-se mais baixas, entre 86 a 96 %, 80_20_sBti_B e 70_30_sBti_B. Porém as amostras no método C, apresentaram baixa perda de massa entre 66 a 82 %, das amostras PLLA_sBti_C e 70_30_sBti_C.

Todas as amostras apresentaram comportamento semelhante apenas 1 estágio de perda de massa, porém o método A apresentou T_{onset} e o $T_{\text{máx}}$ superior dos método B e C. E as amostras PLLA_sBti_A, PLLA_sBti_B e PLLA_sBti_C proporcionaram a T_{onset} inferior ao polímero PLLA puro, a adição dos tensoativos, podem ter alterado a estrutura polimérica das amostras.

Ao analisar os valores T_{onset} e $T_{\text{máx}}$ para todas as amostras obtidas pelo método A ao compará-los aos valores obtidos pelo método B verifica-se uma redução dessas temperaturas indicando menor estabilidade térmica das amostras obtidas pelo segundo método.

Da mesma forma ao analisar os valores T_{onset} e $T_{\text{máx}}$ obtidos para as amostras produzidas pelos métodos B e C, ou seja, nas quais a frequência ultrassônica foi aplicada, verifica-se que os valores foram semelhantes.

A Figura 15 apresenta o conjunto de micrografias, organizadas por método de obtenção das partículas e as composições relativas dos polímeros nas matrizes.

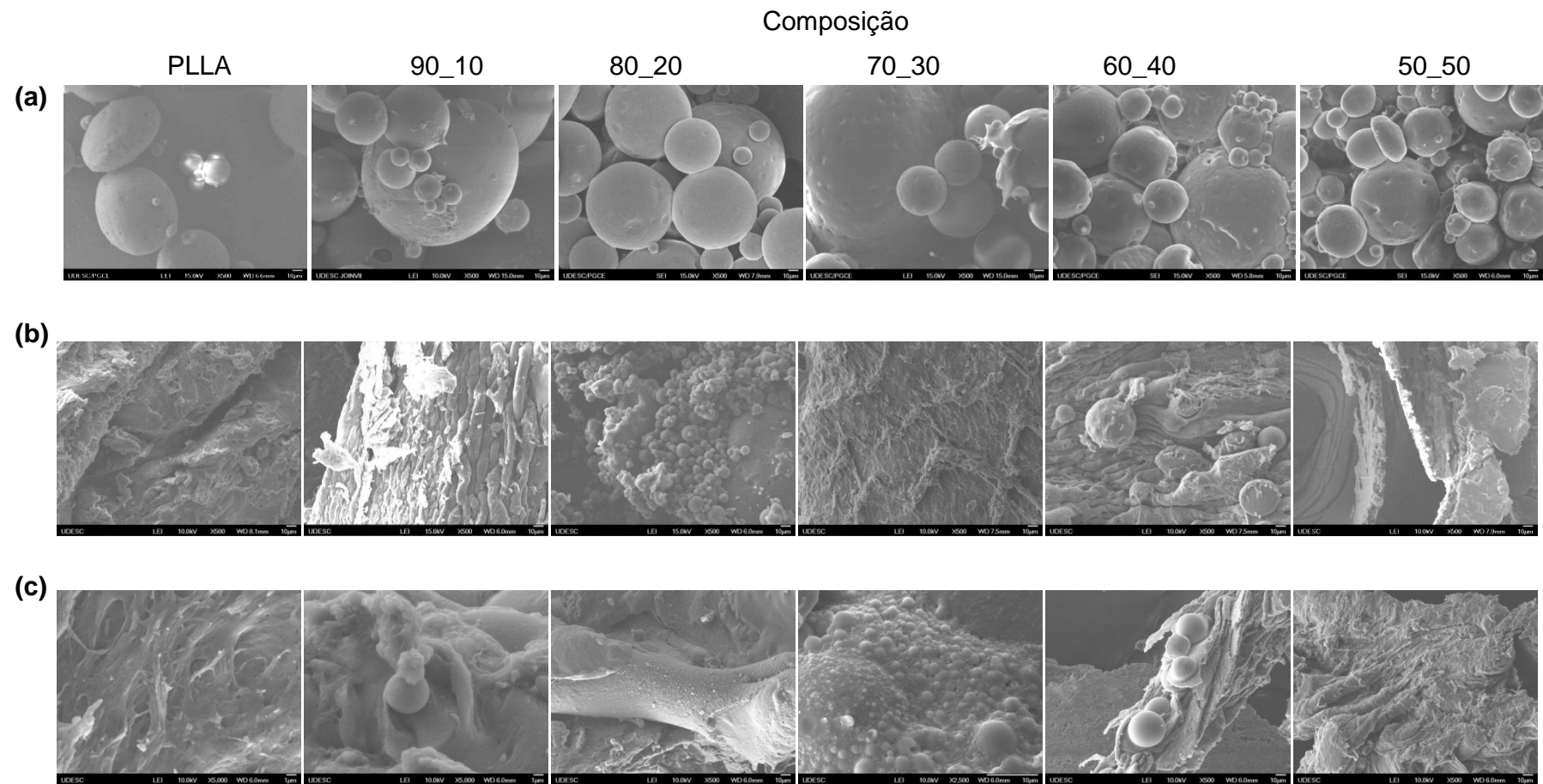


Figura 15. Caracterização morfológica das partículas com ampliação de 500 x, (a) método A; (b) método B e (c) método C.

As micrografias obtidas pelo método A permitem verificar que às superfícies das amostras apresentaram lisas e com formatos esféricos. Inicialmente, as amostras 60_40_sBti_A e a 50_50_sBti_A ficaram mais aglomeradas entre elas e visivelmente conseguiram manter um padrão de partículas menores do que as outras, mas vale ressaltar que em todas as amostras apresentam tamanhos variados.

Para todas as amostras obtidas no método B foi observado que os aglomerados apresentam uma forma irregular e não esférica. Nas amostras, PLLA_sBti_B, 90_10_sBti_B, 70_30_sBti_B e 50_50_sBti_B, apresentam textura intensamente rugosa. Nas amostras 80_20_sBti_B e 60_40_sBti_B verificou superficialmente o aparecimento de algumas esferas aderidas sobre um fragmento polimérico gerado pela coagulação.

Relataram Ito *et al.*, (2012), a morfologia irregular, pode surgir durante a coagulação das microgotas na emulsão ou pode ser pela evaporação incompleta do solvente, diclorometano, nas partículas. Assim, quanto mais homogêneas as partículas, melhor é sua fluidez e a emulsão é mais estável.

No método C as amostras 90_10_sBti_C, 70_30_sBti_C e 60_40_sBti_C formaram vestígios de esferas, e nas amostras PLLA_sBti_C, 80_20_sBti_C e 50_50_sBti_C apresentou uma textura intensamente rugosa e irregular. De acordo com Cardoso *et al.* (2013), observou-se que as partículas de PLLA com PVA, apresentaram as mesmas características, com formato irregular e superfície rugosa.

Os resultados apresentados para as amostras contendo PLGA, Figura 15 (b,c) estão de acordo com Medeiros (2013), também observou que micropartículas contendo PLGA em sua matriz, apresentaram superfície e estrutura rugosa e porosa.

A forma geral das partículas pode ser afetada por uma série de fatores, como o peso molecular e concentração dos polímeros utilizados pela técnica de preparação, e como esperado, partículas obtidas pelas técnicas de emulsificação apresentam-se mais esféricas que aquelas obtidas por outras técnicas de microencapsulação. Cabe destacar ainda que, o teor de tensoativos também interfere nesse processo. Quando comparado com agitação mecânica, a aplicação de alta energia (sonicação) favorece o aumento da área superficial, reduzindo o tamanho das gotas e aumentando sua quantidade exigindo portanto, maior concentração de tensoativos para estabilizar a interface. Logo, a condição disforme identificada nas amostras obtidas por meio dos métodos B e C sugere a necessidade de determinar a melhor proporção de tensoativos nesses casos. Sabe-se que com o adequado balanço na composição o processo de sonificação leva à

formação de gotículas esféricas e com diâmetro bem controlado (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Dentre os critérios de seleção dos métodos estava à busca por gerar partículas com a densidade inferior da água, Figura 16 mostra os valores médios de densidade aparente e respectivos desvios-padrões determinados para as amostras geradas pelos diferentes métodos utilizados.

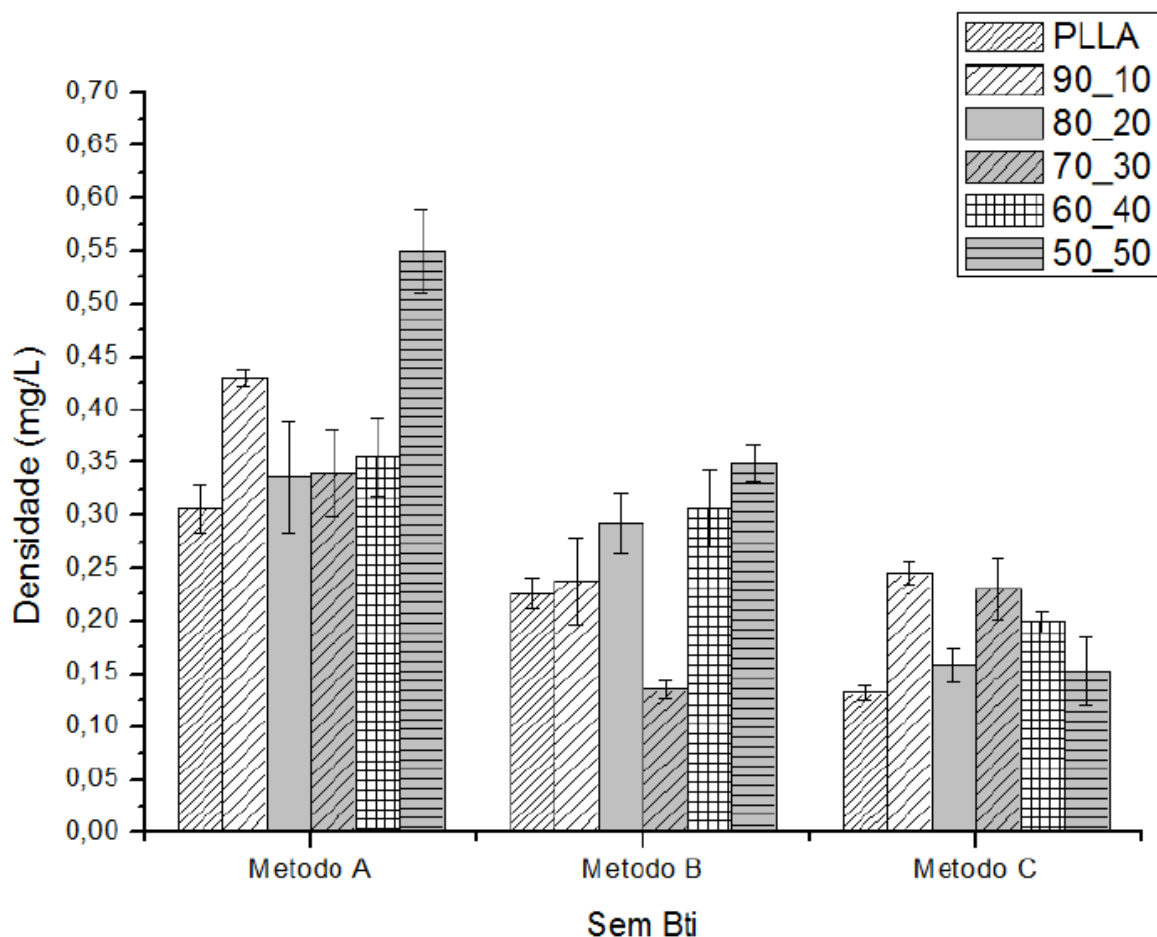


Figura 16. Densidade aparente das partículas e seus respectivos desvios-padrões.

Observou-se para o método A, as partículas encontraram-se com densidade aparente entre 0,3160 g/mL e 0,5511 g/mL, as amostras PLLA_sBti_A e 50:50_sBti_A respectivamente. No entanto, no método B, verificou-se que a densidade aparente esta entre 0,1352 g/mL e 0,3494 g/mL amostras 70_30_sBti_B e 50:50_sBti_B respectivamente. Entretanto, observou-se que as partículas apresentaram a densidade aparente entre 0,1328 g/mL e 0,2454 g/mL amostras PLLA_sBti_C e 90_10_sBti_C respectivamente, conforme a Figura 16.

Notou-se que a presença do sonificador no processo (método B e C), durante a obtenção das partículas, auxiliou a reduzir a densidade aparente. Conforme Basedow *et al.* (1977), o efeito mais evidente da exposição de uma solução polimérica à irradiação ultrassônica de alta energia é a diminuição de sua viscosidade e a redução de massa molar. Entretanto, não há evidências de que existe interação entre a onda de som e a cadeia polimérica (PRICE, 2002).

A baixa densidade registrada para as partículas é importante em virtude de se vislumbra a aplicação em superfície de água corrente.

De acordo com análise de variância (ANOVA), considerando o valor de densidade aparente do PLLA como referencia, verificou-se que a densidade obtida pelo método A 90_10_sBti_A e 50_50_sBti_A apresentaram diferença estatisticamente significativo, $p= 0,00087$ e $p= 0,00076$ respectivamente. E as demais amostras foram estatisticamente iguais.

No método B, a mesma análise verificou-se que das variáveis testadas, as amostras 80_20_sBti_B, 70_30_sBti_B, 60_40_sBti_B e 50_50_sBti_B apresentaram diferença estatisticamente significativa e a amostra 90_10_sBti_B foi estatisticamente igual ao PLLA_sBti_B.

O método C, as amostras 90_10_sBti_C, 70_30_sBti_C e 60_40_sBti_C, apresentaram diferença estatisticamente significativa e as demais formulações foram estatisticamente iguais.

Compararam-se as densidades aparente das partículas de PLLA de cada método, verificou-se que são diferentes estatisticamente significativas. A particularidade de cada método teve influencia na densidade das formulações, a influência da utilização do sonificador na densidade aparente em cada amostra.

4.3. Caracterização das partículas com modelo de bioinseticida para incorporação dos métodos de produção e composição da matriz polimérica

A Figura 17 apresenta os percentuais de rendimento separados por método de obtenção e para cada composição da matriz para todas as amostras contendo *Bti*.

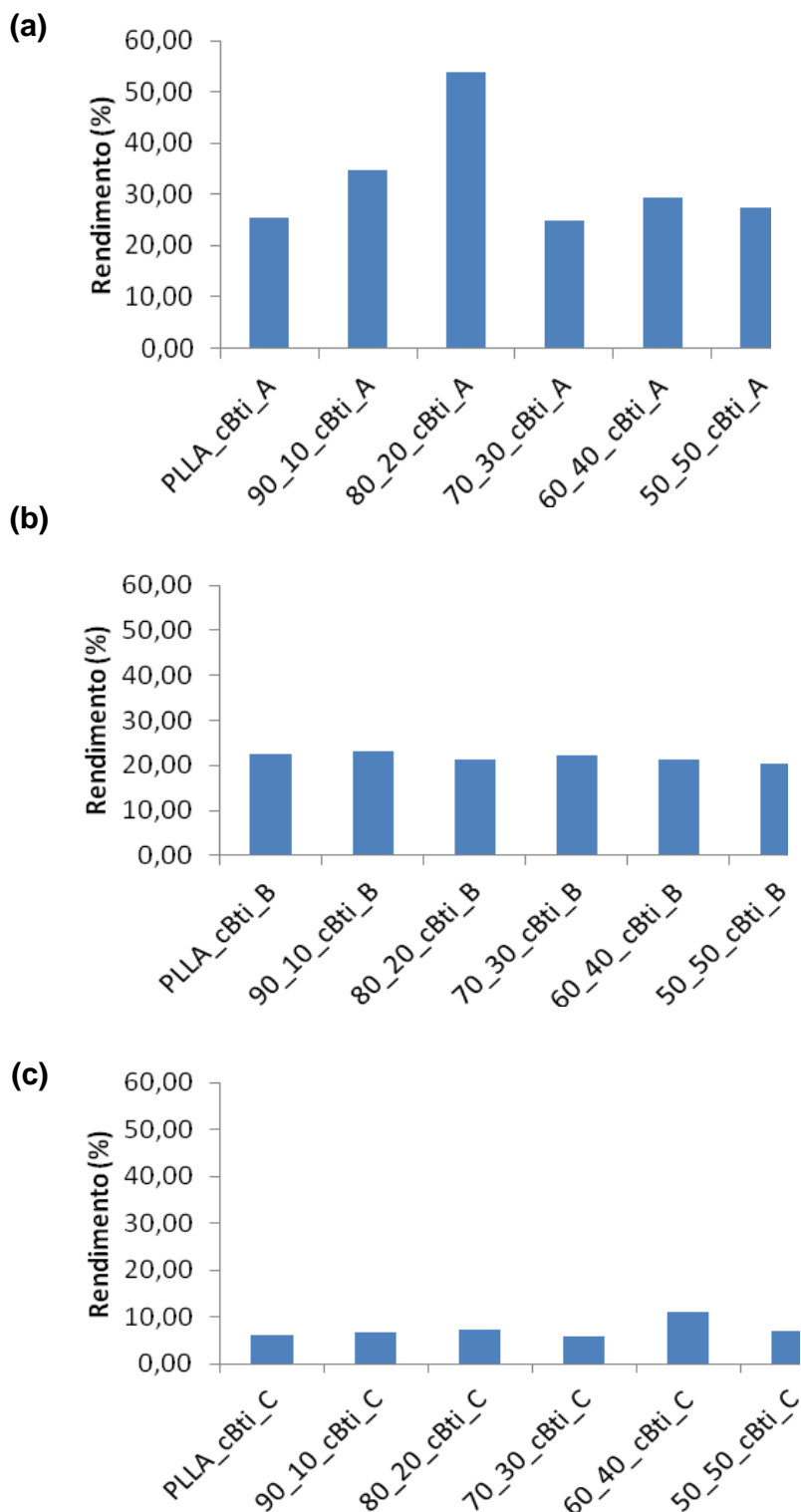


Figura 17. Percentual de rendimento de cada amostra, com *Bti*, (a) método A; (b) método B e (c) método C.

Analisando esses resultados pelo método de produção das partículas, a amostra que apresentou maior rendimento dentre todas foi a 80_20_cBti_A, com

aproximadamente 54 %. Entretanto a amostra 70_30_cBti_A, obteve menor rendimento, com 25 %. As amostras geradas pelo método B apresentaram rendimentos semelhantes e em torno de 22% e dentre aquelas geradas pelo método C, o rendimento foi inferior a 11%.

Ao comparar os resultados de rendimento de partículas obtidas na presença de *Bti* com aqueles registrados na ausência do bioativo (Figura 12) verifica-se que a inclusão do bioinseticida na formulação não influenciou o rendimento das amostras geradas pelos métodos B e C. Pelo método A, somente as amostras PLLA e 70_30, apresentaram queda nos rendimentos. Esses dados indicam que a presença do *Bti* exerce pouca influência sobre o rendimento e portanto, os fatores apontados na discussão sobre as micrografias mantêm-se relevantes.

Após a obtenção das partículas procedeu-se os ensaios de plaqueamento tanto para verificar o efeito dos metodos sobre a atividade do *Bti* quanto para identificar se o bioinseticida foi efetivamente encapsulado ou permaneceu na fase externa durante a produção.

Primeiramente, submeteu-se o *Bti* puro aos processos de agitação mecânica, de sonicação e banho de gelo, conforme os períodos descritos em cada método e realizou-se o plaqueamento. Os resultados estão apresentados na Figura 18.

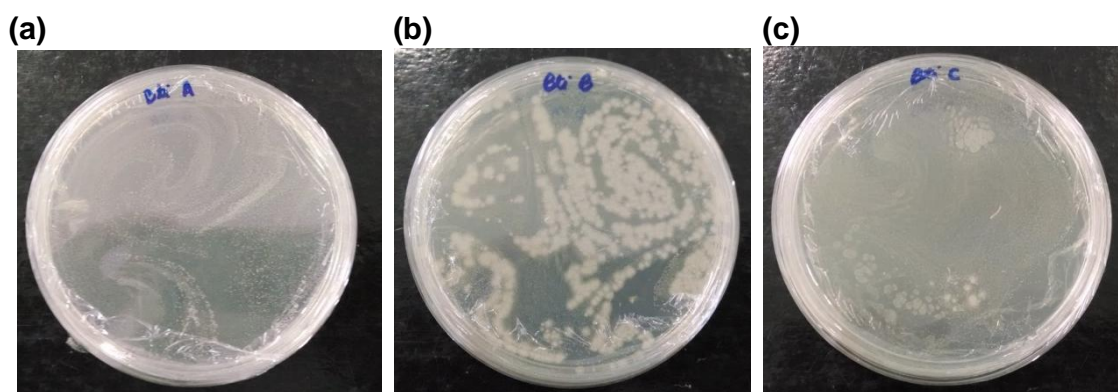


Figura 18. Plaqueamento do agente encapsulado; (a) *Bti* pelo método A; (b) *Bti* pelo método B; (c) *Bti* pelo método C.

Observou que a influência do ultrassom não afetou a atividade do bioinseticida, houve o crescimento microbiano do *Bti* puro.

O tratamento com ultrassom pode-se aplicar sobre muitos microrganismos (bactérias, esporos, leveduras, protozoários e vírus) variando a sua influência de acordo

com os tipos de microrganismos. Então, as bactérias gram-positivas são menos sensíveis ao ultrassom que bactérias gram-negativas, porém, os esporos são altamente resistentes à ação do ultrassom, necessitando de horas para a inativação (ARANHA *et al.*, 2014).

Uma vez confirmado que os processos físicos-mecânicos não interferiram na atividade do *Bti* procedeu-se ao ensaio de plaqueamento com as amostras particuladas e os respectivos sobrenadantes. Os resultados dessas análises podem ser observados nas Figuras 19 e 20, respectivamente.

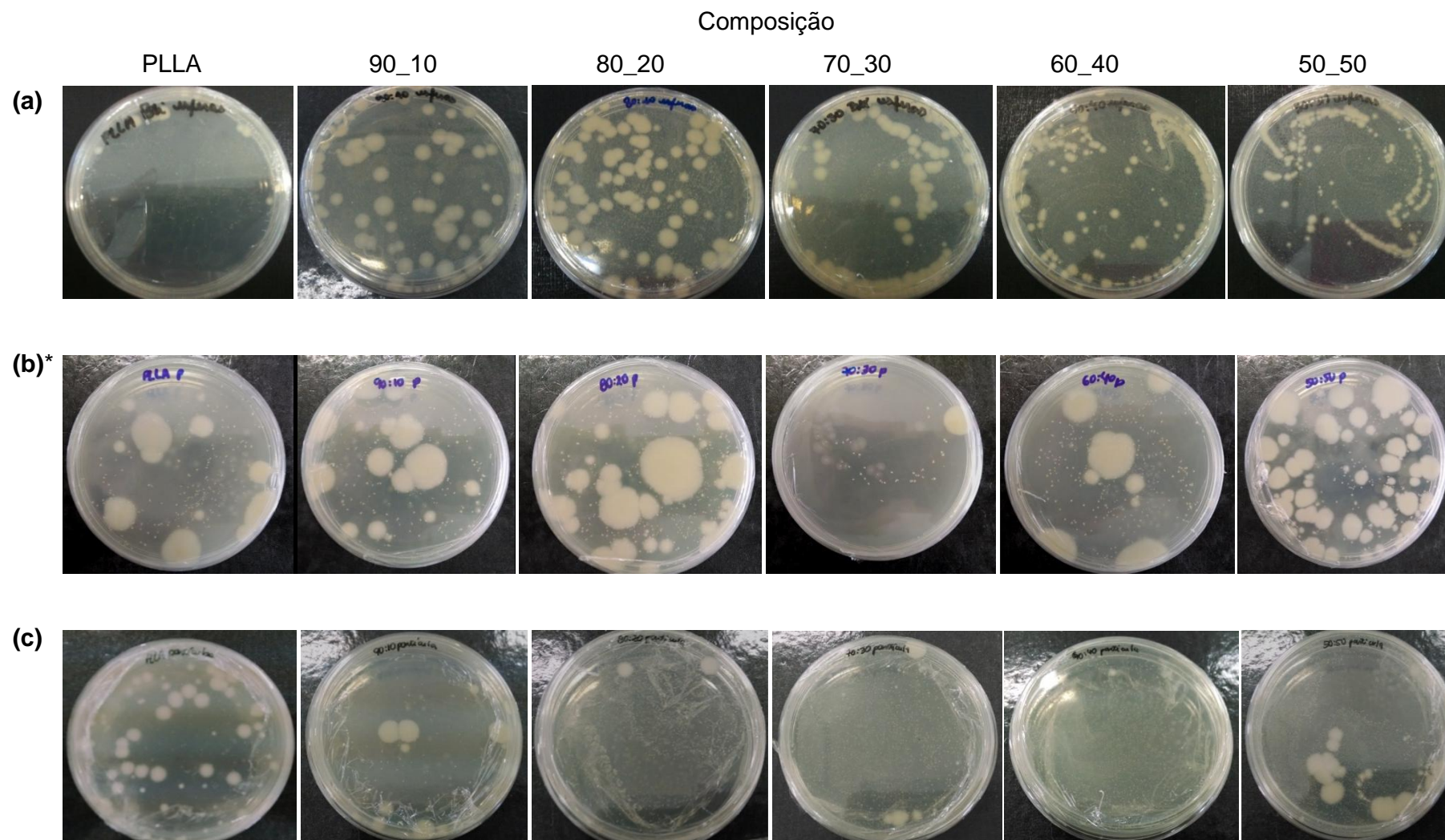


Figura 19. Relação do plaqueamento das partículas, (a) método A; (b) método B; (c) método C.

* Método B as placas de Petri permaneceram na estufa 30 °C por 48 h.

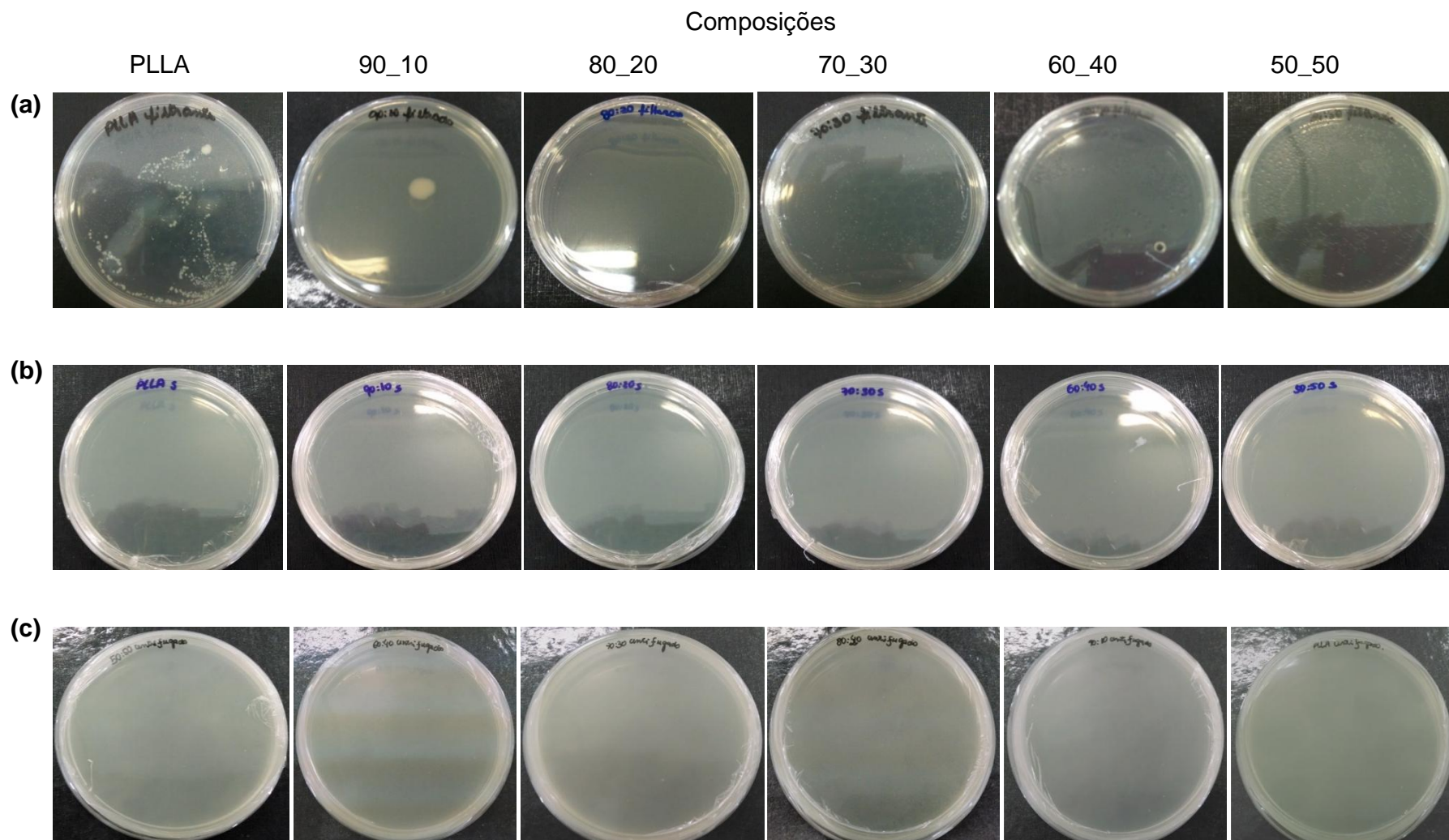


Figura 20. Relação do plaqueamento dos sobrenadantes, (a) método A; (b) método B; (c) método C.

Na análise das partículas produzidas pelo método A (Figura 19), a amostra PLLA_cBti_A, apresentou baixo número de unidades formadoras de colônia em relação às outras amostras do seu grupo, enquanto que as amostras 90_20_cBti_A e 80_20_cBti_A destacam-se no número de colônias. Ao analisar os resultados dos sobrenadantes (Figura 20 (a)), foi possível notar que as amostras 80_20_cBti_A, 70_30_cBti_A, 60_40_cBti_A e 50_50_cBti_A apresentaram traços do *Bti* e que a presença de PLGA em proporção maiores que 20 % favorecem esse processo.

No método B, constatou-se o crescimento microbiano nas partículas, certificou-se que as colônias ficaram maiores do que nos outros métodos, pois, dentro de 24 h na estufa a 30 °C as colônias permaneceram pequenas para a fotografia, assim, ficaram 48 h na estufa com a mesma temperatura, para crescerem as colônias e melhor aparecerem no trabalho. Já nos sobrenadantes das amostras, não apresentaram crescimento microbiano, o *Bti* foi inteiramente encapsulado nas partículas e a potência ultrassônica não afetou o bioinseticida, segundo a Figura 20 (b).

Analisando-se os resultados de plaqueamento no método C, verificou-se que houve crescimento de colônias do *Bti*. Nas amostras da 80_20_cBti_C, 70_30_cBti_C e 60_40_cBti_C, houve um melhor controle de liberação do *Bti* relativamente às demais amostras desse grupo e com relação aos outros métodos. A Figura 20 (c) permite observar que os sobrenadantes, não apresentaram colônias de *Bti*. Este conjunto de resultados sugere que a incorporação do *Bti* foi bem sucedida nas partículas e que esse não sofreu ruptura celular, quando submetido à potência ultrassônica do sonificador.

Com a influência da potência ultrassônica, houve preocupação de inativar o bioinseticida, mas segundo Pontes (2003), a etapa de sonificação ocorre a ruptura celular e assim liberando os cristais *cry* do *Bt*, logo não afetou a incorporação do agente ativo nas partículas.

A Figura 21, apresenta as curvas de ATG das partículas com o *Bti*.

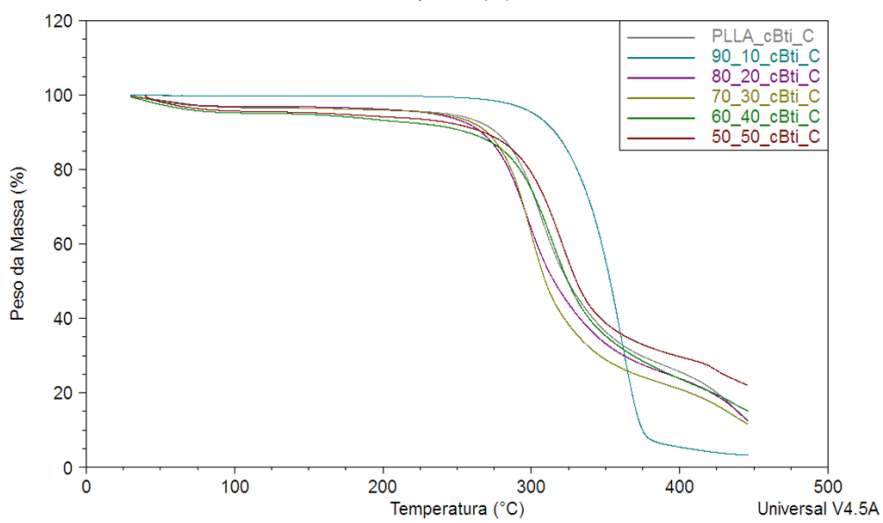
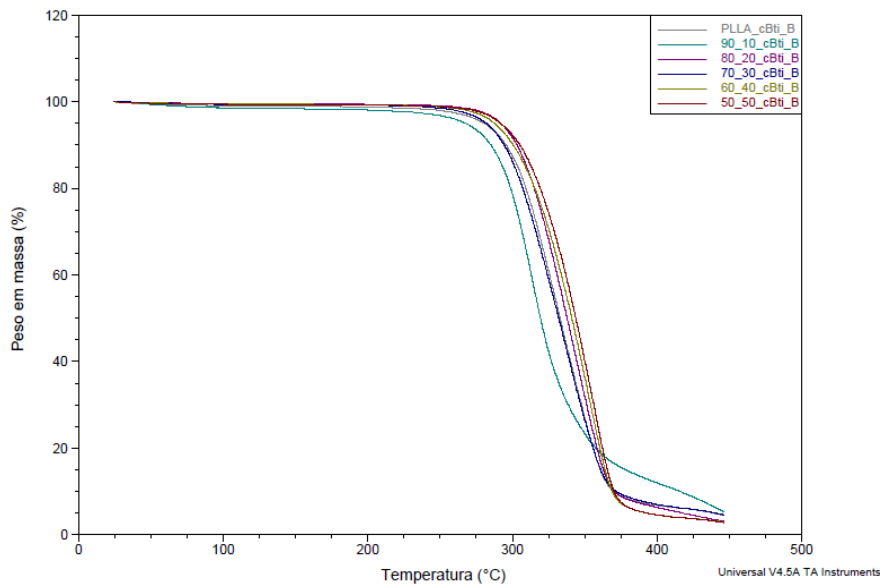
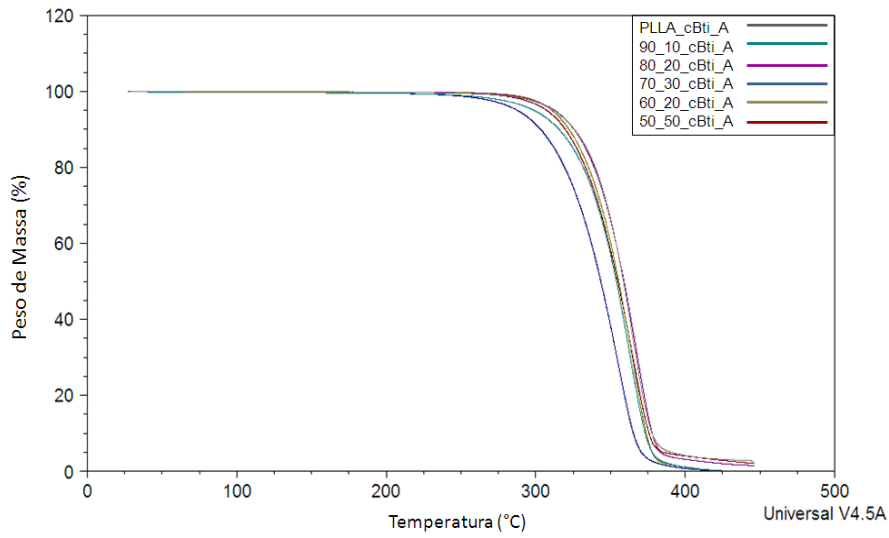


Figura 21. Curvas termogravimétricas das partículas dos métodos com *Bti*, (a) método A; (b) método B e (c) método C.

No método A, as curvas termogravimétricas registradas para as 6 amostras, observaram-se que as amostras iniciam o T_{onset} entre 320 a 339 °C (70_30_cBti_A e PLLA_cBti_A). Prontamente no método B, o T_{onset} mostraram entre 247 (PLLA_cBti_B) a 317 °C (50_50_cBti_B). Logo, no método C, a amostra 80_20_cBti_C apresentou o T_{onset} com 280 °C, já a amostra 50_50_cBti_C com 361 °C.

Entretanto, a $T_{\text{máx}}$ no método A, oscilou entre 355 a 367 °C das amostras 70_30_cBti_A e 80_20_cBti_A. Já, no método B o $T_{\text{máx}}$ evidenciou entre 300 a 355 °C, nas amostras PLLA_cBti_B e 50_50_cBti_B. No método C, o $T_{\text{máx}}$ apontou entre 297 a 332 °C, 80_20_cBti_C e 50_50_cBti_C respectivamente.

A perda de massa (%) relacionada no método A foram próximos e igual a 100 %, com PLLA_cBti_A mostrou a menor perda de massa com 96 %, e a amostra 70_30_cBti_A com 100 % de perda de massa, mostrou boa estabilidade térmica. A perda de massa no método B, demonstraram entre 90 a 99 %, 90_10_cBti_B e 50_50_cBti_B, também apresentou boa estabilidade térmica. Porém as amostras no método C, evidenciaram baixa perda de massa comparada aos outros métodos, entre 81 a 88 %, das amostras 80_20_cBti_C e 50_50_cBti_C.

Observa-se ainda que, todas as amostras aparentaram comportamento semelhante apenas 1 estágio de degradação. Entretanto, as T_{onset} e o $T_{\text{máx}}$ de determinadas para os resultados do método A são superiores os método B e C.

Comparando-se os resultados de ATG para as amostras sem (Figura 14) e com *Bti* é possível verificar que a presença do *Bti* não influenciou a estabilidade térmica das amostras obtidas por meio dos métodos A e C, mas aumentou a estabilidade das amostras obtidas via método B.

A Figura 22, apresenta as micrografias em relação a morfologia e o tamanho das partículas contendo o *Bti* em sua composição polimérica e métodos de obtenção de partículas.

Composições

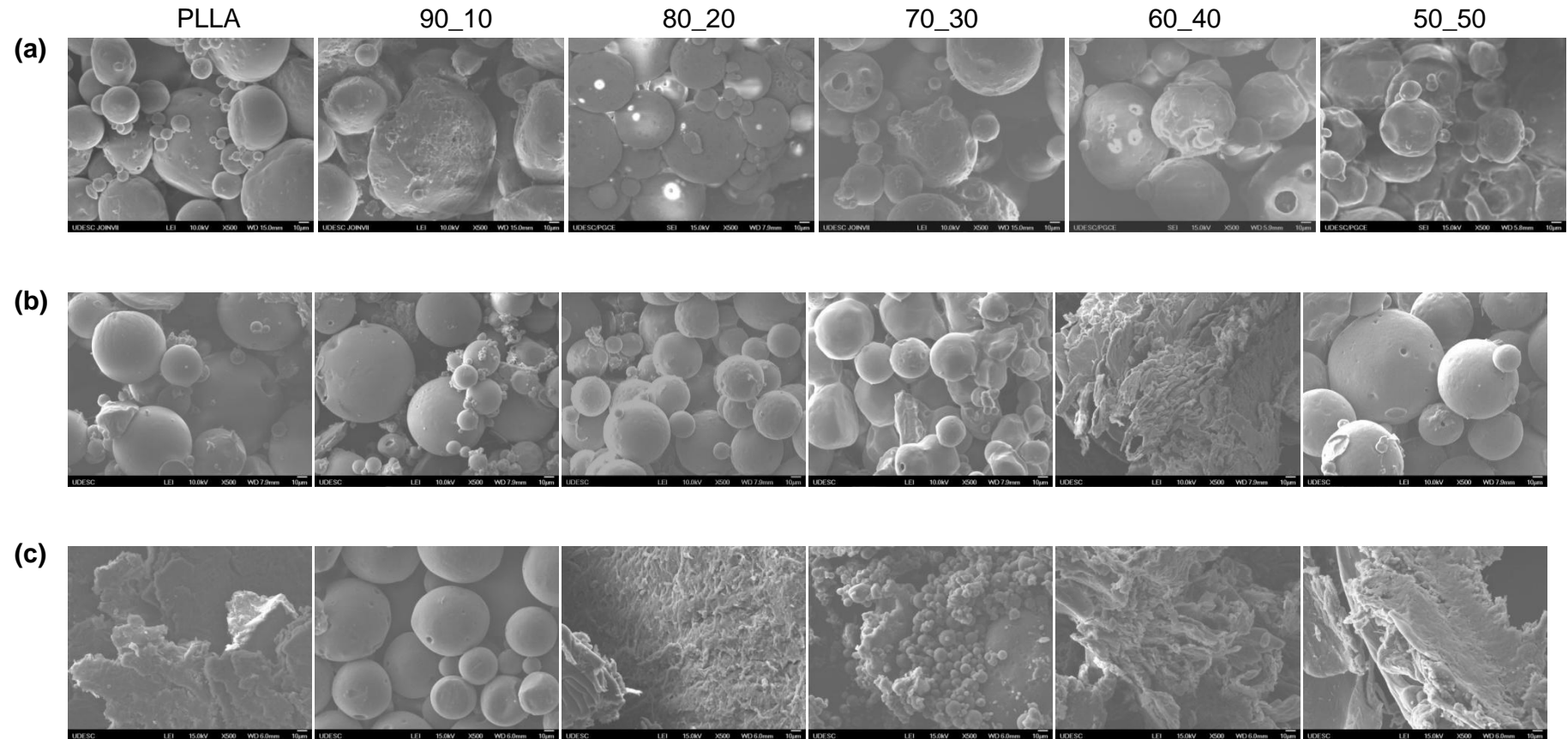


Figura 22. Caracterização morfológica das partículas contendo bioinseticida com ampliação de 500 X, (a) método A; (b) método B e (c) método C.

Analisando o método A, verificou-se que às superfícies das partículas apresentaram lisas com formatos esféricos e houve controle de tamanho das partículas. No método B as partículas também apresentaram formatos esféricos e lisos, porém na amostra 60_40_cBti_B não houve formação de esferas e teve a superfície rugosa. O método C não proporcionou a formação de esferas e a textura apresentou rugosa, exceto a amostra 90_10_cBti_C formou esferas com superfície lisa.

Conforme Ito *et al.*, (2012), está morfologia irregular, pode surgir durante a coagulação das microgotas na emulsão ou pode ser pela evaporação incompleta do solvente, diclorometano, nas partículas. Assim, relatos, que quanto mais homogêneas as partículas, melhor é sua fluidez e a emulsão é mais estável.

Em relação à densidade aparente das partículas, os valores médios de densidade e os respectivos desvios-padrões para as amostras contendo o *Bti*, são apresentados na Figura 23.

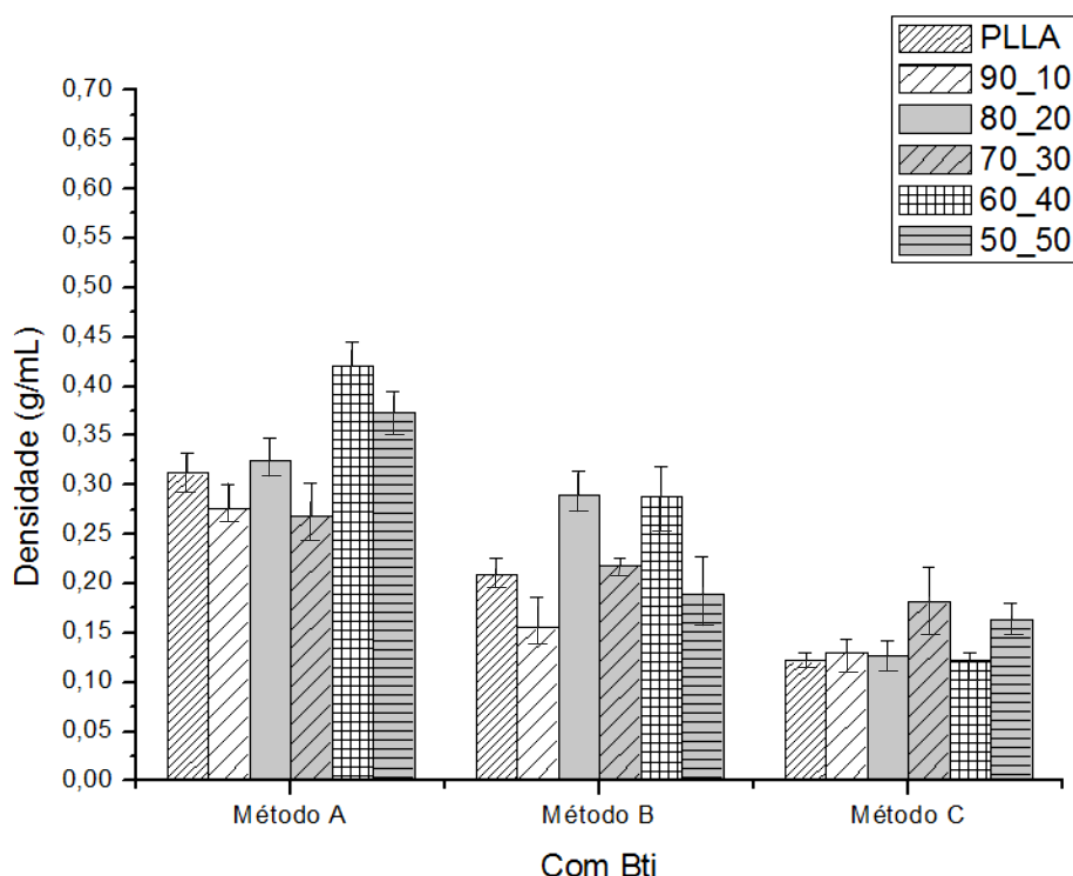


Figura 23. Densidade das partículas com *Bti* e seus respectivos desvios-padrões.

A densidade aparente das partículas do método A, manteve-se entre 0,2899 g/mL e 0,4211 g/mL para as amostras 70_30_cBti_A e 60_40_cBti_A respectivamente. No método B, a densidade aparente das amostras apresentaram 0,1395 g/mL e 0,1953 g/mL nas partículas 60_40_cBti_B e 70_30_cBti_B, simultaneamente. Entretanto, no método C, a densidade aparente das partículas manteve-se entre 0,1220 g/mL (PLLA_cBti_C e 60_40_cBti_C) e 0,1810 g/mL (70_30_cBti_C).

Observou-se que as partículas contendo o *Bti* presente na composição, beneficiou a diminuição da densidade das amostras. As partículas, nos três métodos, apontaram densidade inferior da água, assim, favorece a estabilidade de suspensão para aplicação em superfície de água corrente, beneficiando a flutuação da formulação.

De acordo com análise de variância (ANOVA) com as amostras com *Bti*, considerando o valor de densidade aparente do PLLA como referencia, verificou-se em todas as variáveis testadas no método A as amostras 60_40_cBti_A e 50_50_cBti_A mostraram diferença estatisticamente significativa, $p= 0,0042$ e $p= 0,0220$ respectivamente. E as demais amostras foram estatisticamente iguais.

No método B, as amostras 80_20_cBti_B ($p=0,00983$) e 60_40_cBti_B ($p=0,03068$) evidenciaram diferença estatisticamente significativa, $p= 0,0098$ e $p= 0,0306$ respectivamente. E as outras amostras foram estatisticamente iguais.

No método C, a amostra 50_50_cBti_C apontou diferença estatisticamente significativa, $p= 0,0175$. E as outras variáveis testadas não evidenciaram diferença estatisticamente.

Entretanto comparam-se as densidades aparentes das partículas de PLLA de cada método com *Bti*, verificou-se que os três métodos são diferentes estatisticamente significativos.

A Tabela 08 apresenta uma análise global dos resultados estratificados por método de obtenção das partículas contendo o *Bti*.

Tabela 8. Resultado global dos métodos contendo *Bti*.

Caracterização	Método A	Método B	Método C
Rendimento	Aproximadamente 54 %	Aproximadamente 20 %	Aproximadamente 10 %
Encapsulamento	O <i>Bti</i> foi encapsulado nas partículas, mas apresentou traços de <i>Bti</i> no sobrenadante.	O <i>Bti</i> foi encapsulado nas partículas, não apresentou traços no sobrenadante.	O <i>Bti</i> foi encapsulado nas partículas, não apresentou traços no sobrenadante.
Estabilidade térmica (ATG)	T _{onset} : 320 a 339 °C T _{máx} : 355 a 367 °C	T _{onset} : 247 a 317 °C T _{máx} : 300 a 355 °C	T _{onset} : 280 a 361 °C T _{máx} : 297 a 332 °C
Morfologia	Amostras esféricas, lisas, tamanhos irregulares e porosos.	Amostras esféricas e lisas, exceto a amostra 60_40_cBti_B forma e tamanho irregular.	Amostras com formas e tamanhos irregulares e textura intensamente rugosa, exceto 90_10_cBti_C apresentou esferas lisas.
Densidade aparente (g/mL)	Entre 0,28 a 0,42 g/mL	Entre 0,13 a 0,19 g/mL	Entre 0,12 a 0,18 g/mL

Observou-se para o método A que, embora tenha proporcionado o melhor rendimento dentre os métodos testados, estabilidade térmica, amostras esféricas e densidade aparente inferior a 1,0 g/mL houve incorporação parcial do bioinseticida nas partículas, pois apresentaram traços do *Bti* no sobrenadante. Enquanto que via método B, houve rendimento menor do que método A, boa estabilidade térmica, amostras esféricas, exceto uma amostra, densidade aparente baixa e o destaque para a incorporação do bioinseticida nas partículas. E para o método C, houve boa incorporação do *Bti* nas partículas, baixo rendimento (comparando com as demais), boa estabilidade térmica, e baixa densidade aparente porém a estrutura das amostras ficou comprometida: formas e tamanhos irregulares.

Nesse sentido, tomando a síntese apresentada na Tabela 08 e a percepção de que um processo de produção de partículas o rendimento seja satisfatório, que haja pouca perda do princípio ativo no sobrenadante, entende-se que o método que permitiu um melhor equilíbrio entre essas condições seria o método A.

Diante destes resultados e considerando aqueles obtidos em trabalho anterior (WEIMANN *et al.*, 2012) principalmente no que se refere à densidade, as amostras obtidas neste estudo conseguiram atender melhor um dos critérios necessário para a aplicação em superfície de corpos hídricos. No entanto, ensaios de toxicidade devem ser conduzidos com estas amostras, também para prosseguir com as comparações.

CONCLUSÃO

A partir do conjunto de resultados, verifica-se que foi possível a obtenção de partículas.

Sobre os rendimentos, destaca-se o método A por ter conduzido aos maiores percentuais, e a amostra de composição 80_20_A que atingiu 60%. Os resultados para os métodos usando ultrassom foram inferiores a 20 % independente da composição da amostra e do bioinseticida.

As análises de atividade do *Bti* puro demonstraram que essa não é abalada quando o bioinseticida é submetido aos processos de agitação magnética e ao ultrassom avaliadas junto com as amostras mostram que apenas o método A (agitação magnética) não houve incorporação total nas partículas, que nos método B (usando agitação magnética e sonificação) e método C (usando agitação magnética e sonificação com banho de gelo), apresentaram incorporação nas partículas e que a sonificação não afeta a atividade microbiana do bioinseticida.

As análises de ATG sugerem que a formação da blenda polimérica aumentou a estabilidade térmica, quando comparada com o PLLA e PLGA puro. Há efeito negativo da aplicação de frequência ultrassônica, ou seja, reduziu a estabilidade térmica enquanto que a adição do *Bti*, nas composições, aumentou a estabilidade térmica quando comparada com as composições sem o bioinseticida.

As análises morfológicas das amostras sem *Bti* demonstraram que o método A, formou esferas lisas e os método B e método C não apresentaram esferas e sim textura intensamente rugosas. Na presença e *Bti*, as composições obtidas por meio dos Métodos A e B mostraram-se esferas lisas enquanto que as obtidas via método C apresentaram formas irregulares.

Os resultados de densidade evidenciaram que os três métodos permitiram gerar partículas de baixa densidade que favorecem, portanto a flotabilidade, critério a ser atendido neste estudo. A aplicação do ultrassom reduz a densidade das partículas.

Tendo em vista a proposta de aplicação destas partículas para o setor de agrotóxicos e os critérios definidos para sua seleção e aplicabilidade, e os resultados obtidos, sugere-se a continuidade dos estudos incluindo estudo de atividade sobre as larvas, os bioensaios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJJI, A.; UTRACKI, L.A. Interphase and compatibilization of polymer blends. *Polymer Engineering and Science*, v. 36, n. 12, p. 1574 – 1585, 1996.
- ALSINA, O. D. S.; ROCHA, A. T. T.; SILVA, V. S.; SILVA, O. S. Caracterização física de grânulos de quebra-pedra para uso em leito de jorro. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, Campina Grande, v. 4, n. 1, p.32-37, 2009.
- ALVIM, I. D.; GROSSO, C. R. F. Microparticles obtained by complex coacervation: influence of the type of reticulation and the drying process on the release of the core material. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, n. 4, p. 1069 – 1076, 2010.
- ANGELO, E.A.; VILAS-BÔAS, G.T.; CASTRO-GÓMEZ, R.J.H. *Bacillus thuringiensis*: general characteristics and fermentation. *Ciências Agrárias*, v.31, p.945-958, 2010.
- ARANHA, R.; FERREIRA, A.; GOMES, A. S.; CANTANTE, T.; SOUZA, H. Ultrassons no processo e preservação de alimentos. Disponível em: < http://www.esac.pt/noronha/pga/0910/trabalho_mod2/Ultrassons_manh%C3%A3_word.pdf >. Acesso em: 29 mai. 2014.
- ARONSON, A. I.; SHAI, Y. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS Microbiology Letters*, v. 195 n. 1, p. 01 – 08, 2001.
- ASTM Standard D 6400-99, Standard Specification for Compostable Plastics, 1999.
- BAJPAI, A. K.; GIRI, A. Swelling dynamics of a macromolecular hydrophilic network and evaluation of its potential for controlled release of agrochemicals. *Reactive & Functional Polymers*, v. 53, n. 2 – 3, p. 125 – 141, 2002.
- BAKER, R. Controlled release of biologically active agents. United States: John Wiley & Sons, 1986.
- BANSODE, S. S.; BANARJEC, S. K.; GAIKWAD, D. D.; JADHAV, S. L.; THORAD, R. M. Microencapsulation: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, v.1, n.2, p. 38 – 43, 2010.
- BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 15, n. 1, p. 13-21, 2005.
- BASEDOW, A. M.; EBERT, K. H. Ultrasonic degradation of polymers in solution. *Physical Chemistry Advance in Polymer Science*, v. 22, p. 83 – 148, 1997.

BEACH, R. M.; DEVISETTY, B. N.; MENEDEZ, R. A.; WARRIOR, P. Buffalo Grove, IL (US). Concentrated, water-soluble, granular plant growth regulator formulation and methods for use of same. Int CI^{504/367} US 2006/0003898 A1. 2 set. 2005, 5 jan. 2006. Valent Bio Science Corp.

BECKER, N. Bacterial control of vector-mosquitoes and black flies. *In*: CHARLES, J. F. DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. (Ed.). Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 383 – 398, 2000.

BEZERRA, W. Polímeros. Disponível em: < http://clubedequimica.com.br/Arquivos-aulas/Polimeros_Sinteticos.pdf >. Acesso em: 24 mar. 2014.

BOBROWSKI, V. L.; FIUZA, L. M.; PASQUALI, G.; BOADANESE-ZANETTINI, M. H. *Bacillus thuringiensis* genes: na approach to confer insect resistance to plants. *Ciência Rural*, v. 34, n. 1, p. 843 – 850, 2003.

BRAR, K. S.; TYAGI, R. D.; VALE'RO, J. R.; VERMAN, M. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Process Biochemistry*, v. 41, n. 2, p. 323 – 342, 2006.

BRASILEIRO, J. S. L. Microencapsulação de compost bioactivo: inovação em diferente áreas. Dissertação de mestrado. 71p. Universidade Fernando Pessoa. Porto, 2011.

BRAZEL, C.S. Microencapsulation: offering solutions for the food industry. *Cereal Foods World*, v. 44, n. 6, p. 388 – 393, 1999.

BREGNI, C.; DEGROSSI, J.; GARCIA, R.; LAMAS, M.C.; FIRENSTEIN, R.; YD'AQUINO, M. Alginate microspheres of *Bacillus subtilis*. *Revista Ars Pharmaceutica*, v. 3, p. 245 – 248, 2000.

BUFFO, R.; REINECCIUS, G. Comparison among assorted drying process for the encapsulation of flavors. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 26, p. 58 – 67, 2001.

BULTE, J. W. M.; DOUGLAS, T.; WITWER, B.; ZHANG, S. C.; STRABLE, E.; LEWIS, B. K.; ZYWICKE, H.; MILLER, B.; VAN GELDEREN, P.; MOSKOWITZ, B. M.; DUNCAN, I. D.; FRANK, J. A. Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and in vivo tracking of stem cells. *Nature Biotechnology*, v. 19, n. 12, p. 1141 – 1147, 2001.

BUZZI, V. Microesferas de polissacarídeos por redes poliméricas interpenetrantes (RPI) para o estudo e modulação do perfil de liberação do piroxicam. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos), 2009 – Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, 2009.

CANEVAROLO JUNIOR, S.V. Ciência dos polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros. 3 ed. São Paulo: Artliber, 2010.

CANEVAROLO, S.V. Técnicas de Caracterização de Polímeros. Artliber. São Paulo, 2004.

CARDOSO, J. J. F.; JUNIOR, E. R.; LUCAS, E. F. Obtenção e caracterização de micropartículas de poli(ácido láctico) contendo aditivo químico inibidor de deposição de asfaltenos. 12º CBPol – Congresso Brasileiro de Polímeros, 22 a 26 de setembro de 2013, Florianópolis, SC, Brasil.

CETESB. (2007). Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos. Volume I. Apostila de Treinamento, São Paulo.

CHRISTENSEN B. T. Physical fractionation of soil and organic matter in primary particle size and density separarates. *Advances in Soil Science*, v.20, p. 2-76, 1992.

CREMER, M.J.; MORALES, P.R.D.; OLIVEIRA, T.M.N. de (Org.). Diagnóstico ambiental da Baía da Babitonga. Joinville: UNIVILLE, 2006.

DAL CASTEL, C. Estudo sobre compatibilizantes em nanocompósitos de Polipropileno-Montmorilonita. 2008. Dissertação de Mestrado (Instituto de Química) - UFRGS, Porto Alegre.

DE BARJAC, H. A new subspecies of *Bacillus thuringiensis* very toxic for mosquitoes: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* serotype 14. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, v.286, n. 5, p. 797 – 800, 1978.

DURÁN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação, Artliber Editora Ltda.: São Paulo, 2006.

EDWARDS A. P.; BREMNER J .M. Dispersion of soil particles by sonic vibration. *Journal of Soil Science*, v.18, 47-63, 1967.

ERBETTA, C. D. C.; VIEGAS, C. C. V.; FREITAS, R. F. S.; SOUZA, R. G. Síntese e caracterização térmica e química do copolímero Poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo). *Polímero*, v. 21, n. 5, p. 376 – 382, 2011.

ESSA, S.; RABANEL, J. M.; HILDGEN P. Avaliação do uso de amidos aniônicos hidrolisados como estabilizantes em nanocápsulas poliméricas para formulações tópicas. *Polímeros Ciência e Tecnologia*, v. 23, n. 5, p. 624 – 629, 2013.

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: microencapsulação de ingredientes alimentícios. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 11, n. 2, p. 102 – 112, 2008.

FERREIRA, L. C. S.; MIRANDA, C. S.; GUIMARÃES, D.H.; JOSÉ, N. M. Comportamento térmico de filmes flexíveis de PLA/amido termoplástico. 12º CBPol – Congresso Brasileiro de Polímeros, 22 a 26 de setembro de 2013, Florianópolis, SC, Brasil.

FIUZA, L. M.; SCÜNEMANN, R.; PINTO, L. M. N. ZANETTINI, M. H. B. Two new Brazilian isolates of *Bacillus thuringiensis* toxic to *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Brazilian Journal of Biology*, v. 72, p. 363 –369, 2012.

FRANCHETTI, S. M. M.; MARCONATO, J. C. Polímeros biodegradáveis: uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. *Química Nova*, v. 29, n. 4, p. 811 – 816, 2006.

GAO, X. H.; CUI, Y. Y.; LEVENSON, R. M.; CHUNG, L. W. K.; NIE, S. M. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nature Biotechnology*, v. 22, n. 8, p. 969 – 976, 2004.

GARLOTTA, D. A literature review of poly(lactic acid). *Journal of Polymer and the Environment*, v. 9, n. 2, p. 63 – 84, 2001.

GENRICH, D.A.; BREMNER, J .M. A re-evaluation of the ultrasonic vibration method of dispersing soils. *Soil Science Society of America Proceedings*, v.36, 944-947, 1972.

GOERTZ, H. M. Controlled release technology, agricultural. *In: KIRK-OTTMER, Encyclopedia of Chemical Technology*. 4 ed. CIDADE: John Wiley & Sons, 2000. p. 251 – 274.

GOMES, V. M. A. Encapsulação de ciprofloxacina em nanopartículas de poli(ácido láctico). 2009. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Química Analítica e Controlo de Qualidade) – Universidade de Aveiro, Aveiro.

GUPTA, A.P.; KUMAR, V. New emerging trends in synthetic biodegradable polymers - polylactide: a critique. *European Polym Journal*, v. 43, p. 4053 – 4074, 2007.

HICKEY, A. J.; CROWDER, T. M.; LOUEY, M. D.; ORR, N. A guide to pharmaceutical particulate science, Boca Raton: CRC Press LLC, 2003. p.77-12.

ISO 472, *Plastics – Vocabulary*, 1999.

ITO, F.; FUJIMORI, H.; KAWAKAMI, H.; KANAMURA, K.; MAKINO, K. Technique to encapsulate a low molecular weight hydrophilic drug in biodegradable polymer particles in a liquid-liquid system. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and engineering aspects*, v. 384, n. 1 – 3, p. 368 – 373, 2011.

_____. Optimized preparation of biodegradable polymer particles encapsulating low-molecular-weight hydrophilic drugs. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and engineering aspects*, v. 402, n. 3, p. 29 – 36, 2012.

_____. Preparation of (hydrophilic) INZ/PLGA particles (microcapsules) employing a unique frozen water phase – investigation of optimal formulation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 443, n. 20, p. 356 – 362, 2014.

ITO, F.; FUJIMORI, H.; MAKINO, K. Incorporation of water-soluble drugs in PLGA microspheres. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 54, n. 2, p. 173 – 178, 2007.

JAHNO, V.D. Síntese e caracterização do Poli(L-ácido láctico) para uso como biomaterial. 2005. Dissertação de mestrado (Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais) – UFRG, Porto Alegre.

JAIN, R.; SHAH, N. H.; MALICH, A. W.; RHODES, C. T. Controlled drug delivery by biodegradable poly (ester) devices: different preparative approaches. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 24, n. 8, p. 703 – 723, 1998.

LEWIS, D. H. Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers. New York: Marcel Dekker. 1990

LI, X.; JASTI, B. R. Design of controlled release drug delivery systems. United States: Mcgraw-hill, 2005.

LUCAS, E.F.; SOARES, B.G.; MONTEIRO, E. Caracterização de polímeros: determinação de peso molecular e análises térmicas. 1 ed. Rio de Janeiro: E-papers, 2001.

MAAGD, R.A.da; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetic*, v.17, n. 4, p. 193 – 199, 2001.

MANO, E. B.; MENDES, L. C. Introdução a Polímeros. 2. ed. São Paulo: Edgar Blücher. 1999. 192p.

MARTIN DEL VALLE, E. M. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemical*, v. 39, n. 9, p. 1033 – 1046, 2004.

MARTINA, M. C. Introducción a la dermofarmacia y a la cosmología. Zaragoza, S.A: Editoria Acribia. 2005. p. 384.

MARTINS, K. F.; MESSIAS, A. D.; MARCATTO, P. D.; DURÁN, N.; DUEK, E. A. R. Obtenção e caracterização de microesferas do copolímero PLDLA contendo paclitaxel. 7º COLAOB – Congresso Latino Americano de Órgãos Artificial e Biomateriais, 22 a 25 de agosto de 2012, Natal, RN, Brasil.

McCARTHY, S. P. *Plastics and the environment*. Canada: John Wiley & Sons, Inc, 2005.

MEDEIROS, G. R. Modelagem matemática da liberação de compostos hidrofílicos incorporados por dupla emulsão em micropartículas de PLGA. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), 2013 – Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis.

MOTHÉ, C.G., AZEVEDO, A.D.de. *Análise térmica de materiais*. São Paulo: Artiber, 2009. p. 221.

MOTTA, A. C.; DUEK, E. A. R. Síntese, caracterização e degradação “*in vitro*” do poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico). *Revista Matéria*, v.11, n. 3, p. 340 – 350, 2006.

MOTTA, A.C. Síntese e Caracterização do poli(L-ácido láctico)-PLLA e Poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico) – PLGA e degradação “*in vitro*”. 2002. Dissertação de Mestrado (Engenharia Mecânica) - UNICAMP, Campinas.

NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*, v. 32, n. 8, p. 762 – 798, 2007.

NESTERENKO, A.; ALRIC, I.; SILVESTRE, F.; DURRIEU, V. Vegetable proteins in microencapsulation: a review of recent interventions and their effectiveness. *Industrial Crops and Products*, London, v. 42, n. 1, p. 469 – 479, 2013.

NETZ, D.J.A. Desenvolvimento, caracterização e avaliação *in vitro* e *in vivo* de um sistema polimérico implantável contendo 17 β -estradiol. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), 2004 – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo.

OLIVEIRA, S. S. A. M. Preparação e caracterização *in vitro* de micropartículas de heparina fracionada potencialmente aplicáveis ao tratamento da trombose venosa profunda. 2009. Dissertação de mestrado (Ciências Farmacêuticas), USP – Ribeirão Preto, SP.

PAL, R. Techniques for measuring the composition (oil and water content) of emulsion – a state of the art review. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 84, p. 141-193, 1999

PAOLI, M. A. D. Degradação e estabilização de polímeros. São Paulo, SP: Artiber, 2009. p. 286.

PAULA, H. C. B. de, OLIVEIRA, E. F. de, ABREU, F. O. M. S. Esferas (beads) de alginato como agente encapsulante de óleo de croton zehntneri Paz et Hoff. *Polímeros [online]*, v. 20, n.1, p. 112 – 120, 2010.

POLETTI, F. S.; FIEL, L. A.; DONIDA, B.; RE, M. I.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN,

A. R. Controlling the size of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) nanoparticles prepared by emulsification–diffusion technique using ethanol as surface agent. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Engineer Aspects*, v. 324, p. 105–112, 2008.

PONTES, R. G. M. S. Identificação, caracterização e disponibilização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* eficazes ao controle de lepidópteros desfoliadores da cultura do algodão. Relatório final – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). p. 46. 2003.

PRICE, G. J. Recent developments in sonochemical polymerization. *Ultrasonics Sonochemistry*. v. 10, p. 277 – 283, 2002.

RAJEEV, P.; MADAN, M. S.; JAYARAJAN, K. Revisiting Kirkpatrick’s model – an evaluation of an academic training course. *Current Science*, v. 96, n. 2, p. 272 – 276, 2009.

RASAL, R. M.; JANORKAR, A. V.; HIRT, D. E. Poly (lactic acid) modifications. *Progress in Polymer Science*, v. 35, n.3, p. 338 – 356, 2010.

RINALDE, A. P. T.; MAZERA, S. K.; PEZZINI, B. R.; ZÉTOLA, M.; BAZZO, G. C. Preparo e caracterização de acetobutirato de celulose e poli(3-hidroxibutirato) contendo piroxicam. *Acta Scientiarum Health Sciences*, Maringá, v. 31, n. 1, p. 51 – 56, 2009.

RODRIGUES, A. P.; HIRSCH, D.; FIGUEIREDO, H. C. P.; LOGATO, P. V. R.; MORAES, A. M. Production and characterisation of alginate microparticles incorporating *Aeromonas hydrophila* designed for fish oral vaccination. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 638 – 643, 2006.

ROSENBERG, M.; KOPELMAN, I. J.; TALMON, Y. Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 38, n. 5, p. 1288 – 1294, 1990.

ROSSI, J.R. *Bacillus thuringiensis* var. *insraelensis* SPS1: Caracterização. Dissertação (Mestrado em Agronomia), UNESP, Jaboticabal – São Paulo, 2007.

SALAGER, J. L. Formulación, composición y fabricación de emulsions para obtener las propiedades deseadas. Disponível em: <<http://www.firp.ula.ve/archivos/cuadernos/S747B.pdf>>. Acesso em: 21 mar. 2014.

SALIBA, J. B. Sistemas biodegradáveis de administração intra-ocular contendo ciclosporina (a) para tratamento da uveíte posterior. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), 2007 – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, – UFMG, Belo Horizonte.

SANTOS, F. G. Preparação de micro/nanopartículas de poliuretano biodegradável carregados de óleo de açaí e α -tocoferasol. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais), 2014 – Química industrial, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRS, Porto Alegre.

SANTOS, F.P. dos; LOPES, J. Desenvolvimento de nova metodologia para aplicação de bioinseticidas no controle de borrachudos (Diptera: Simuliidae) em ribeirões com fluxo de água irregular. *Ciências Agrárias*, v.31, n. 4, p. 1017 – 1030, 2010.

SANTOS, T. A. O. Peptidases e lipases produzidas pelo fungo *Fusarium oxysporum*: caracterização e microencapsulação por *spray dryer*. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), 2012 – Faculdade de ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – USP, Ribeirão Preto.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration. *Química Nova* [online], v. 26, n. 5, p. 726 – 737, 2003.

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteína: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 39, n. 1, p. 1 – 9, 2003.

SILVA, M. Alternativas para a produção de bioinseticida *Bti*: uso do processo semicontínuo e do processo em estado sólido. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), 2007 – Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis.

SIMANKE, A.G. Síntese e caracterização de ionômeros obtidos a partir de copolímeros estatísticos e em bloco de isopreno e estireno. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), 1995 – Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRS, 1995.

SINHA, V. R.; SINGLA, A. K.; WADHAWAN, S.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; BANSAL, K.; DHAWAN, S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drug. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 274, p.1 – 33, 2004.

SHAHIDI, F. & HAN, X.Q. Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 6, p. 501 – 547, 1993.

SOUZA, P. M. S.; LOBO, F. A.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F. Desenvolvimento de nanocápsulas de poli- ϵ -caprolactona contendo o herbicida atrazina. *Química Nova* [online], v. 35, n.1, p. 132 – 137, 2012.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. *Health and Environment Journal*, v. 7, n. 2, p. 12 – 20, 2006.

TSUJI, K. Microencapsulation of pesticides and their improved handling safety. *Journal of Microencapsulations*, v. 18, n. 2, p. 137 – 147, 2001.

VENKATESAN, P.; MANAVALAN, R.; VALLIAPPAN, K. Microencapsulation: a vital technique in novel drug delivery system. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, Chandigarh, v. 1, n. 4, p. 26 – 35, 2009.

VILAS-BÔAS, G.T.; PERUCA, A.P.S.; ARANTES, O.M.N. Biology and toxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. *Canadian Journal of Microbiology*. v.53, n. 6, p. 673 – 687, 2007.

VICENTE, J. A. Materiais plásticos de engenharia e suas aplicações (Poliamida e Poliacetil). Monografia (Curso de Produção de Plásticos), 2009 – Faculdade de Tecnologia da Zona Leste – FATEC ZL, São Paulo – SP.

WAG, J.; LIU, W.; TU, Q.; SONG, N.; ZHANG, Y.; NIE, N. A comparative in vitro evaluation of self-assembled PTX-PLA and PTX-MPEG-PLA nanoparticles. *Nanoscale Resarch Letters*, v. 301, p. 01 – 08, 2013.

WEIMANN, G. L.; BUTZKE, D.; SILVA, D. A. K. Determinação do teor de *Bti* em micropartículas de ALG/CMC e delineamento do perfil de liberação do bioinseticida. 11º CBPol – Congresso Brasileiro de Polímeros, 16 a 20 de outubro de 2010, Campos do Jordão, SP, Brasil.

WEIMANN, G. L.; SILVA, D. A. K.; BORDIN, P. C. Caracterização de formulação de base polimérica para retenção e fotoproteção da bactéria *Bacillus thuringiensis insraelensis (Bti)*. 20º CBECIMat - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 04 a 08 de Novembro de 2012, Joinville, SC, Brasil.

ZANETTI, B. G.; SOLDI, V.; LEMOS-SENNA, E. Efeito da adição de polietilenoglicóis nas formulações de microesferas de acetobutirato de celulose sobre a eficiência de encapsulação da carbamazepina e morfologia das partículas. *Brasiliam Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 38, n. 2, p. 229 – 256, 2002.

APÊNDICE 01 – Identificação da amostra conforme a composição e método.

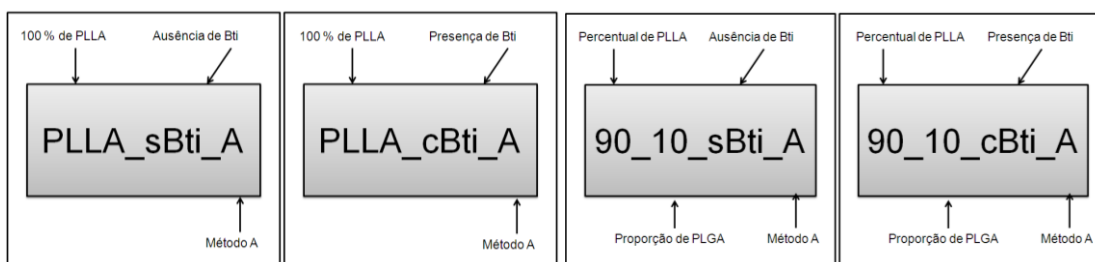


Figura 01. Identificação da composição das amostras no método A.

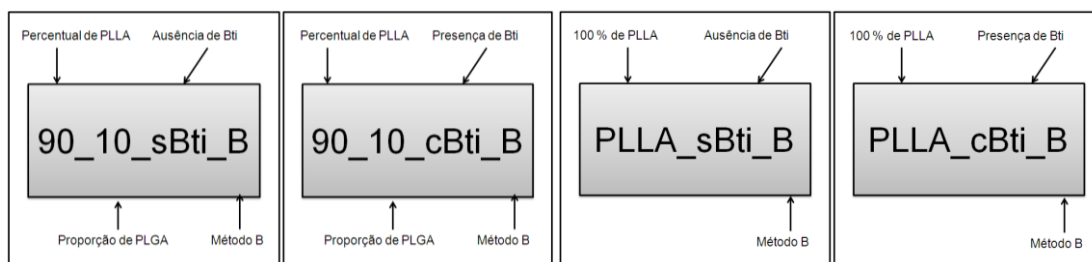


Figura 02. Identificação da composição das amostras no método B.

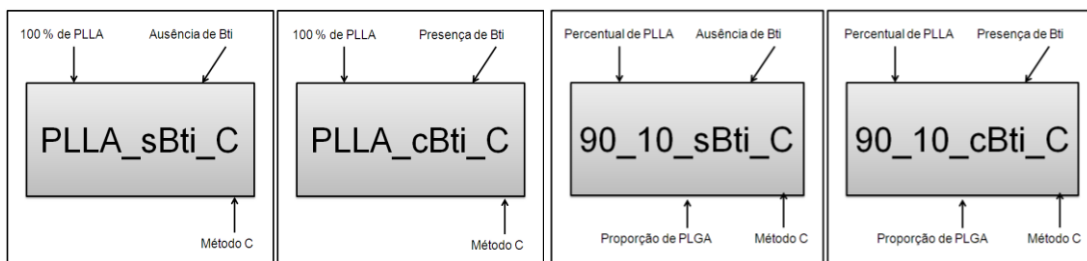


Figura 03. Identificação da composição das amostras no método C.

APÊNDICE 02 – Dados da análise de ATG do polímero (PLLA) e co-polímero (PLGA).

Tabela 01. Dados da análise de ATG do polímero (PLLA) e co-polímero (PLGA).

Polímero	T _{onset} (°C)	T _{máx} (°C)	% perda de massa
PLLA	346,92	367,68	92,00
PLGA 75-25	268,44	301,12	99,93

APÊNDICE 03 – Dados da análise de ATG das partículas sem *Bti*

Tabela 01. Dados da análise de ATG das partículas do método A.

Amostras	T _{onset} (°C)	T _{máx} (°C)	% perda de massa
PLLA_sBti_A	336,84	364,87	96,14
90_10_sBti_A	340,50	366,89	97,35
80_20_sBti_A	340,80	365,60	97,65
70_30_sBti_A	330,72	363,55	96,42
60_40_sBti_A	326,94	360,67	99,70
50_50_sBti_A	324,48	361,75	97,92

Tabela 02. Dados da análise de ATG das partículas método B.

Amostras	T _{onset} (°C)	T _{máx} (°C)	% perda de massa
PLLA_sBti_B	280,64	297,37	93,64
90_10_sBti_B	300,97	361,39	92,39
80_20_sBti_B	298,80	322,17	86,56
70_30_sBti_B	297,24	319,15	96,76
60_40_sBti_B	324,71	305,84	90,09
50_50_sBti_B	302,85	341,62	89,86

Tabela 03. Dados da análise de ATG das partículas método C.

Amostras	T _{onset} (°C)	T _{máx} (°C)	% perda de massa
PLLA_sBti_C	281,73	301,17	66,09
90_10_sBti_C	284,56	303,56	71,13
80_20_sBti_C	279,38	297,76	79,36
70_30_sBti_C	324,58	305,36	82,47
60_40_sBti_C	290,61	309,94	78,51
50_50_sBti_C	281,76	298,89	75,12

APÊNDICE 04 – Dados da análise de ATG das partículas com *Bti*

Tabela 01. Dados da análise de ATG das partículas com *Bti*

Amostras	T _{onset} (°C)	T _{máx} (°C)	% perda de massa
PLLA_cBti_A	339,17	364,83	96,75
90_10_cBti_A	335,03	362,81	99,53
80_20_cBti_A	338,33	367,05	97,89
70_30_cBti_A	320,28	355,15	100
60_40_cBti_A	334,45	364,58	99,40
50_50_cBti_A	332,10	364,55	97,62

Tabela 02. Dados da análise de ATG das partículas com *Bti*

Amostras	T _{onset} (°C)	T _{máx} (°C)	% perda de massa
PLLA_cBti_B	247,73	300,1	93,12
90_10_cBti_B	292,59	313,2	90,01
80_20_cBti_B	306,02	342,83	95,52
70_30_cBti_B	302,4	336,89	93,12
60_40_cBti_B	314,6	354,55	94,78
50_50_cBti_B	317,13	355,17	99,66

Tabela 07. Dados da análise de ATG das partículas com *Bti*.

Amostras	Tonset (°C)	Tmáx (°C)	% perda de massa
PLLA_cBti_C	288,98	306,11	81,35
90_10_cBti_C	284,12	302,07	75,75
80_20_cBti_C	280,17	297,38	81,1
70_30_cBti_C	312,85	299,70	81,66
60_40_cBti_C	292,2	331,67	62,94
50_50_cBti_C	332,63	361,21	88,84

ANEXO 01 – Preparação do meio LB + Agar

Tabela 01. Ingredientes e concentrações destes para a preparação do meio LB + Agar

Ingredientes	Concentração (g/L)
Agar-agar puríssimo	20
Cloreto de sódio	10
Extrato de levedura	05
Peptona de carne	10