



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102020022603-7 A2



(22) Data do Depósito: 05/11/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 17/05/2022

(54) **Título:** MÉTODO DE PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCARREADORES PROTÉICOS PARA LIBERAÇÃO DE COMPOSTOS BOTÂNICOS POR ESTÍMULOS AMBIENTAIS E RESPECTIVAS FORMULAÇÕES

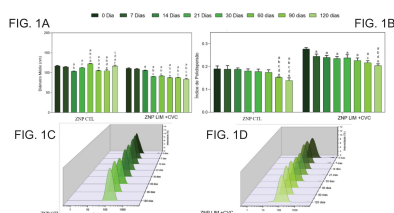
(51) **Int. Cl.:** A01N 49/00; A01N 31/02; A01N 27/00; A01N 35/02; A01N 65/26; (...).

(52) **CPC:** A01N 49/00; A01N 31/02; A01N 27/00; A01N 35/02; A01N 65/26; (...).

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO; UNIVERSIDADE DE SOROCABA - UNISO; FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC - UFABC.

(72) **Inventor(es):** LEONARDO FERNANDES FRACETO.; JHONES LUIZ DE OLIVEIRA; LUCAS BRAGANÇA DE CARVALHO; MARCELA CANDIDO CAMARA; PATRÍCIA LUIZA DE FREITAS PROENÇA; RENATA APARECIDA MONTEIRO; RENATA DE LIMA; MARIANA GUILGER CASAGRANDE; ESTEFÂNIA VANGELIE RAMOS CAMPOS.

(57) **Resumo:** MÉTODO DE PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCARREADORES PROTÉICOS PARA LIBERAÇÃO DE COMPOSTOS BOTÂNICOS POR ESTÍMULOS AMBIENTAIS E RESPECTIVAS FORMULAÇÕES. Trata-se de método de preparo e caracterização de nanocarreadores proteicos permitindo a aplicação agrícola no controle específico de uma determinada praga, reduzindo perdas e efeitos adversos para organismos não-alvo; dito método de preparo e caracterização das nanopartículas de zeína que contém mistura de diferentes compostos botânicos como geraniol, linalol, limoneno, cinamaldeído e nim e suas associações serem suscetíveis a ação enzimática da enzima tripsina.



**“MÉTODO DE PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCARREADORES PROTEÍCOS PARA LIBERAÇÃO DE COMPOSTOS BOTÂNICOS POR ESTÍMULOS AMBIENTAIS E RESPECTIVAS FORMULAÇÕES”.**

**CAMPO TÉCNICO DA INVENÇÃO**

**[001]** A presente patente de invenção trata de método de preparo e caracterização de nanocarreadores proteicos para liberação de compostos botânicos por estímulos ambientais como a degradação enzimática e respectivas formulações permitindo a aplicação agrícola no controle específico de uma determinada praga, reduzindo perdas e efeitos adversos para organismos não-alvo. O preparo e caracterização de nanopartículas de zeína contendo a mistura de diferentes compostos botânicos como geraniol, linalol, limoneno, cinamaldeído e nim e suas associações compõe o presente invento por se mostrarem suscetíveis a ação enzimática da enzima tripsina aliado ao fato desses sistemas aumentarem a estabilidade e eficácia dos compostos naturais e, também, realizarem a liberação controlada por estímulo enzimático.

**HISTÓRICO DA INVENÇÃO**

**[002]** O uso excessivo dos agrotóxicos em sistemas de produção intensivos, levam ao aumento de concentrações residuais e da deriva dos agrotóxicos durante o processo de aplicação dos produtos, gerando assim grandes problemas ambientais, aumento dos custos de produção, perdas de áreas produtivas e também danos à saúde humana (ALBUQUERQUE et al., 2016).

**[003]** Neste contexto, há a necessidade de uma nova revolução na agricultura por meio da implementação da agricultura sustentável (CAIRA; FERRANTI, 2016). Neste modelo agrícola é priorizado a diminuição do uso de agrotóxicos e o emprego de métodos menos tóxicos a organismos não alvo para o controle de pragas, como por exemplo o uso de compostos naturais, dentro do qual podemos destacar o uso dos pesticidas botânicos (CAMPOS et al., 2016; DAR et al., 2014) e ainda combinação de pesticidas e inimigos naturais ou também controle biológico através de microrganismos (CAMPOS et al., 2018).

**[004]** Em especial, os pesticidas botânicos são produzidos através do metabolismo secundário das plantas, sendo importante na defesa contra patógenos e pragas.

Apresentam, portanto, várias atividades biológicas incluindo toxicidade para pragas agrícolas (ISMAN, 2017). Visando o aumento da atividade biológica e diminuição de resistência a combinação de compostos isolados de diferentes plantas mostra-se uma importante estratégia (CHEN et al., 2018). No entanto, apesar de suas vantagens frente os inseticidas sintéticos, esses compostos naturais apresentam baixa estabilidade o que dificulta a sua utilização efetiva em aplicações agrícolas (PANT; DUBEY; PATANJALI, 2016).

**[005]** A encapsulação de compostos botânicos tem sido uma importante estratégia para melhorar a estabilidade e eficiência desses compostos naturais. Com o avanço das pesquisas na área, foi possível também o desenvolvimento de sistemas “inteligentes” que ao receberem estímulos apresentam uma resposta ativa e liberam a molécula carregada para o meio circundante (KAMALY et al., 2016). Dentre esses estímulos empregados para induzir a liberação estão: as alterações de parâmetros bioquímicos, como por exemplo a modulação da concentração e/ou a presença de uma enzima, pH, temperatura, luz entre outros. A utilização desse tipo de sistemas é uma importante estratégia a fim de aumentar a efetividade, seletividade, além de um controle espaço-temporal da liberação de compostos ativos (CAMARA et al., 2019). Esses sistemas podem ser produzidos por diversas matrizes, a exemplo da zeína (DE OLIVEIRA et al., 2014).

#### **ANÁLISE DO ESTADO DA TÉCNICA**

**[006]** Em pesquisa realizada em bancos de dados especializados foram encontrados documentos referentes à encapsulação de compostos botânicos, tal como, apresentado no documento de nº. US20150004102 que trata do preparo e caracterização de uma formulação baseada em nanopartículas de zeína para a encapsulação de compostos bioativos, podendo também ser utilizada para pesticidas botânicos. No método descrito pelos inventores é realizado a mistura de zeína e propilenoglicol a fim de produzir uma formulação estável para diversas aplicações. Supracitado documento não revela sobre a liberação mediada através de estímulo.

**[007]** O documento de nº. CA2805581 descreve, também, um método para a obtenção de nanopartículas de zeína, baseado na utilização de tensoativos como estabilizantes.

Os inventores descrevem a capacidade de encapsulação de diferentes compostos biologicamente ativos sendo tanto solúveis em água ou lipossolúveis. Na presente invenção, são apresentados o preparo e caracterização de mistura de compostos botânicos encapsulados em nanopartículas de zeína as quais são responsivas a enzima tripsina. São encontradas inúmeros documento como de nº. CA3022928A1, US20180092845A1, EP3003281B1 e US9539338 que descrevem o desenvolvimento de nanopartículas responsivas a diferentes estímulos, quais sejam, enzimático, pH, temperatura entre outros.

**[008]** O documento de nº. CN103813786A descreve o preparo de nanopartículas a base de zeína para aplicações biomédicas. Os inventores também descrevem também a possibilidade de resposta mediada a diferentes estímulos pelo sistema produzido, podendo ser para liberação mais específicas dos ativos e direcionamento no tratamento de tumores, no entanto, não com o foco para controle de pragas em agricultura.

**[009]** O documento de nº. CA3022928 se refere a métodos e produtos associados com medições de atividade de protease in vitro e in vivo e perfil de enzima. Alguns aspectos da presente divulgação se referem à medição da atividade de protease acionada remotamente. Em particular, a divulgação se refere a métodos de processamento in vivo de moléculas exógenas, seguido pela detecção de moléculas de assinatura como representativas da presença ou ausência de enzimas ativas associadas a doenças ou condições. A divulgação também se refere a produtos, kits e bancos de dados para uso nos métodos da divulgação.

**[010]** Em comparação com o estado da arte aqui mencionado a inventividade da presente proposta encontra-se nas misturas de diferentes compostos botânicos como geraniol, linalol, limoneno, cinamaldeído e nim e suas associações por se mostraram suscetíveis a ação enzimática da enzima tripsina aliado ao fato desses sistemas aumentarem a estabilidade e eficácia dos compostos naturais e também realizarem a liberação controlada por estímulo enzimático.

#### **OBJETIVOS DA INVENÇÃO**

**[011]** A presente invenção tem por objetivo o preparo desses sistemas para aumentar a estabilidade e eficácia dos compostos naturais e também realizar a liberação

controlada por estímulo enzimático. Ademais a presente invenção abre caminho para aumentar a seletividade e controle espaço-temporal da liberação dos ativos para o manejo mais eficiente e sustentável de pragas agrícolas.

**[012]** Os sistemas produzidos na presente invenção contêm a misturas de diferentes compostos botânicos como geraniol, linalol, limoneno, cinamaldeído e nim e suas associações e mostram-se suscetíveis a ação enzimática da enzima tripsina, a qual está também presente no midgut de insetos.

**[013]** A presente invenção apresenta vantagens em relação as formulações convencionais, uma vez que aumenta a eficácia dos produtos naturais. Além de fornecer uma formulação que é responsiva a estímulo enzimática, fazendo com que ocorra uma liberação mais específica contribuindo para redução no impacto ambiental.

#### **DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

**[014]** A complementar a presente descrição de modo a obter uma melhor compreensão das características do presente invento e de acordo com uma preferencial realização prática do mesmo, acompanha a descrição, em anexo, um conjunto de figuras, onde, de maneira exemplificada, embora não limitativa, se representou:

**[015]** as figuras revelam gráficos onde: figura 1A revela Caracterização do diâmetro médio das nanopartículas sem (NP CTL) e com os ativos (NP LIM + CVC); figura 1B mostra índice de polidispersão das nanopartículas NP CTL E NP LIM + CVC ambos em função do tempo de armazenamento. Variações significativas entre os grupos são representados como: a – comparação com o tempo zero, b – comparação com 7 dias, c- comparação com 14 dias, d – comparação com 21 dias, e – comparação com 30 dias após esse período não houve variação significativa. Os valores representam média de três determinações. Para os gráficos figura 1C e figura 1D representam a intensidade do tamanho em relação ao tempo de armazenamento de 0 a 120 dias para ambas (NP CTL e NP LIM + CVC). Foi considerado significância de  $p < 0,05$  (ANOVA);

**[016]** as figuras mostram gráficos da distribuição de tamanho para as formulações de nanopartículas contendo a mistura de compostos botânicos onde a figura 2A Controle e figura 2B Nim+LNL após 120 dias, e figura 2C GRL+CND após 60 dias, analisados pelo DLS;

**[017]** as figuras revelam gráficos da caracterização das nanopartículas de zeína controle (NP CTL) e carregadas com os ativos limoneno e carvacrol (NP LIM + CVC), sendo: figura 3A Análise de distribuição de tamanho pela técnica de NTA; figura 3B Análise de concentração de partículas por NTA; figura 3C Análise de potencial zeta por microeletroforese; figura 3D Análise de pH e figura 3E Análise de eficiência de encapsulação. Variações significativas entre os grupos são representados como: a – comparação com o tempo zero, b – comparação com 7 dias, c- comparação com 14 dias, d – comparação com 21 dias, e – comparação com 30 dias após esse período não houve variação significativa. Os valores representam média de três determinações. Foi considerado significância de  $p < 0,05$  (ANOVA);

**[018]** as figuras mostram gráficos da caracterização das nanopartículas de zeína controle e carregadas com a mistura dos ativos botânicos nim+linalol e geraniol+cinamaldeído, sendo: figura 4A Análise do potencial zeta; figura 4B Análise do índice de polidispersão; figura 4C Análise da concentração de partículas pela técnica de NTA;

**[019]** as figuras ilustram a micrografia das nanopartículas de zeína com LIM + CVC, realizadas pelo AFM onde figura 5A imagem topográfica e a figura 5B imagem em 3D das nanopartículas e figura 5C gráfico de tamanho médio das nanopartículas, tratado pelo *software Gwyddion*;

**[020]** a figura mostra a micrografia das nanopartículas de zeína com Nim + LNL e GRL+CND, realizadas pelo AFM onde a figura 6A revela a imagem topográfica da formulação de Nim+LNL; figura 6B imagem topográfica da formulação de GRL+CND; figura 6C gráfico de tamanho médio das nanopartículas contendo Nim+LNL e figura 6D gráfico de tamanho médio das nanopartículas contendo GRL+CND, tratado pelo *software Gwyddion*;

**[021]** a figura 7 ilustra gráficos de espectros de infravermelho para as amostras de zeína, pluronic F-68, óleo essencial de carvacrol (CVC), óleo essencial de limoneno (LIM), nanopartículas controle (NP CTL) e nanopartículas carregadas com limoneno e carvacrol (NP LIM+ CVC);

**[022]** a figura 8 representa gráficos de termogramas de Calorimetria Diferencial

Exploratória para o surfactante Pluronic, Zeína pura, NP CTL e NP LIM + CVC;

**[023]** a figura 9 ilustra imagens fotográficas de vasos com as plantas de feijão nos tratamentos onde: (A) Pluronic, (B) Água, (C) Zeína, (D) Plantas tratadas com NP CTL; D-1 : 0,25 µg/mL; D-2 1,25 µg/mL; D-3 : a 2,5 µg/mL; D-4: 3,75 µg/mL; D-5: 5 µg/mL. (E) Plantas tratadas com NP LIM + CVC E-1 0,25 µg/mL; E-2: 1,25 µg/mL; E-3: a 2,5 µg/mL; E-4: a 3,75 µg/mL; E-5: 5 µg/mL. Considerando a significância de  $p < 0,05$  (ANOVA);

**[024]** a figura 10 mostra gráfico das medições de feijão da parte aérea e da raiz das plântulas. Considerando a significância de  $p < 0,05$  (ANOVA);

**[025]** as figuras revelam gráficos onde figura 11A Análise de clorofila 'a'; figura 11B Análise clorofila 'b'; figura 11C Carotenóides em plantas de feijão. Foram realizadas análises de significância através da ANOVA  $p > 0,5$  %;

**[026]** as figuras mostram gráficos da avaliação da fitotoxicidade pós-emergente em feijão tratados com nanoformulações sem ativo (CTL) e com Zeína/Nim+LNL em diferentes concentrações. Em figura 12A estão representados o comprimento do caule e raiz, figura 12B massa seca das plantas, figura 12C teor de clorofila A, B e carotenoides, e em figura 12D comparação das plantas tratadas com nanopartículas de zeína sem ativo (CTL) e tratadas com Nim+LNL. Os dados foram submetidos a análise de variância (one-way ANOVA) com pós teste de Duncan, onde foi considerado nível de significância  $p < 0,005$ . \* indicam diferença significativa relativo ao tratamento água;

**[027]** a figura 13 mostra um gráfico do efeito de diferentes pH na atividade da tripsina em temperatura de 37°C;

**[028]** as figuras representam gráficos onde: figura 14A Análise do tamanho das NP LIM + CVC, figura 14B Polidispersão das NP LIM + CVC figura 14C Potencial zeta das NP LIM + CVC pela técnica de DLS figura 14D Análise de tamanho e concentração das NP LIM + CVC através da técnica de NTA (para ambos gráficos). Análises em função do tempo de contato com a enzima, sem adição e com a enzima nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 minutos;

**[029]** a figura 15 ilustra imagem fotográfica de formulação baseada em nanopartículas de zeína expostas à enzima tripsina e monitoradas por um período de 2 horas, seguida de curvas de absorvância obtidas para as formulações produzidas com 20% de zeína

marcada com Fluoresceína;

**[030]** as figuras revelam gráficos da análise da degradação das nanopartículas contendo a mistura dos compostos linalol e nim pela enzima tripsina, sendo figura 16A Absorção da fluoresceína e figura 16B Concentração das nanopartículas analisado por NTA;

**[031]** a figura 17 compreende SDS-PAGE em gel poliacrilamida, iniciando com o marcador de peso molecular seguindo com as formulações: Tripsina; zeína; NP LIM + CVC (sem a enzima); formulação de NP LIM+CVC + tripsina incubada nos tempos 0; 15; 30; 60 e 120 minutos.

### **DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO**

**[032]** Com referência aos desenhos ilustrados, a presente patente de invenção se refere à “MÉTODO DE PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCARREADORES PROTEÍCOS PARA LIBERAÇÃO DE COMPOSTOS BOTÂNICOS POR ESTÍMULOS AMBIENTAIS E RESPECTIVAS FORMULAÇÕES”, mais precisamente trata-se de método de preparo e caracterização de nanocarreadores proteícos permitindo a aplicação agrícola no controle específico de uma determinada praga, reduzindo perdas e efeitos adversos para organismos não-alvo.

**[033]** Segundo a presente invenção, o método de preparo e caracterização das nanopartículas de zeína que contém mistura de diferentes compostos botânicos como geraniol, linalol, limoneno, cinamaldeído e nim e suas associações são suscetíveis a ação enzimática da enzima tripsina aumentando a seletividade e controle espaço-temporal da liberação dos ativos para o manejo mais eficiente e sustentável de pragas agrícolas.

**[034]** Dito método de preparo das nanopartículas de zeína apresenta as seguintes etapas:

- i) As nanopartículas de zeína são preparadas pelo método de precipitação por antissolvente descrito por Hu e Mc Clements (2014). A zeína (2% m/v) é dissolvida overnight (durante o período de 24 horas) numa solução hidroetanólica (85:15, v/v);
- ii) Na sequência essa solução, é submetida a centrifugação à 4500 rpm por 30 minutos, seguido de tratamento térmico a 75°C por 15 minutos e filtração em filtros de seringa (0,45 µm - Millipore);



- iii) Separadamente é preparada uma solução aquosa de *Pluronic* F-68 (2% m/v) e o pH da solução ajustado para 8. Com a solução de zeína previamente tratada (10 mL) são adicionados 150 mg de cada ativo sendo: Mistura de limoneno e carvacrol (1:1), Mistura de geraniol e cinamaldeído (1:1 v:v) e Mistura de nim e linalol (1:1 v:v) agitando para completa dissolução dos óleos. Posteriormente a solução orgânica contendo os ativos foi injetada a solução aquosa de surfactante (30 mL) sob agitação magnética;
- iv) A dispersão coloidal resultante é rotaevaporada para evaporação do etanol, sendo se necessário adição de água a pH 8 para o volume perdido em excesso;
- v) Uma partícula controle é preparada sem a adição dos ativos;
- vi) A solução final de cada formulação contendo a mistura dos compostos botânicos contém a concentração de 5 mg/mL de ambos ativos.

**[035]** Dito método de caracterização físico-química das nanopartículas de zeína apresenta as seguintes etapas:

- i) as formulações preparadas são caracterizadas pelo seu diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão, potencial zeta, concentração, pH e eficiência de encapsulação. A técnica de espectroscopia de correlação de fótons (espalhamento de luz) foi empregada para a determinação do diâmetro hidrodinâmico e o índice de polidispersão (PDI), já para o potencial a técnica de microeletroforese foi realizada;
- ii) Para ambas medidas, as nanopartículas foram diluídas (1:200, v:v) com água deionizada sem ajuste de pH e analisadas utilizando o *ZetaSizer* ZS 90 (Malvern®).
- iii) A técnica de rastreamento de nanopartículas (NTA) é empregado para determinar a concentração e tamanho das nanopartículas. Para realização desta análise utilizou-se uma célula NanoSight LM 10 (laser verde, 532 nm), uma câmera sCMOS e 'software' NanoSight (versão 3.2);
- iv) As diluições das suspensões de nanopartículas foram realizadas em água deionizada (1:6000, v:v). Onde são realizados 5 vídeos de 60 segundos em temperatura ambiente (25°C), compreendendo uma leitura de aproximadamente 100 partículas por frame;
- v) O monitoramento do pH é realizado utilizando um potenciômetro (OHAUS®), calibrado com soluções tampão em pH 4,0 e 7,0 e controle de temperatura. Para cada

amostra são realizadas três medidas e o resultado foi expresso como média dessas determinações;

vi) Já a eficiência de encapsulação dos compostos botânicos nas nanopartículas de zeína é determinada pelo método de ultrafiltração/centrifugação, o qual é submetida a suspensão de nanopartículas a centrifugação utilizando dispositivos de celulose regenerada com poro de exclusão 10 kDa (*Microcon-Millipore*<sup>®</sup>) em uma centrífuga (NT 805) por 15 minutos à 24.0000 g. Sendo o compostos filtrado quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência CLAE. (PEREIRA, A E.S. *et al.*, 2014).

#### - Análise morfológica das nanopartículas

**[036]** Através da técnica de microscopia de força atômica (AFM), obteve-se uma imagem topográfica e assim pode-se analisar a morfologia dessas nanopartículas, além do tamanho. As análises morfológicas foram feitas por um microscópio de força atômica (Nanosurf<sup>®</sup> Easy Scan 2 Basic AFM – Pattern BT02217, Switzerland), onde as suspensões das nanopartículas foram diluídas, gotejadas em um suporte de silício e mantidas em dessecador até a secagem das amostras. As análises foram realizadas operando-se em modo de não-contato, com cantilever TapAl-G (BudgetSensors<sup>®</sup>, Bulgária) com uma taxa de varredura de 90 Hz. As imagens foram tratadas pelo software Gwyddion e o ImageJ. Sendo realizado a contagem e medições de 150 nanopartículas para determinação da média apresentada no gráfico de distribuição (NEČAS; KLAPETEK, 2011).

#### - Análise Estrutural

**[037]** A análise estrutural dos sistemas produzidos foi avaliada através da técnica de espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier (FTIR) e também pela técnica de calorimetria diferencial exploratória (CDE). Para as análises de FTIR as nanopartículas foram centrifugadas para formação de pellets e posteriormente secas em dessecador. A análise foi realizada através de pastilhas de KBr, produzidas pela prensagem do macerado de KBr contendo 1,5% de amostra. As amostras oleosas foram medidas através de um disco de KBr gotejado com amostra. Para obtenção dos espectros foi utilizado um equipamento FTIR-410 equipado com acessórios para medidas de transmitância, onde foi utilizado o método de reflexão difusa por KBr, em faixa de 400 a 4000 cm<sup>-1</sup>, empregando 64 varreduras por amostra com resolução de 8

cm<sup>-1</sup> (SOLOMONS et. al, 2001). Já para as análises de CDE as suspensões de nanopartícula foram centrifugadas por 15 minutos à 24.000 g por 3 vezes, para a formação do pellet, e posteriormente foram colocadas para secagem em um dessecador pelo período de 7 dias. As análises foram feitas utilizando um calorímetro TA Instruments DSC Q20 equipado com sistema de refrigeração, utilizando um fluxo de nitrogênio de 50 mL/min, com variação de temperatura 0 °C com uma rampa de 10 °C à 300 °C/min. Os resultados foram expressos em forma de termogramas.

#### - Ensaio de Fitotoxicidade em Plantas

**[038]** Para o ensaio com plantas, sementes foram plantadas em vasos de 9,3 cm preenchidos com 600 g de substrato Carolina Soil (turfa sphagnum, vermiculita expandida, calcário dolomítico, giz agrícola e fertilizante NPK). Os tratamentos consistiram nas formulações de nanopartículas carregadas com os compostos botânicos, bem como os controles com pluronic, água e zeína. Ambos os tratamentos foram testados em diferentes concentrações (0,250, 1,25, 2,5, 3,75 e 5 µg/mL).

**[039]** Para os tratamentos de pós emergência, foi utilizado um volume de 5 mL da formulação, qual foi pulverizada nos vasos 15 dias após a germinação das sementes. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação sob condições naturais de iluminação e temperatura. Assim após 7 dias, foi realizada as coletas das plantas e feito a medição dos comprimentos da parte aérea da planta e das raízes. Os tratamentos foram realizados em triplicata (n =3) (CAMPOS *et al.*, 2018; PEREIRA, A. E. S. *et al.*, 2017).

**[040]** Além disso, foi realizado a determinação das clorofilas *a* e *b* e carotenóides, para cada um dos tratamentos. Foram coletados dois discos de 5 mm das folhas das plantas e inseridas em ependorff contendo 1 mL de DMSO, os frascos foram envolvidos com papel alumínio para que desta forma estivessem protegidos da luz e foram então armazenados na geladeira pelo período de 24 horas. As medidas foram feitas em espectrofotômetro UV-Vis (Cary 50, Varian) nos comprimentos de onda de 665 (equação 1), 649 nm (equação 2) e 480 nm (equação 3) para determinar a clorofila *a*, clorofila *b* e carotenóides, respectivamente (WELLBURN, 1994). Onde *Chl a* é a “clorofila *a*”, *Chl b* é a “clorofila *b*” e *A* o valor de absorbância obtido para os determinados comprimentos de onda (WELLBURN, 1994).

$$Chl a = 12,19 x A665 - 3,45 x A649 \quad (\text{equação 1})$$

$$Chl b = 21,99 x A649 - 5,32 x A665 \quad (\text{equação 2})$$

$$Carotenóides = \frac{1000 x A480 - 2,14 x Chla - 70,16 x Chl b}{220} \quad (\text{equação 3})$$

- Análise de degradação enzimática através de DLS, NTA e SDS – PAGE

**[041]** Antes da avaliação da degradação enzimática das nanopartículas produzidas, foi realizado a avaliação da atividade enzimática. A análise realizada usando BApNA (N-Benzoil-L-arginina-p-nitroanilida) como substrato específico para tripsina, de acordo com Patankar et al. (2001) com pequenas modificações. O ensaio foi realizado com a adição de 300 µL da solução de enzima, preparada em HCL 0,001 M, em 2 mL de BApNA e 700 µL de tampão Tris HCL pH 8 para solução final de 3 mL. A reação foi mantida em banho à 37 °C por 20 minutos. A reação foi pausada com ácido acético à 30%, e a formação de p-nitroanilina, que é o produto da reação, foi quantificado por espectrofotômetro (Varian Cary 50) a 410 nm. Como controle foi preparada uma amostra substituindo a enzima por Tris HCl 0,001 M, pH 8,0. A análise dos dados foi realizada utilizando metodologia descrita por Akbar et al. (2017b). Através da técnica de espectroscopia de correlação de fótons, foi realizado a determinação do diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta, em amostras de 950 µL de nanopartículas contendo os compostos botânicos (em concentração de 5 g/mL) em 50 µL de água, como controle sem a adição da enzima e amostra de 950 µL de nanopartículas contendo os compostos botânicos em 50 µL de enzima tripsina (com a concentração de 0,20 g/mL) em tempos de 0, 15, 30, 60, 120 minutos de contato com a enzima. Os resultados foram determinados a partir de uma média de três resultados obtidos na técnica. Com as mesmas amostras foi possível determinar a polidispersão e o potencial zeta das nanopartículas.

**[042]** Também foi realizada análises de degradação das nanopartículas em contato com a enzima pela técnica de NTA, onde as 1750 µL da amostra das nanopartículas foram previamente diluídas em 250 µL da enzima tripsina e posteriormente foram

retiradas 10 µL dessa amostra e foi diluída em 20 mL de água. Para o controle foi utilizada a mesma diluição descrita acima, no entanto utilizando apenas água. Foram realizadas análises de 5 vídeos de 60 segundos em temperatura ambiente (25°C).

**[043]** Para realizar a comparação entre os resultados, também foi aplicada a técnica de SDS-PAGE, onde o ensaio foi realizado em unidade eletroforese vertical (Bio-Rad Mini-Protean® Tetra System) baseado na metodologia de Chowdhury et al. (2014). O gel de separação foi preparado em 1,25 mL de tampão Tris SDS 1,5 M e pH 8,8, mediante adição de 2 mL de acrilamida/bis-acrilamida, 1,72 mL de água, 25 µL de persulfato de amônio 0,44 M e 7 µL de TEMED. O gel de concentração foi preparado em 750 µL de tampão Tris SDS 0,5 M e pH 6,8, mediante adição de 500 µL de acrilamida/bis-acrilamida, 1,73 mL de água, 15 µL de persulfato de amônio 0,44 M e 5 µL de TEMED. Uma solução para receber a amostra foi preparada a partir de 1,875 mL de tampão Tris-HCL 0,5 M e pH 6,8, 7,5 mL de solução aquosa de glicerol 50% (v/v), 0,150 mL de azul de bromofenol, 3 mL de solução aquosa de SDS 10% (m/v) e 2,475 mL de água. Para avaliar a ação proteolítica nas nanopartículas, 50 µL de solução de tripsina foram adicionados a 50 µL de formulação de nanopartículas de LIM + CVC, previamente diluídas a 33% (v/v) em solução tampão glicina HCL 0,2 M e pH 8. As amostras controle consistiram em uma solução de tripsina, nanopartículas de zeína com LIM + CVC sem tripsina e solução hidroetanólica de zeína 0,5% (m/v). Às formulações de nanopartículas de LIM + CVC incubadas com tripsina foram adicionados 47,5 µL do tampão de amostra contendo bromofenol e 2,5 µL de 2-mercaptoetanol nos tempos de 0, 15, 30, 60 e 120 min, para paralisar a reação. As amostras foram aquecidas por 10 min a 95 °C e centrifugadas durante 1 min a 11500 x *g*. Foi utilizado o marcador de peso molecular BLUeye prestained protein ladder. 10 µL das amostras centrifugadas foram pipetados nos poços do gel de concentração e iniciada a corrida de eletroforese em 40 mA/200 V. Ao término da corrida, os géis foram lavados em água ultrapura e mantidos por 15 min em 35 mL de solução fixadora (45% metanol e 10% ácido acético). A coração foi feita mantendo os géis overnight em solução corante coomassie blue e a revelação feita em 85 mL de solução descorante (5% ácido acético, 10% metanol).

#### - Resultados

**[044]** A figura 1 traz os resultados de análise de diâmetro hidrodinâmico (DLS) (Figura 1A), índice de polidispersão (Figura 1B) e a distribuição de tamanho (Figura 1C e D) para as partículas contendo a mistura dos compostos limoneno e carvacrol (NP LIM+CVC) e a respectiva formulação controle (NP CTL). A formulação NP CTL apresentou diâmetro médio inicial de  $117 \pm 1$  nm, após 7 dias de armazenamento observou-se que o diâmetro médio permaneceu estável durante todo o período de armazenamento até os 120 dias, em que foram analisadas, obtendo assim o diâmetro médio de  $116 \pm 2$  nm. Para as nanopartículas contendo os ativos NP LIM+CVC, inicialmente o diâmetro médio foi encontrado em  $111 \pm 1$  nm e permanecendo estáveis ao longo do período e uma diminuição significativa no diâmetro médio com 120 dias, atingindo  $87 \pm 0,4$  nm. Já para os valores de índice de polidispersão (Figura 1-B), as NP CTL mostraram um índice de polidispersão inicial de  $0,180 \pm 0,013$ , após 120 dias foi observado uma diminuição no índice de polidispersão  $0,139 \pm 0,012$ . Para a formulação de NP LIM + CVC foi observado um valor inicial de índice de polidispersão de  $0,277 \pm 0,006$ , após os 120 dias de armazenamento houve uma diminuição no índice, mas sem alterações significativas, o valor encontrado foi de  $0,234 \pm 0,008$ . A estabilidade das nanopartículas pode ter ocorrido pela presença de aminoácidos presente na zeína, permitindo que os grupamentos hidrofílicos ficassem expostos na superfície aumentando a estabilidade do sistema em solução. A Figura 4C e D apresentam a distribuição de tamanho para nanopartículas controle e os ativos LIM + CVC, respectivamente. Os resultados mostram que não ocorreu o surgimento de novas populações corroborando com os demais gráficos apresentados.

**[045]** A figura 2 traz a distribuição de tamanho analisado por DLS para as formulações contendo a mistura dos compostos Nim+Linalol e Geraniol+Cinamaldeído. Os resultados mostraram que o diâmetro médio da formulação controle (Figura 2A) não apresentou mudanças substanciais no diâmetro médio para o período analisado, com diâmetro inicial de 101 nm para 116 nm após 120 dias. A formulação contendo a mistura dos ativos geraniol e cinamaldeído (Figura 2C), também não apresentou alterações significativas ao longo do período avaliado, sendo de um diâmetro médio inicial de 139 nm e atingindo 148 nm com 60 dias. Já a formulação contendo a mistura de dos ativos

Nim + LNL apresentou um diâmetro médio inicial de 148 nm, e pode-se observar, pela Figura 1-B, que houve um aumento no diâmetro das nanopartículas no decorrer do tempo analisado, passando para 256 nm. Estes resultados corroboram com trabalhos encontrados em literatura. (PASCOLI et al., 2019), por exemplo desenvolveram nanopartículas de zeína contendo óleo de nim e obtiveram um diâmetro médio de 288 nm. Já (OLIVEIRA, et al., 2019) reportam diâmetro de 253 nm após obterem nanopartículas de zeína contendo GRL+CND.

**[046]** A figura 3 traz os demais dados de caracterização para as formulações de nanopartículas contendo a mistura dos dos compostos limoneno e carvacrol (ZPN LIM+CVC) e seu respectivo controle (NP CTL). O diâmetro médio analisado pela técnica de NTA é apresentada na Figura 3-A. As nanopartículas sem ativos apresentaram um diâmetro inicial de  $120 \pm 5$  nm, após 120 dias apresentaram um aumento não significativo de  $146 \pm 1$  nm. Já para a formulação com os ativos (NP LIM + CVC) apresentaram um diâmetro inicial de  $125 \pm 2$  nm, após 120 dias de armazenamento não houve diferença estatística no diâmetro apresentando  $123 \pm 3$  nm. Apesar da diferença no diâmetro médio das formulações analisadas por ambas as técnicas (DLS e NTA), é possível observar que em ambas as partículas se mantiveram estáveis ao longo do tempo. A concentração também foi um dos parâmetros analisados (Figura 3B) é possível observar que para a formulação controle não foi observado diminuição significativa da concentração em função do tempo apresentando concentração inicial de  $3,52 \times 10^{12} \pm 1,51 \times 10^{11}$  partículas/mL, após 120 dias  $5,05 \times 10^{12} \pm 1,07 \times 10^{11}$  partículas/mL. Já para NP LIM+CVC foi observado uma diminuição significativa na concentração, partindo de  $4,69 \times 10^{12} \pm 1,32 \times 10^{11}$  partículas/mL inicialmente e chegando a  $1,96 \times 10^{12} \pm 9,08 \times 10^{11}$  partículas/mL com 120 dias.

**[047]** O potencial zeta das nanopartículas estão apresentando na Figura 3C. As NP CTL apresentaram um potencial zeta inicial de  $-30 \pm 1$  mV e até a leitura de 120 dias onde apresentou potencial zeta de  $-24 \pm 1$  mV, não havendo alterações significativas. Para a NP LIM+CVC, apresentaram o potencial zeta inicial de  $-25 \pm 2$  mV, que permaneceu relativamente estável, sem grandes alterações pelo período de tempo acompanhado, apresentando o valor de  $-22 \pm 1$  mV em 120 dias de armazenamento. O pH das

nanopartículas foi monitorado durante 120 dias (Figura 3D). A formulação de nanopartículas sem ativos apresentaram pH inicial de  $8,27 \pm 0,02$ , e com 120 dias de armazenamento o pH reduziu para  $7,69 \pm 0,01$ . As nanopartículas com os ativos apresentou pH inicial de  $8,30 \pm 0,02$ , sem alterações significativas até os 120 dias, entre os valores iniciais e finais, mantendo o pH em torno de  $7,66 \pm 0,02$ . As nanopartículas deste estudo foram produzidas com todos as soluções envolvidos em pH 8, para que resultasse em uma formulação já no pH estipulado para o trabalho e não fosse necessário fazer ajustes de pH na suspensão pronta. Com a realização deste ensaio mostrou-se que os resultados se assemelham aos obtidos por outros autores quando se trata do pH e temperatura para atividade ótima da enzima. Também foram testadas outras temperaturas (25, 30, 35 - 37 e 40°C) onde foi observada atividade máxima em temperatura de 37°C. Alterações de pH em partículas de zeína podem resultar em diferentes tamanhos de partículas e também interfere no potencial zeta. Partículas de zeína com pH acima de 10 podem se tornar instáveis pois a zeína é solúvel em soluções alcalinas (pH acima de 11) (SPASOJEVIĆ et al., 2019)

**[048]** A eficiência de encapsulação dos ativos e LIM e CVC foi analisada e está representada na figura 3E. O limoneno apresentou eficiência de encapsulação de  $99,9 \pm 0,004$  %, sendo que após 120 dias de armazenamento a eficiência foi de 99,8 % aproximadamente. O carvacrol no tempo inicial teve eficiência de  $91,0 \pm 0,14$  %, e após 120 dias de armazenamento a eficiência foi de 72,8%, redução de 20,0 %. Perdas durante o processo de armazenamento podem estar ligadas a liberação dos ativos bem como a volatilidade e a solubilidade como demonstrado por Oliveira et al. (2019).

**[049]** As formulações contendo a mistura dos compostos geraniol e cinamaldeído e nim e linalol também foram caracterizadas além das análises de tamanho. Os resultados mostraram que as partículas apresentaram eficiência de encapsulação de 96,9% para o CND, 97,2% para o GRL, 98,4% para o LNL e 99% para o Nim, sendo que ao longo do tempo não foram observadas diferenças significativas nos valores (dados não mostrados). A figura traz os resultados de potencial zeta, índice de polidispersão e também concentração para essas partículas. Observa-se que o controle e as formulações de Nim+LNL apresentaram potencial zeta de -30 mV e -26 mV,



respectivamente, sem grandes mudanças no decorrer dos 120 dias analisados (Figura 4A), principalmente devido a estabilização estérica fornecida pelo Pluronic-F68, que aumenta a estabilidade das partículas. Os resultados obtidos estão em concordância com os trabalhos de (OLIVEIRA et al., 2014; PASCOLI et al., 2019; ZHANG et al., 2014). Já as formulações contendo a mistura GRL+CND apresentou potencial zeta de +5 mV, sofrendo alterações no decorrer do tempo. No entanto destaca-se que apesar das alterações não foi observado precipitação da formulação, possivelmente devido também a estabilidade pelo tensoativo. Estando os valores de acordo com trabalho descrito por (PASCOLI et al., 2019). Para os resultados de índice de polidispersão (Figura 4B), a formulação contendo Nim+LNL foi o que apresentou maior PDI, indicando que as partículas não são monodispersas. No entanto ocorreu uma diminuição nestes valores ao longo do período de armazenamento. Já as demais formulações apresentam índice de polidispersão por volta de 0,2 mantendo estável. Diferentes autores reportam que nanopartículas obtidas a partir de matrizes de origem natural, como a zeína, apresentam uma distribuição polidispersa (CHUACHAROEN; SABLIOV, 2016; OLIVEIRA et al., 2018; PASCOLI et al., 2019). As análises de concentração de nanopartículas mostram que inicialmente a formulação controle, a contendo a mistura de nim e linalol e mistura de geraniol e cinamaldeído apresentaram concentração de  $3,2 \times 10^{12}$ ,  $6,8 \times 10^{12}$  e  $9,6 \times 10^{12}$  partículas/mL, respectivamente. Em função do tempo observa-se que apenas para a formulação controle foram observadas diminuições intensas na concentração, sendo as demais formulações mantiveram-se praticamente estáveis ao longo do período.

#### - Análise da morfologia das nanopartículas através de AFM

**[050]** Foram analisadas através da técnica de microscopia de força atômica a morfologia e o tamanho das nanopartículas. A figura 5 traz a imagem topográfica bem como os gráficos de distribuição de tamanho para as nanopartículas carregadas com a mistura de LIM+CVC, apresentando morfologia esférica. O gráfico de tamanho médio das nanopartículas foi obtido pelo tratamento da imagem topográfica pelo software Gwyddion no qual apresenta um tamanho médio em torno de  $151 \pm 52$  nm corroborando com outras técnicas.

**[051]** Já a figura 6 apresenta a morfologia das nanopartículas contendo a mistura

Nim+LNL e GRL+CND. É possível observar que para essas nanopartículas a morfologia também foi esférica. No caso das formulações contendo a mistura Nim+LNL nota-se ainda que as partículas estão unidas, indicando que houve uma aglomeração das partículas, corroborando com dados apresentados anteriormente. O diâmetro médio calculado a partir das micrografias do AFM usando o software Gwyddion, mostraram um tamanho de 363,7 nm para a formulação de Nim+LNL e 185 nm para de GRL+CND. Estruturas esféricas das nanopartículas de zeína foram reportadas previamente por (LUO; TENG; WANG, 2012; PASCOLI et al., 2019; ZHANG et al., 2014).

#### - Análise Estrutural

**[052]** Com o intuito de verificar as interações entre as nanopartículas e os ativos as técnicas de infravermelho, bem como de calorimetria diferencial exploratória utilizadas. A Figura 7 traz os espectros de infravermelho para as nanopartículas controle e as contendo a mistura de LIM + CVC, sendo também realizada a comparação com as bandas características de zeína e o surfactante pluronic, encontrados na literatura (SEEMA, DATTA, 2014; TORKAMANI et al., 2018).

**[053]** Para a zeína, a banda de absorção centrada em  $3320\text{ cm}^{-1}$  corresponde aos estiramentos de O-H e N-H presentes na estrutura da proteína, e na faixa de  $2961$  a  $2873\text{ cm}^{-1}$  ocorrem as vibrações de alongamento C-H de grupos alifáticos. A banda em  $1661\text{ cm}^{-1}$  é atribuída às vibrações de alongamento de C=O, de amida I, enquanto que a banda em  $1532\text{ cm}^{-1}$  é atribuída às vibrações de alongamento de C-N, de amida II. Em  $1444\text{ cm}^{-1}$  ocorre a banda referente à combinação de deformações angulares de N-H e de  $-\text{CH}_2$  adjacente à carbonila. E a banda de absorção em  $1235\text{ cm}^{-1}$ , relacionada às deformações axiais de C-O de grupo funcional éter.

**[054]** O tensoativo Pluronic possui banda de absorção centrada em  $2889\text{ cm}^{-1}$  referente às vibrações de alongamento de C-H alifáticos, em  $1468$  e  $1348\text{ cm}^{-1}$  ocorrem as bandas de deformação angulares de  $-\text{CH}_2$  e  $-\text{CH}_3$ , respectivamente, e em  $1110\text{ cm}^{-1}$  a banda de absorção atribuída às deformações axiais de ligação éter (C-O).

**[055]** Para o composto botânico carvacrol foram observadas bandas específicas iniciando com uma banda larga centrada em  $3400\text{ cm}^{-1}$  atribuída às vibrações de alongamento O-H, seguida da banda em  $3025\text{ cm}^{-1}$  referente às vibrações de

alongamento C-H de composto aromático. A faixa de vibração entre 2961 e 2873  $\text{cm}^{-1}$  refere-se às bandas atribuídas às vibrações de alongamento C-H de alifáticos e de 1621 a 1428  $\text{cm}^{-1}$  são bandas de absorção atribuídas às vibrações C=C de núcleos aromáticos. As bandas de absorção em 1356 e 1308  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas às deformações angulares de  $-\text{CH}_3$  e em 1251  $\text{cm}^{-1}$  atribuída à deformação axial da ligação C-O de fenol. Em 858 e 818  $\text{cm}^{-1}$  ocorrem bandas de absorção referentes à deformação angular de C-H presentes no anel aromático.

**[056]** Para o composto limoneno, a banda larga de baixa intensidade em 3427  $\text{cm}^{-1}$  pode estar associada às vibrações de alongamento O-H de água residual adsorvida na interface oleosa. Em 3081  $\text{cm}^{-1}$  ocorre a banda de absorção atribuída às vibrações de alongamento C-H de alceno, enquanto a região de 2961 a 2873  $\text{cm}^{-1}$  às vibrações de alongamento C-H alifáticos. A banda em 1645  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída às vibrações de deformação axial C=C de alceno e em 1444 e 1372  $\text{cm}^{-1}$  ocorrem as bandas atribuídas às deformações angulares de  $-\text{CH}_2$  e  $-\text{CH}_3$ , respectivamente. Por fim, a banda em 882  $\text{cm}^{-1}$  refere-se à deformação angular C-H fora do plano.

**[057]** Comparando os espectros obtidos para a nanopartícula controle e nanopartículas carregadas com LIM + CVC é observado o surgimento das bandas de absorção em 1356 e 1309  $\text{cm}^{-1}$  atribuídas ao composto CVC. Além dessas, não foi observado o aparecimento de novas bandas de absorção, no entanto o perfil proporcional de intensidade das bandas de absorção na região atribuída aos estiramentos C-H de carbonos alifáticos e em 1251  $\text{cm}^{-1}$  atribuída à deformação axial O-H de composto fenólico indicam a ocorrência de incorporação dos ingredientes ativos LIM e CVC na matriz proteica. Tais resultados corroboram com estudos encontrados na literatura (BOUGHENDJIOUA et al., 2017; ELZEY, et. al., 2016).

**[058]** NPNPNA análise de calorimetria exploratória diferencial, pode também ser aplicada para comprovar a encapsulação de um composto, pelas modificações em picos de fusão, cristalização, deslocamento entre outras transições térmicas, podendo mostrar interações que ocorreram entre os diferentes compostos. A figura 8 traz os termogramas (fluxo de calor (W/g) em função da temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )) para os compostos analisados. O surfactante Pluronic, por ser composto de estruturas cristalinas,

apresentou um pico endotérmico em 52 °C correspondente ao ponto de fusão. As proteínas apresentam características relacionadas às suas diferentes estruturas tridimensionais, como o processo de desnaturação, sendo avaliada sua temperatura através de análises térmicas como apresenta a literatura (MOTHÉ; et. al., 2005). O pico endotérmico da zeína foi apresentado em 83 °C podendo estar relacionada a evaporação da água presente no polímero, assim como relatado na literatura descrita por Luo et al. (2011b) onde o termograma apresentou o pico endotérmico de 73,2 °C. Para as NP LIM+CVC o apresentaram o mesmo perfil do termograma obtido para as nanopartículas de zeína. Tal fato demonstra uma provável interação entre os ativos e a proteína, que por serem interações hidrofóbicas reduz o teor da água (PROENÇA, 2018). As nanopartículas sem ativo (NP CTL), apresentaram um pico endotérmico em torno de 40 °C a 70 °C, provavelmente devido a interação com o pluronic e suas propriedades cristalinas, demonstrando que a mesma não possui uma boa composição o que faz com que esta seja menos estável que as contendo os ativos, conforme demonstrado em resultados anteriores.

#### - Ensaio de Fitotoxicidade em Plantas

**[059]** Visando a aplicação destas formulações em plantas adultas, foram também conduzidos experimentos para avaliação do efeito fitotóxico das nanopartículas contendo a mistura dos compostos botânicos em plantas de feijão. As figuras 9, 10 e 11 trazem os resultados para a formulação contendo a mistura dos compostos botânicos limoneno e carvacrol e seus respectivos controles. As formulações foram testadas em diferentes concentrações (0,25, 1,25, 2,5, 3,75 e 5 µg/mL). A figura 9 traz a imagem das plantas de feijão que foram submetidas ao ensaio de fitotoxicidade. A figura 10 traz os resultados para as medidas de parte aérea e raiz. Observa-se em ambas as figuras que não ocorreu diferença significativa entre os tratamentos analisados, sendo que as plantas de feijão tratadas com diferentes concentrações não apresentaram alterações no seu desenvolvimento.

**[060]** A fim de investigar também a coloração das folhas e os fatores de atividade fotossintética foram medidos os níveis de clorofila *a* e *b* e carotenóides apresentados na figura 11. Os valores determinados para a clorofila *a* e *b* em folhas de *Phaseolus vulgaris*

(Figura 11 – A e B) não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos com as nanopartículas, carregadas ou não com os compostos ativos, e os tratamentos controle (água, zeína e pluronic). No entanto, as nanoformulações carregadas ou não com os ingredientes ativos apresentaram alterações no teor de carotenoides quando comparadas aos tratamentos controles realizados com água, Pluronic e zeína (Figura 11 – C). Os carotenoides desempenham função do pigmento para absorção de luz e proteção contra efeitos oxidativos, e o aumento observado nos tratamentos efetuados com as nanopartículas deve estar relacionado à estratégia adotada pela planta para combater os radicais livres gerados sob estresse pelas nanopartículas de zeína (Singh et al., 2006). Assim, a planta pôde elevar a tolerância ao estresse oxidativo e manteve seu desenvolvimento normal. As medidas observadas indicam que esse tipo de nanobiopesticida é passível de aplicação na agricultura sem ocasionar injúrias às espécies vegetais.

**[061]** Portanto, os resultados indicam que não ocorreu nenhum fator que indicasse toxicidade dessas formulações para as plantas de feijão, pois não ocorreram diferenças nos pigmentos fotossintetizantes que identificasse clorose. Além disso não ocorreu diferenças significativas no desenvolvimento da planta (expresso pelo tamanho de parte aérea e a raiz).

**[062]** Já a Figura 12 traz os resultados de comprimento de raiz e parte aérea (Fig.12A), massa seca (Fig. 12-B), clorofila A e B, e carotenoides (Fig. 12C) para as formulações de nanopartículas contendo a mistura dos compostos nim e linalol e seus respectivos controles (nanopartícula vazia, água e pluronic) em diferentes concentrações (0,25, 1,25, 2,5, 3,75 e 5 µg/mL). É possível observar pelos gráficos que em todas as concentrações testadas, a mistura de Nim+LNL influenciou positivamente o crescimento da raiz, sendo que o crescimento do caule ficou ligeiramente menor do que o tratamento com água. Na formulação controle (sem ativo), nenhuma mudança significativa foi observada quando comparado com o tratamento com água (Figura 12A). Com relação a massa seca, os nanoformulados não apresentaram nenhum efeito fitotóxico significativo para as concentrações testadas (Figura 12B).

**[063]** O tratamento pós-emergente causou pouco ou nenhum efeito nos pigmentos

fotossintéticos (Figura 12C). Para os teores de clorofila *a* e *b*, não foram observados nenhum efeito significativo entre os tratamentos testados, com exceção para o tratamento controle na concentração mais alta, onde o teor de clorofila *a* foi mais baixo. Quanto ao teor de carotenoides, também não foi observado efeito significativo entre os nanoformulados, apenas houve diferença quando comparado o CTL com o tratamento contendo apenas água, em que os teores de carotenoides foram maiores. As Figuras 12D mostram as plantas obtidas após o ensaio, tratadas com nanopartículas de Zeína sem ativos e com a mistura de Nim+LNL.

**[064]** Assim como observado para as formulações contendo a mistura dos compostos ativos carvacrol e limoneno, as formulações contendo a mistura de linalol e nim também não apresentaram efeitos fitotóxicos para as plantas de feijão. Tais resultados demonstram que o encapsulamento pode ajudar a proteger as plantas de algum efeito fitotóxico dos compostos botânicos, uma vez que o ativo não está totalmente disponível. Apesar dos pesticidas botânicos serem obtidos a partir de plantas, os compostos purificados e concentrados podem apresentar efeitos adversos quando aplicado diretamente nas plantas. Synowiec et al. (2017), por exemplo avaliaram o potencial fitotóxicos de 12 tipos de óleos essenciais, em três culturas diferentes, *Avena sativa*, *Brassica napus* e *Zea mays* e verificaram que além das concentrações, a cultura também influencia na toxicidade dos óleos, pois algumas espécies mostraram-se mais sensíveis.

#### - Degradação enzimática das nanopartículas

**[065]** A capacidade de degradação enzimática das nanopartículas de zeína pela tripsina foi investigada por diferentes técnicas. Inicialmente a atividade enzimática da tripsina foi realizada em diferentes pH variando de 6 a 12, uma vez que o pH possui um papel importante para a atividade ótima da enzima. A figura 13 traz o resultado para a atividade enzimática da tripsina em diferentes pH. É possível observar que na condição experimental analisada a máxima atividade enzimática encontrada foi em pH 8,0 a 37 °C. Os resultados obtidos nesta invenção, podem ser comparados aos encontrados na literatura, onde os autores relatam atividade ótima para tripsina, encontrada em 50 e 60°C (6,7 U) e para a quimiotripsina (5,68 U) ambos na mesma temperatura

(AKBAR; SHARMA, 2017b) e o pH ótimo foi encontrado na faixa de 8 a 10. De Araújo et al. (2013) encontrou atividade máxima proteolítica da tripsina em pH 8,5 em temperatura de 55°C.

**[066]** Para o ensaio de degradação das nanopartículas contendo a mistura dos compostos limoneno e carvacrol (NP LIM+CVC), foram realizadas análises do diâmetro médio, polidispersão, potencial zeta e também concentração. Os ensaios foram realizados com e sem a adição da enzima, sendo que após a adição da enzima foram investigados diferentes tempos de incubação (0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos). A Figura 14 traz o resultado para os parâmetros analisados. As análises de diâmetro hidrodinâmico por DLS (Figura 14-A) mostram que a intensidade da distribuição de tamanho das nanopartículas diminuiu em função do tempo de exposição da nanopartícula com a enzima. Mudanças na intensidade da distribuição de tamanho indicam que está ocorrendo alterações na distribuição de tamanho, muito provavelmente pela degradação das nanopartículas. A enzima tripsina é uma enzima digestiva capaz de realizar a degradação de proteínas em várias unidades de aminoácidos para absorção (PAWAR et al., 2014), o que pode estar ocorrendo no caso da zeína.

**[067]** A figura 14B traz os valores de índice de polidispersão, o qual apresentou valores de  $0,246 \pm 0,013$  sem adição da enzima e ao primeiro contato com a enzima no tempo 0 minutos,  $0,343 \pm 0,015$  ocorrendo um aumento em um período de 120 minutos ( $0,575 \pm 0,125$ ). Tais resultados corroboram com os demonstrados anteriormente, pois o aumento no índice de polidispersão evidencia alterações na distribuição de tamanho das nanopartículas, ocasionado pela ação enzimática. Na figura 14-C são apresentados os valores de potencial zeta, observa-se que sem a adição da enzima o valor foi de -11,4 mV e em função do tempo de contato com a enzima, diminuiu para  $-3,4 \pm 0,59$  mV ao longo de 120 minutos, indicando que as partículas sofreram alterações ao longo deste período.

**[068]** Já a figura 14D, apresenta os gráficos (3D e em barras) para a concentração das nanopartículas analisado pela técnica de NTA. Observa-se que a concentração encontrada sem a adição de enzima foi de  $2,31 \times 10^{12} \pm 5,36 \times 10^{11}$  partículas/mL. Já com

a presença da enzima este valor foi para  $1,96 \times 10^{12} \pm 1,08 \times 10^{11}$  partículas/mL, sendo que com 120 minutos de incubação o valor atingiu  $3 \times 10^{11} \pm 1 \times 10^{10}$  partículas/mL. Desta forma, pela técnica de NTA, foi possível observar que houve uma diminuição significativa na concentração das nanopartículas em função do tempo de exposição. Tais resultados corroboram com os encontrados anteriormente e evidenciam que a enzima tripsina está degradando a zeína. A ação da enzima na ruptura e degradação das nanopartículas de zeína pode ser evidenciada visualmente pela redução da opacidade do meio contendo a formulação na presença da enzima, como mostrado na fotografia com o meio em ordem crescente ao período de contato de 2 horas, concomitante ao decaimento de absorbância (Figura 15).

**[069]** Destaca-se ainda que ao longo de todo o ensaio a atividade enzimática foi monitorada (240 minutos) e a mesma se apresentou ativa dentro o tempo analisado, em T0 minutos a atividade encontrada foi de  $2,3 \pm 0,2$  U/mL e após 240 minutos  $2,4 \pm 0,3$  U/mL. Tais resultados indicam que as nanopartículas bem como os componentes e ativos não foram capazes de inativar a atividade desta enzima.

**[070]** As nanopartículas contendo a mistura dos compostos linalol e nim também foram investigadas segundo a ação da enzima tripsina. Inicialmente foram preparadas nanopartículas contendo o marcador fluoresceína, sendo posteriormente realizado os ensaios de incubação e degradação. A figura 16 traz os resultados da análise de absorbância para essas formulações bem como as análises de concentração realizado pela técnica de NTA. Através dos resultados (Figura 16A) é possível observar a redução da intensidade de fluoresceína captada com o passar do tempo, indicando que a enzima está em atividade e que as nanopartículas estão sendo degradadas pela tripsina. Esses dados também corroboram com os demonstrados na Figura 16B, onde as nanopartículas foram encubadas com a solução de tripsina e amostras foram analisados por NTA. É possível observar uma redução expressiva na concentração de nanopartículas após 60 min, passando de  $9,1 \times 10^{11}$  para  $1,0 \times 10^{11}$  partículas/mL. Tais resultados corroboram com os também apresentando para as partículas contendo a mistura de limoneno e carvacrol, indicando que a enzima tripsina tem atuado na degradação das nanopartículas de zeína.



**[071]** Outro ensaio realizado para confirmação da ação da enzima tripsina para degradação das nanopáticas, foi através das análises de eletroforese em condições desnaturantes. A figura 17 mostra o gel de poliacrilamida com as formulações testadas iniciando pelo marcador, em sequência: enzima tripsina, formulação de nanopática de limoneno e carvacrol sem a adição da enzima tripsina, a formulação com a adição de enzima tripsina, nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 minutos de incubação.

**[072]** A enzima tripsina apresenta unidades com massa de 23,3 a 66 kDa (AKBAR; SHARMA, 2017a; SIGMA- ALDRICH, 2019) e a zeína possui massa entre 20 a 21 kDa (SIGMA- ALDRICH, 2019). A análise de eletroforese comprova que quando a formulação contendo LIM + CVC, entra em contato com a enzima tripsina, inicia-se imediatamente a degradação das nanopáticas conforme mostra a figura 17.

**[073]** Estudos realizados por outros autores corroboram com resultados apresentados nesta invenção. Nanoesferas de zeína contendo três tipos de óleos essenciais: orégano, tomilho vermelho e cássia (óleo 100% puro) foram investigadas segundo a liberação sustentada desses óleos em sistemas digestivos. Os autores observaram através de análise de eletroforese a hidrólise nas nanoesferas de zeína de forma lenta para o intestino delgado e mais rápida no intestino grosso, o que sugere que o sistema pode ser útil para administração de materiais biológicos (PARRIS; COOKE; HICKS, 2005).

**[074]** O desenvolvimento de nanopáticas inteligentes, ou seja, com liberação de ativos promovida por estímulos é uma área de pesquisa recente e inovadora, principalmente voltado para a agricultura. A liberação de ativos promovido por quebra enzimática da matriz protetora ainda está na fase inicial de estudos, e cientistas têm usado essa estratégia no controle de fitopatógenos (LIU et al., 2015), ervas daninhas (LIANG et al., 2017), insetos e nematoides (GUO et al., 2015; KAZIEM et al., 2018). Camara et al. (2019) descreveram por exemplo que formulações responsivas a enzimas apresentam vantagens consideráveis para a área agrícola, pois os ativos só serão liberados na presença das enzimas, o que aumenta a eficácia e segurança da aplicação, além de mitigar os efeitos ao meio ambiente e aos organismos não-alvo, e que podem diminuir consideravelmente a quantidades de produtos químicos empregues comparadas aos métodos comuns.

[075] É certo que quando o presente invento for colocado em prática, poderão ser introduzidas modificações, sem que isso implique afastar-se dos princípios fundamentais que estão claramente substanciados no quadro reivindicatório, ficando assim entendido que a terminologia empregada não teve a finalidade de limitação.

## Referências

AGUEROS, Bazo Maite *et al.* *Zein nanoparticles for encapsulation of compounds, the production and uses thereof* . [S.l: s.n.]. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/CA2805581A1/en?q=zein&q=nanoparticles&q=essential+oils&oq=zein+nanoparticles+and+essential+oils+>>. Acesso em: 22 mar. 2018. , 19 jan. 2012

AKBAR, Shaik Mohammad; SHARMA, Hari Chand. Alkaline serine proteases from *Helicoverpa armigera*: potential candidates for industrial applications. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** v. 94, n. 1, p. e21367 , 1 jan. 2017a.

AKBAR, Shaik Mohammad; SHARMA, Hari Chand. Alkaline serine proteases from *Helicoverpa armigera* : potential candidates for industrial applications: Alkaline serine proteases from *Helicoverpa armigera*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** v. 94, n. 1, p. e21367 , jan. 2017b.

ALBUQUERQUE, A. F. *et al.* Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. **Environmental Science. Processes & Impacts** v. 18, n. 7, p. 779–787 , 13 jul. 2016.

BHATIA, Sangeeta N. *et al.* *Methods and uses for remotely triggered protease activity measurements* . [S.l: s.n.]. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/CA3022928A1/en?q=zein&q=nanoparticles&q=enzyme&q=responsive&oq=zein+nanoparticles+enzyme+responsive>>. Acesso em: 3 fev. 2020. , 9 nov. 2017

BOUGHENDJIOUA, Hicham. Fourier Transformed Infrared Spectroscopy Analysis of Constituents of Lemon Essential Oils from Algeria. **American Journal of Optics and Photonics** v. 5, n. 3, p. 30 , 2017.

CAIRA, Simonetta; FERRANTI, Pasquale. Innovation for Sustainable Agriculture and Food Production. **Reference Module in Food Science**. [S.l.]: Elsevier, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081005965210184>>. Acesso em: 14 maio 2018. 978-0-08-100596-5.

CAMARA, Marcela Candido *et al.* Development of stimuli-responsive nano-based pesticides: emerging opportunities for agriculture. **Journal of Nanobiotechnology** v. 17, n. 1, p. 100 , 21 set. 2019.

CAMPOS, Estefânia V. R. *et al.* Carvacrol and linalool co-loaded in  $\beta$ -cyclodextrin-grafted chitosan nanoparticles as sustainable biopesticide aiming pest control. **Scientific Reports** v. 8, n. 1 , dez. 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-018-26043-x>>. Acesso em: 5 jul. 2019.

CAMPOS, Estefânia V. R. *et al.* Neem Oil and Crop Protection: From Now to the Future. **Frontiers in Plant Science** v. 7 , 2016. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2016.01494/full>>. Acesso em: 14 maio 2018.

CHEN, Chaowen *et al.* Fabrication of light-responsively controlled-release herbicide using a nanocomposite. **Chemical Engineering Journal** v. 349, p. 101–110 , out. 2018.

CHUACHAROEN, Thanida; SABLIOV, Cristina. Stability and Controlled Release of Lutein Loaded in Zein Nanoparticles with and without Lecithin and Pluronic F127 Surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects** , 2016.

CHOWDHURY *et al.* (2014) Chowdhury, S., Basu, A., Kundu, S., 2014. Green synthesis of protein capped silver nanoparticles from phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with antimicrobial properties against multidrug-resistant bacteria. **Nanoscale Research Letters** 9, 1–11.

DAR, Showket A. *et al.* Prospects , Utilization and Challenges of Botanical Pesticides in Sustainable Agriculture. 2014, [S.l: s.n.], 2014.

DE ARAÚJO, Marlyete Chagas. COLETADAS NO RIACHO CAVOUÇO. p. 3 , 2013.

DE OLIVEIRA *et al.* Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: Prospects and promises. **Biotechnology Advances** v. 32, n. 8, p. 1550–1561 , 1 dez. 2014.

DE OLIVEIRA, Jhones L *et al.* Association of zein nanoparticles with botanical compounds for effective pest control systems. **Pest Management Science** v. 75, n. 7, p. 1855–1865 , jul. 2019.

ELZEY, Et., al. (7) *Purity analysis of adulterated essential oils by FT-IR spectroscopy and partial-least-squares regression | Request PDF.* Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/309250546\\_Purity\\_analysis\\_of\\_adulterat](https://www.researchgate.net/publication/309250546_Purity_analysis_of_adulterat)

ed\_essential\_oils\_by\_FT-IR\_spectroscopy\_and\_partial-least-squares\_regression>.

Acesso em: 16 jan. 2020.

GIANNESCHI, Nathan C.; CHRISTMAN, Karen L. *Enzyme-responsive nanoparticles* . [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US20180092845A1/en?q=nanoparticles&q=enzyme&q=responsive&oq=nanoparticles+enzyme+responsive>>. Acesso em: 3 fev. 2020. , 5 abr. 2018

GUO, Mingcheng *et al.* Preparation and characterization of enzyme-responsive emamectin benzoate microcapsules based on a copolymer matrix of silica-epichlorohydrin-carboxymethylcellulose. **RSC Advances** v. 5, n. 113, p. 93170–93179 , 2015.

HU, Kun; MCCLEMENTS, David. Fabrication of surfactant-stabilized zein nanoparticles: A pH modulated antisolvent precipitation method. **Food Research International** v. 64, p. 329–335 , 1 out. 2014.

IOST, Cristina A. R.; RAETANO, Carlos G. Tensão superficial dinâmica e ângulo de contato de soluções aquosas com surfatantes em superfícies artificiais e naturais. **Engenharia Agrícola** v. 30, n. 4, p. 670–680 , ago. 2010.

ISMAN, Murray B. Bridging the gap: Moving botanical insecticides from the laboratory to the farm. **Industrial Crops and Products** The 2nd International Conference on Pesticidal Plants (ICPP2). v. 110, p. 10–14 , 30 dez. 2017.

KAMALY, Nazila *et al.* Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. **Chemical Reviews** v. 116, n. 4, p. 2602–2663 , 24 fev. 2016.

KAZIEM, Amir E *et al.* a-Amylase triggered carriers based on cyclodextrin anchored hollow mesoporous silica for enhancing insecticidal activity of avermectin against *Plutella xylostella*. **Journal of Hazardous Materials** v. 359, p. 213–221 , 2018.

LIANG, You *et al.* Development of Novel Urease-Responsive Pendimethalin Microcapsules Using Silica-IPTS-PEI As Controlled Release Carrier Materials. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering** v. 5, n. 6, p. 4802–4810 , 2017.

LIU, Yao *et al.* Synthesis, characterization, and application of microbe-triggered controlled-release kasugamycin-pectin conjugate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 63, n. 17, p. 4263–4268 , 2015.

LUO, Yangchao *et al.* Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of  $\alpha$ -tocopherol, and its in vitro controlled release study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** v. 85, n. 2, p. 145–152 , 1 jul. 2011.

LUO, Yangchao; TENG, Zi; WANG, Qin. Development of zein nanoparticles coated with carboxymethyl chitosan for encapsulation and controlled release of vitamin D3. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 60, n. 3, p. 836–843 , 2012.0021-8561.

MOTHÉ, Cheila G.; DAMICO, Aline; MACHADO, Maria da Glória S. Estudo termoanalítico, CLAE e fracionamento físico e químico do subproduto industrial do milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** v. 25, n. 1, p. 1–7 , mar. 2005.

NEČAS, David; KLAPETEK, Petr. Gwyddion: an open-source software for SPM data analysis. **Open Physics** v. 10, n. 1, p. 181–188 , 2011.

NORONHA, Carolina Montanheiro *et al.* Characterization of antioxidant methylcellulose film incorporated with  $\alpha$ -tocopherol nanocapsules. **Food Chemistry** v. 159, p. 529–535 , 15 set. 2014.

OLIVEIRA, Jhones Luiz De *et al.* Hydrogels Containing Botanical Repellents Encapsulated in Zein Nanoparticles for Crop Protection Hydrogels Containing Botanical Repellents Encapsulated in Zein Nanoparticles. **Applied Nanomaterials** p. 1–33 , 2019.

OLIVEIRA, Jhones L.De *et al.* Zein Nanoparticles as Eco-Friendly Carrier Systems for Botanical Repellents Aiming Sustainable Agriculture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 66, n. 6, p. 1330–1340 , 2018.

OLIVEIRA, Jhones Luiz *et al.* Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: Prospects and promises. **Biotechnology Advances** v. 32, n. 8, p. 1550–1561 , 2014.1873-1899 (Electronic)r0734-9750 (Linking).

PANT, Megha; DUBEY, Saurabh; PATANJALI, P. K. Recent Advancements in Bio-botanical Pesticide Formulation Technology Development. **Herbal Insecticides, Repellents and Biomedicines: Effectiveness and Commercialization**. [S.l.]: Springer, New Delhi, 2016. p. 117–126. Disponível em: <[https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-81-322-2704-5\\_7](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-81-322-2704-5_7)>. Acesso em: 18 jun. 2018. 978-81-322-2702-1.

PARRIS, Nicholas; COOKE, Peter H.; HICKS, Kevin B. Encapsulation of Essential Oils in Zein Nanospherical Particles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 53, n. 12, p. 4788–4792 , jun. 2005.

PASCOLI, Mônica *et al.* Neem oil based nanopesticide as an environmentally-friendly formulation for applications in sustainable agriculture : An ecotoxicological perspective. **Science of the Total Environment** v. 677, p. 57–67 , 2019.

PATANKAR, Aparna G. *et al.* Complexity in specificities and expression of *Helicoverpa armigera* gut proteinases explains polyphagous nature of the insect pest. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** v. 31, n. 4–5, p. 453–464 , mar. 2001.

PAWAR, Vivek K. *et al.* Targeting of gastrointestinal tract for amended delivery of protein/peptide therapeutics: Strategies and industrial perspectives. **Journal of Controlled Release** v. 196, p. 168–183 , dez. 2014.

PEREIRA, A. E. S. *et al.*  $\gamma$ -Polyglutamic acid/chitosan nanoparticles for the plant growth regulator gibberellic acid: Characterization and evaluation of biological activity. **Carbohydrate Polymers** v. 157, p. 1862–1873 , 10 fev. 2017.

PEREIRA, Anderson E.S. *et al.* Application of poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles containing atrazine herbicide as an alternative technique to control weeds and reduce damage to the environment. **Journal of Hazardous Materials** v. 268, p. 207–215 , mar. 2014.

PERUMAL, Omathanu; ALQAHTANI, Mohammed Saeed A. *Novel core-shell nanoparticles for oral drug delivery* . [S.l: s.n.]. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/EP3003281B1/en?q=zein&q=nanoparticles&q=enzyme&q=responsive&oq=zein+nanoparticles+enzyme+responsive>>. Acesso em: 3 fev. 2020. , 19 set. 2018

PROENÇA, Patrícia L. F. *Sistema nanocarreador de zeina para compostos bioativos (óleo de menta, cipermetrina, clorpirifós e amitraz) visando controle do carrapato bovino*. Disponível em: </paper/Sistema-nanocarreador-de-zeina-para-compostos-(%C3%B3leo-Proen%C3%A7a/620839757a63382b6979d4bd0dc40634f3b2e25a)>. Acesso em: 3 jul. 2019.

RANGEL, R C C; RANGEL, E C; CRUZ, N C. MODIFICAÇÃO DA MOLHABILIDADE DE CERÂMICAS DE TiO<sub>2</sub> E Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> PELA EXPOSIÇÃO A PLASMAS DE SF<sub>6</sub>. p. 12 , 2004.

RUSSELL, Alan *et al.* *Polymer-Based Protein Engineering Methods to Rationally Tune Enzyme Activity, Ph-Dependence and Stability* . [S.l: s.n.]. Disponível em: <<https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2014176279>>. Acesso em: 3 fev. 2020. , 30 out. 2014

SALMAN, Hesham H. A.; AZCÁRATE, Izaskun Goñi; CATALÁN, Irene Esparza. *Nanoparticles comprising a vegetable hydrophobic protein and a water miscible non-volatile organic solvent and uses thereof*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US20150004102A1/en?q=zein&q=essential+oil>>. Acesso em: 19 jul. 2018. , 1 jan. 2015

SEEMA, DATTA. (6) (PDF) *ORGANOCLAY PLURONIC F68 – MONTMORILLONITE, AS A SUSTAINED RELEASE DRUG DELIVERY VEHICLE FOR PROPRANOLOL HYDROCHLORIDE*. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/280083401\\_ORGANOCLAY\\_PLURONIC\\_F68\\_-\\_MONTMORILLONITE\\_AS\\_A\\_SUSTAINED\\_RELEASE\\_DRUG\\_DELIVERY\\_VEHICLE\\_FOR\\_PROPRANOLOL\\_HYDROCHLORIDE](https://www.researchgate.net/publication/280083401_ORGANOCLAY_PLURONIC_F68_-_MONTMORILLONITE_AS_A_SUSTAINED_RELEASE_DRUG_DELIVERY_VEHICLE_FOR_PROPRANOLOL_HYDROCHLORIDE)>. Acesso em: 12 jan. 2020.

SHEN, Yue *et al.* Construction of Lambda-Cyhalothrin Nano-Delivery System with a High Loading Content and Controlled-Release Property. **Nanomaterials** v. 8, n. 12 , 6 dez. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6315355/>>. Acesso em: 3 jan. 2020.

SIGMA- ALDRICH. *Trypsin Serine Protease Enzyme*. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/trypsin.html>>. Acesso em: 30 dez. 2019.

SINGH, S., EAPEN, S., D'SOUZA, S.F., 2006. Cadmium accumulation and its influence on lipid peroxidation and antioxidative system in an aquatic plant, *Bacopa monnieri* L. **Chemosphere** 62, 233–246.

SOLOMONS *et. al*, 2001. . [S.l: s.n.]. , [S.d.]

SPASOJEVIĆ, Ljiljana *et al.* Edible water barrier films prepared from aqueous dispersions of zein nanoparticles. **LWT** v. 109, p. 350–358 , jul. 2019.

SNOWIEC, A. *et al.* Phytotoxic potential of essential oils from temperate climate plants against the germination of selected weeds and crops. **Journal of Pest Science** v. 90, n. 1, p. 407–419 , 1 fev. 2017.

TORKAMANI, Amir Ehsan *et al.* Encapsulation of polyphenolic antioxidants obtained from *Momordica charantia* fruit within zein/gelatin shell core fibers via coaxial electrospinning. **Food Bioscience** v. 21, p. 60–71 , fev. 2018.

WANG, Hongdi *et al.* Facile encapsulation of hydroxycamptothecin nanocrystals into

zein-based nanocomplexes for active targeting in drug delivery and cell imaging. **Acta Biomaterialia** v. 61, p. 88–100 , 1 out. 2017.

WANG, Huixia; SHI, Hui; WANG, Yanhui. The Wetting of Leaf Surfaces and Its Ecological Significances. **Wetting and Wettability** , 16 dez. 2015. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/wetting-and-wettability/the-wetting-of-leaf-surfaces-and-its-ecological-significances>>. Acesso em: 27 dez. 2019.

WELLBURN, Alan R. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. **Journal of Plant Physiology** v. 144, n. 3, p. 307–313 , set. 1994.

YU, Manli *et al.* Tannic acid-based nanopesticides coating with highly improved foliage adhesion to enhance foliar retention. **RSC Advances** v. 9, n. 46, p. 27096–27104 , 2019.

ZHANG, Yaqiong *et al.* Fabrication , characterization and antimicrobial activities of thymol- loaded zein nanoparticles stabilized by sodium caseinate – chitosan hydrochloride double layers. **Food Chemistry** v. 142, p. 269–275 , 2014.

OMAZANNU P. PERUMAR *et al.* *Protein nanocarriers for topical delivery* . [S.l: s.n.]. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/CN103813786A/en>>. Acesso em: 3 fev. 2020. , 21 maio 2014



## REIVINDICAÇÕES

1) **“MÉTODO DE PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCARREADORES PROTEÍCOS PARA LIBERAÇÃO DE COMPOSTOS BOTÂNICOS POR ESTÍMULOS AMBIENTAIS E RESPECTIVAS FORMULAÇÕES”**, mais precisamente trata-se de método de preparo e caracterização de nanocarreadores proteícos permitindo a aplicação agrícola no controle específico de uma determinada praga, reduzindo perdas e efeitos adversos para organismos não-alvo, **caracterizado por** compreender método de preparo e caracterização das nanopartículas de zeína que contém mistura de diferentes compostos botânicos como geraniol, linalol, limoneno, cinamaldeído e nim e suas associações serem suscetíveis a ação enzimática da enzima tripsina.

2) **“MÉTODO DE PREPARO”**, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** compreender as seguintes etapas:

i) as nanopartículas de zeína são preparadas pelo método de precipitação por antissolvente; a zeína (2% m/v) é dissolvida overnight durante o período de 24 horas numa solução hidroetanólica (85:15, v/v);

ii) na sequência essa solução, é submetida a centrifugação à 4500 rpm por 30 minutos, seguido de tratamento térmico a 75°C por 15 minutos e filtração em filtros de seringa;

iii) separadamente é preparada uma solução aquosa de Pluronic F-68 (2% m/v) e o pH da solução ajustado para 8; com a solução de zeína previamente tratada (10 mL) são adicionados 150 mg de cada ativo sendo mistura de limoneno e carvacrol (1:1 v:v), mistura de geraniol e cinamaldeído (1:1 v:v) e mistura de nim e linalol (1:1 v:v) agitando para completa dissolução dos óleos, sendo posteriormente a solução orgânica contendo os ativos foi injetada a solução aquosa de surfactante (30 mL) sob agitação magnética;

iv) a dispersão coloidal resultante é rotaevaporada para evaporação do etanol, sendo se necessário adição de água a pH 8 para o volume perdido em excesso;

v) uma partícula controle é preparada sem a adição dos ativos;

vi) a solução final de cada formulação contendo a mistura dos compostos botânicos contém a concentração de 5 mg/mL de ambos ativos.

3) **“MÉTODO DE CARACTERIZAÇÃO”**, de acordo com a reivindicação 1,

**caracterizado por** método de caracterização físico-química das nanopartículas de zeína apresenta as seguintes etapas:

- i) as formulações preparadas são caracterizadas pelo seu diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão, potencial zeta, concentração, pH e eficiência de encapsulação; a técnica de espectroscopia de correlação de fótons (espalhamento de luz) é empregada para a determinação do diâmetro hidrodinâmico e o índice de polidispersão (PDI), já para o potencial a técnica de microeletroforese;
- ii) para ambas medidas, as nanopartículas são diluídas (1:200, v:v) com água deionizada sem ajuste de pH e analisadas;
- iii) a técnica de rastreamento de nanopartículas (NTA) é empregado para determinar a concentração e tamanho das nanopartículas; para realização desta análise utiliza-se uma célula NanoSight LM 10 (laser verde, 532 nm), uma câmera sCMOS e 'software' *NanoSight*;
- iv) as diluições das suspensões de nanopartículas são realizadas em água deionizada (1:6000, v:v); onde são realizados 5 vídeos de 60 segundos em temperatura ambiente (25°C), compreendendo uma leitura de aproximadamente 100 partículas por frame;
- v) o monitoramento do pH é realizado utilizando um potenciômetro, calibrado com soluções tampão em pH 4,0 e 7,0 e controle de temperatura; para cada amostra são realizadas três medidas e o resultado foi expresso como média dessas determinações;
- vi) a eficiência de encapsulação dos compostos botânicos nas nanopartículas de zeína é determinada pelo método de ultrafiltração/centrifugação, o qual é submetida a suspensão de nanopartículas a centrifugação utilizando dispositivos de celulose regenerada com poro de exclusão 10 kDa em uma centrífuga (NT 805) por 15 minutos à 24.0000 g.

4) **“MÉTODO DE PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCARREADORES PROTEÍCOS PARA LIBERAÇÃO DE COMPOSTOS BOTÂNICOS POR ESTÍMULOS AMBIENTAIS”**, de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, **caracterizado por** a condição para a atividade ser preferencialmente de pH 8,0, 37°C e 22 U/mL tripsina.

5) **“MÉTODO DE PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCARREADORES PROTEÍCOS PARA LIBERAÇÃO DE COMPOSTOS BOTÂNICOS POR ESTÍMULOS**

**AMBIENTAIS**”, de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, **caracterizado por** incorporação de bioativos oleosos em uma matriz proteica compor a dispersão aquosa dos mesmos.

6) **“FORMULAÇÕES”**, de acordo com a reivindicações 1, 2, 3, 4 e 5, **caracterizado pelo fato** da formulação conter a mistura dos compostos Nim+Linalol e Geraniol+Cinamaldeído.

7) **“FORMULAÇÕES”**, de acordo com a reivindicações 1, 2, 3, 4 e 5, **caracterizado pelo fato** das formulações de nanopartícula conter compostos ativos de limoneno e carvacrol (ZPN LIM+CVC) e seu respectivo controle (ZPN).

8) **“FORMULAÇÕES”**, de acordo com a reivindicações 1, 2, 3, 4 e 5, **caracterizado pelo fato** da formulação conter a mistura dos compostos geraniol e cinamaldeído e nim e linalol.

FIG. 1A

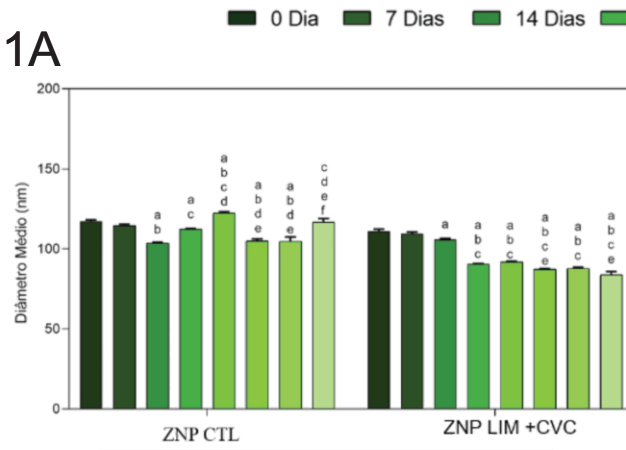


FIG. 1B

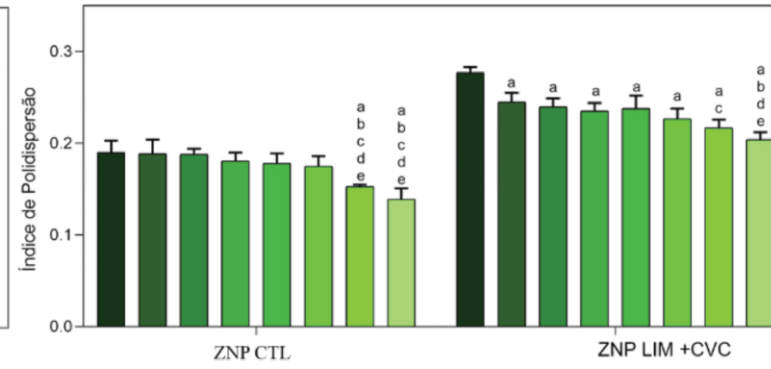


FIG. 1C

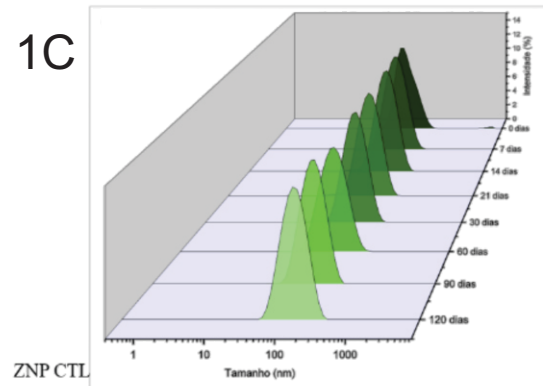


FIG. 1D

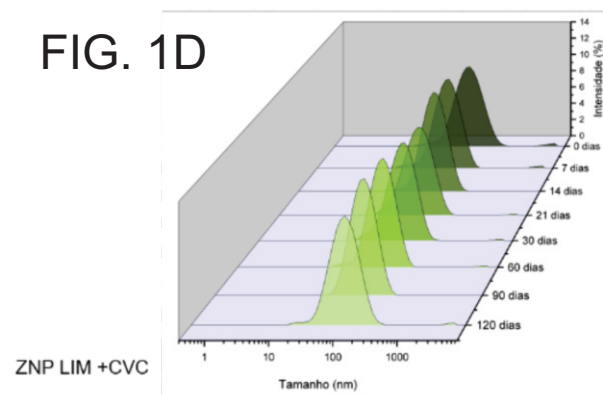


FIG. 2A

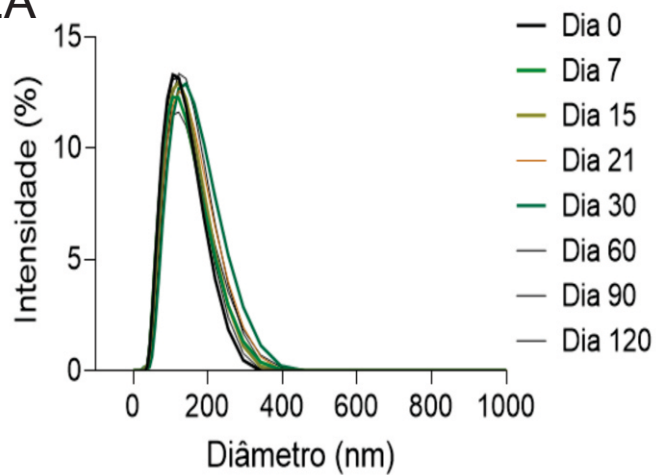


FIG. 2B

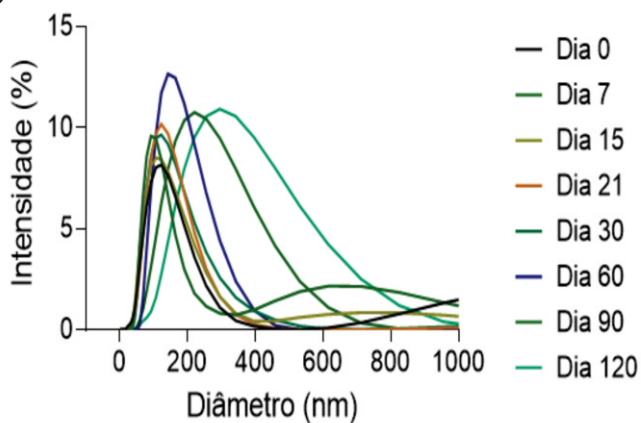


FIG. 2C

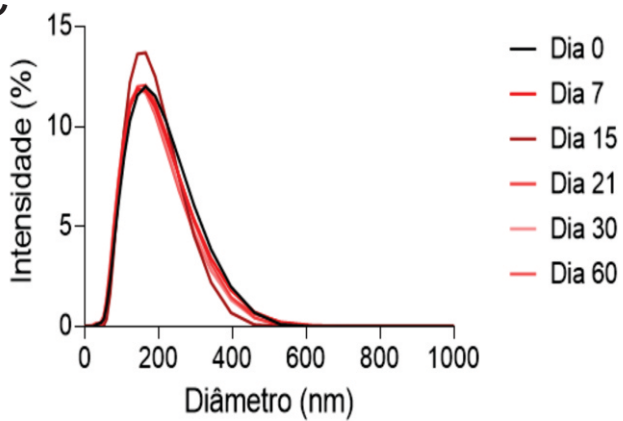


FIG. 3A

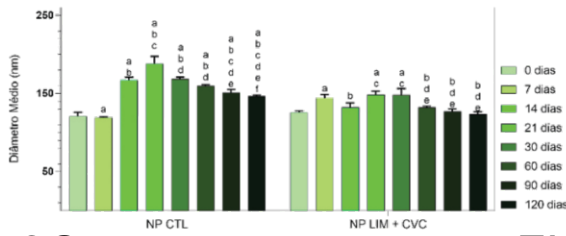


FIG. 3B

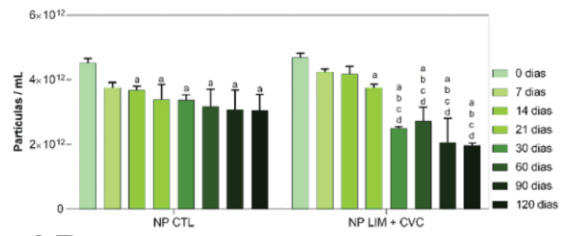


FIG. 3C

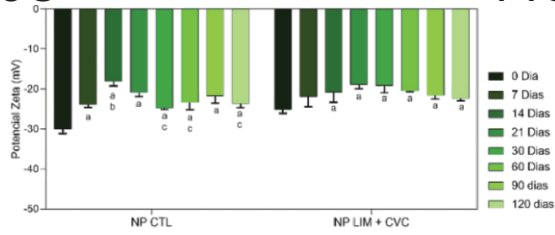


FIG. 3D

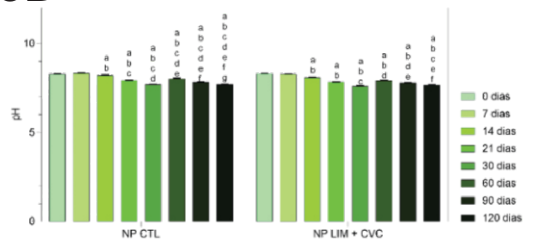


FIG. 3E

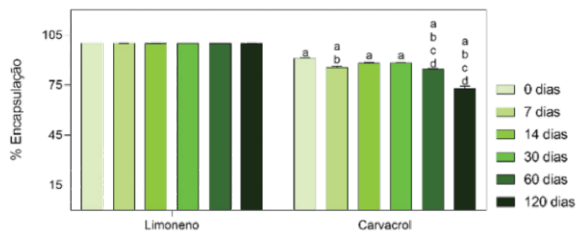


FIG. 4A

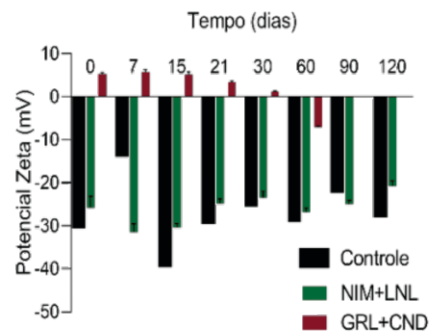


FIG. 4B

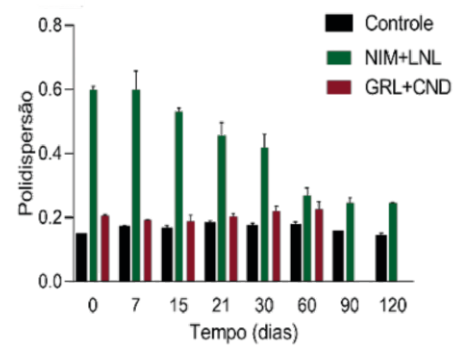


FIG. 4C

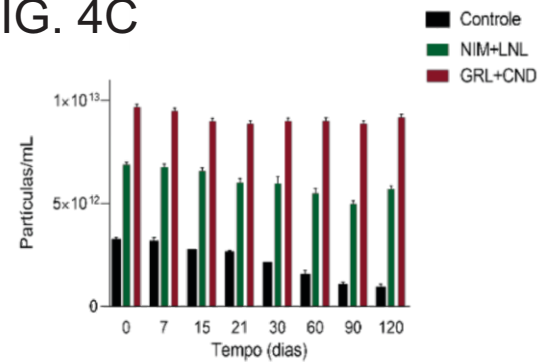


FIG. 5A

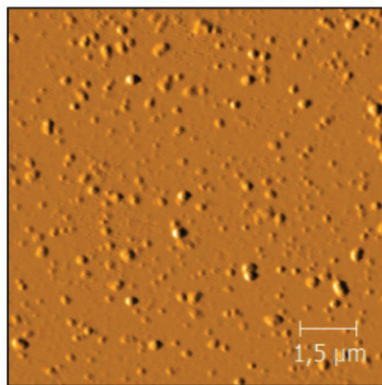


FIG. 5B

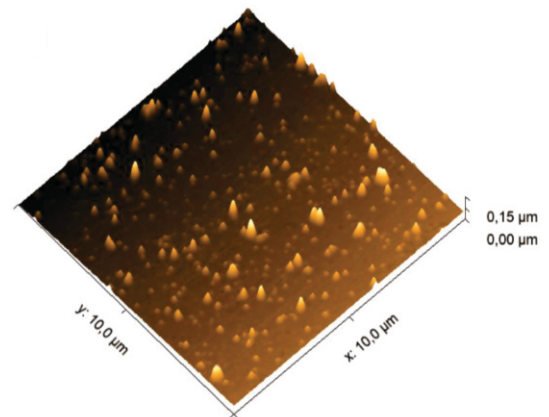


FIG. 5C

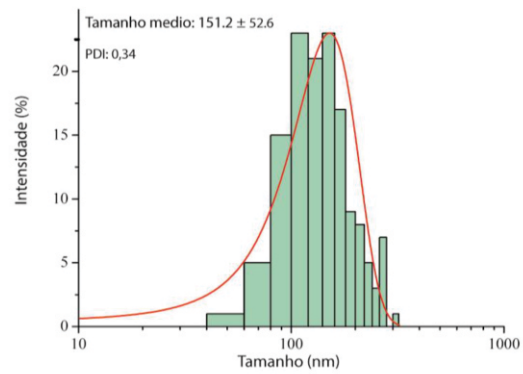




FIG. 6A

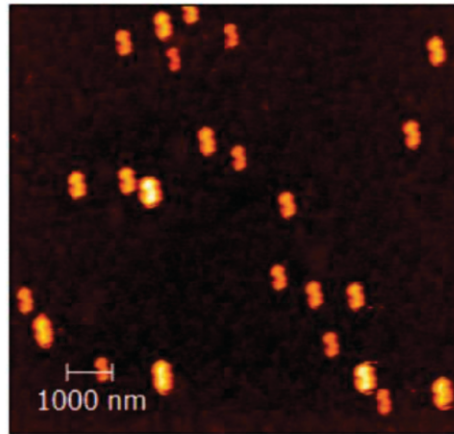


FIG. 6B

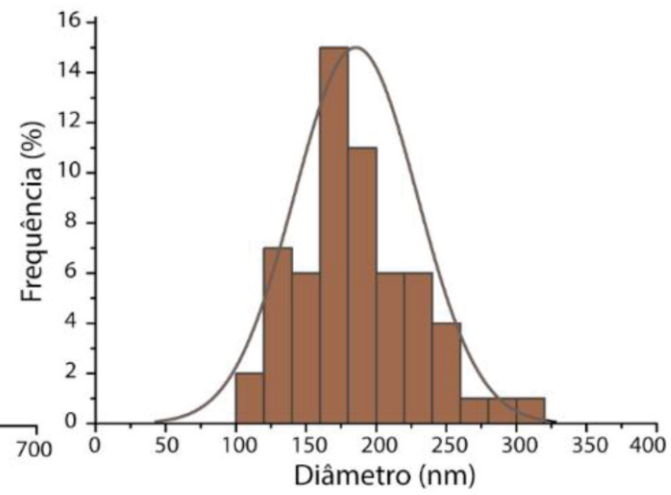
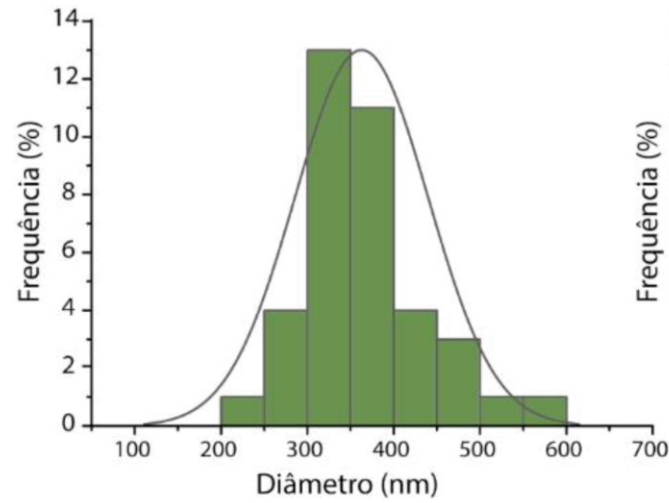
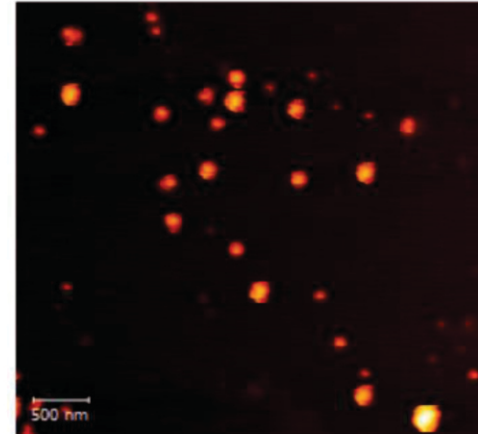


FIG. 7

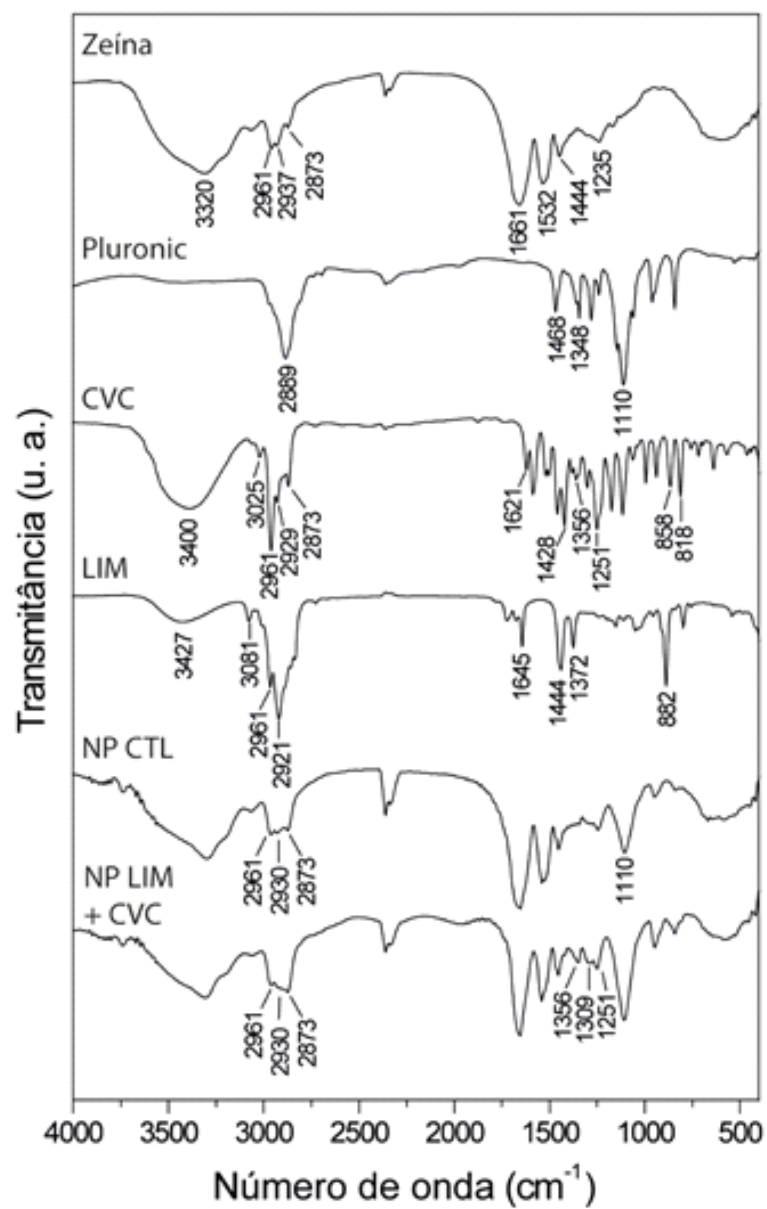


FIG. 8

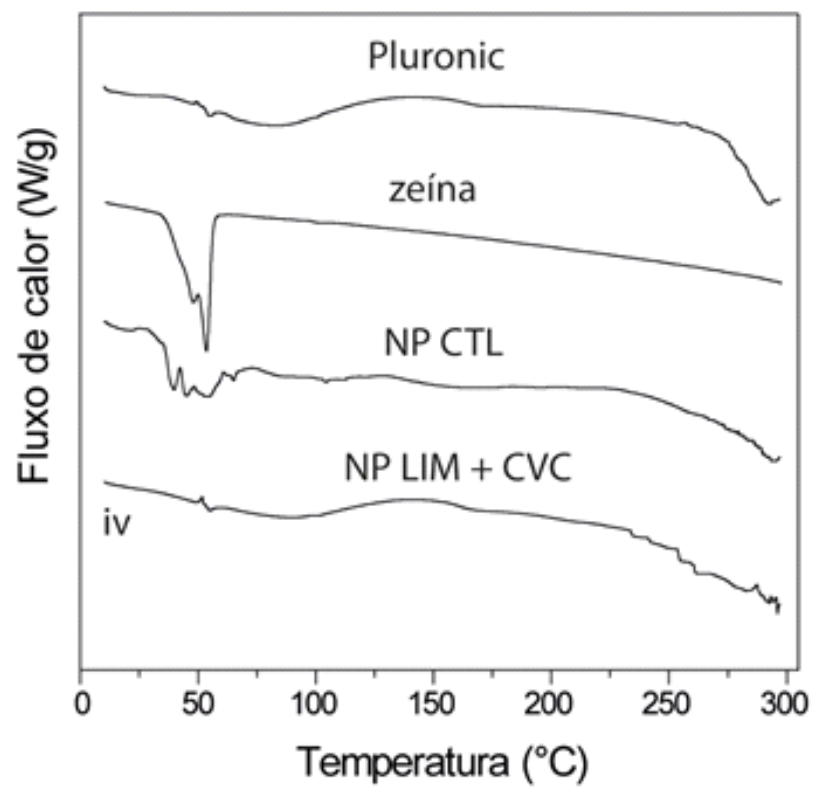


FIG. 9

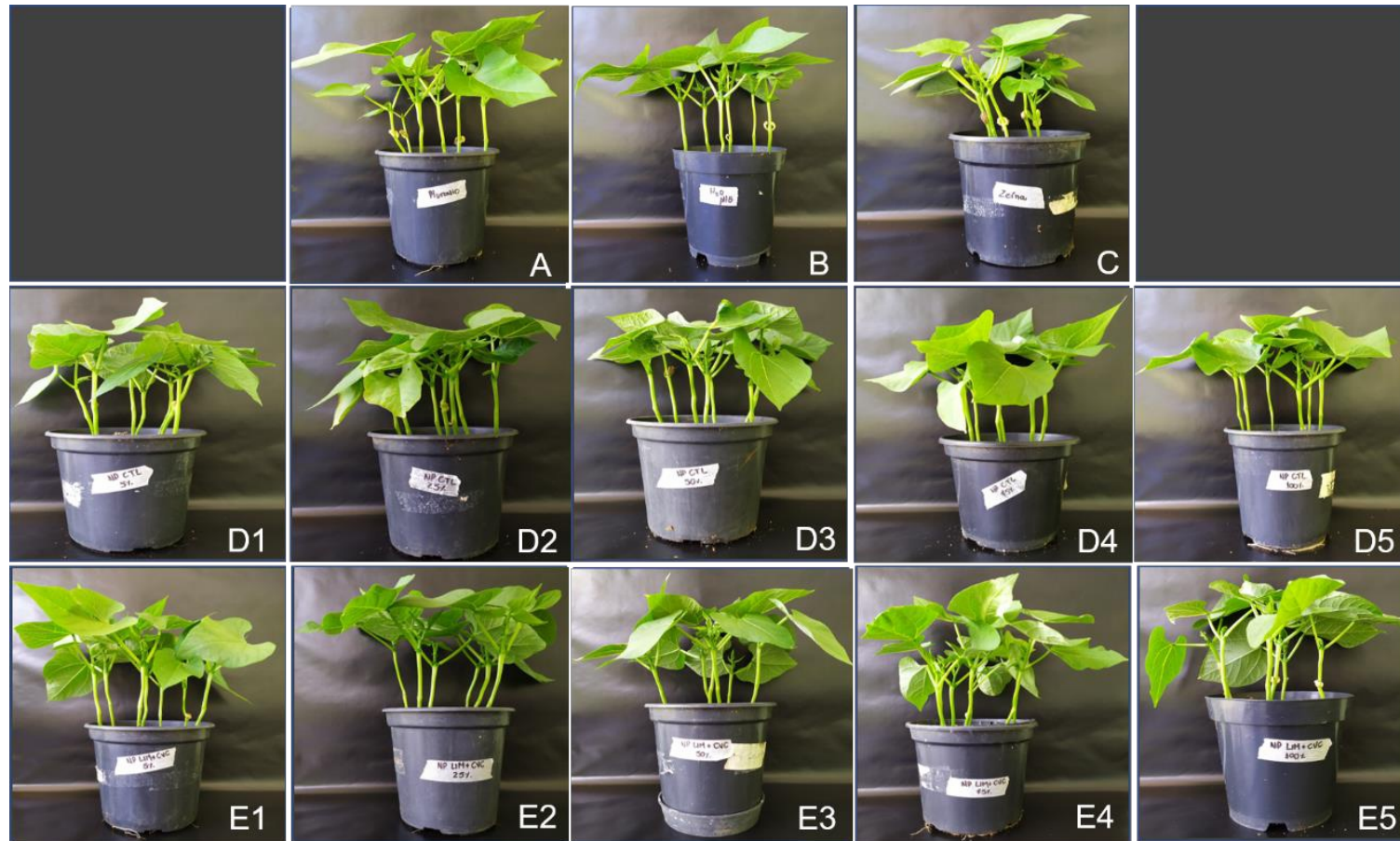


FIG. 10

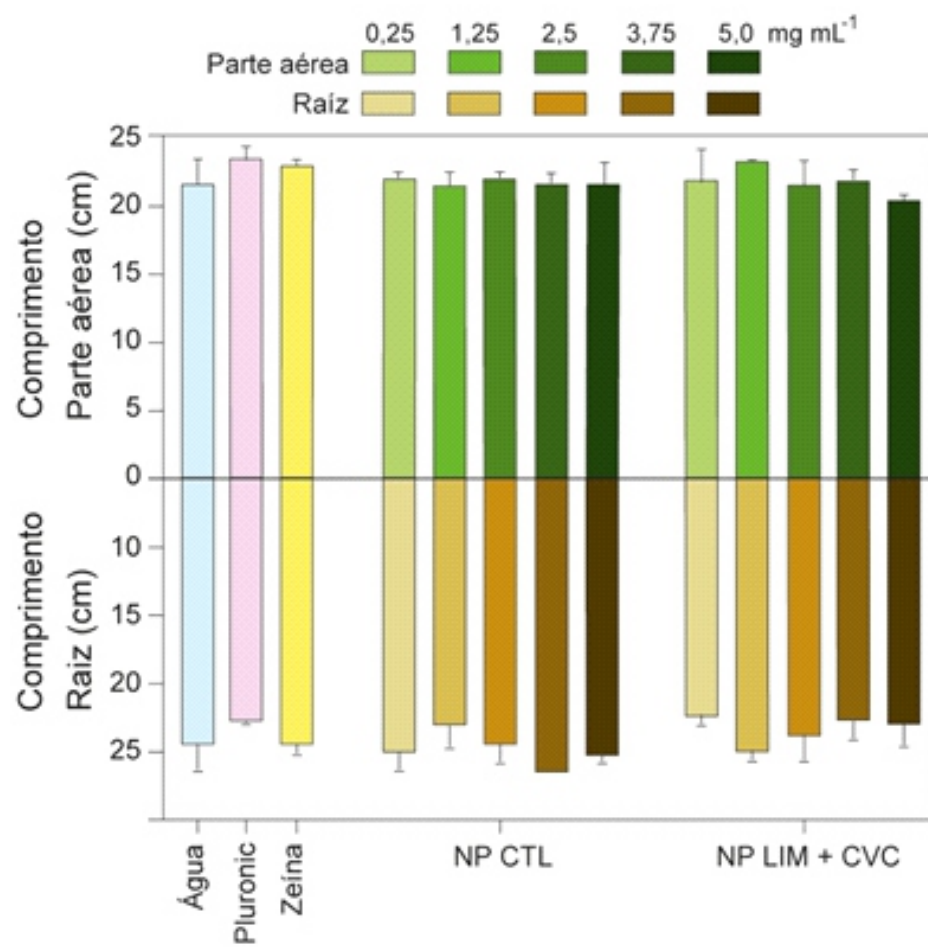


FIG. 11A

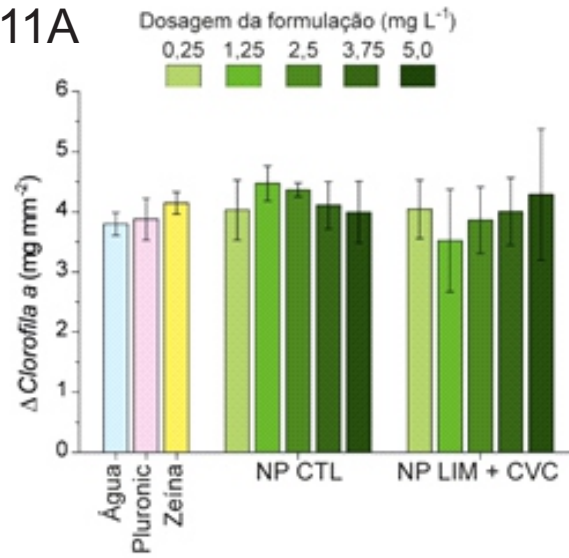


FIG. 11B

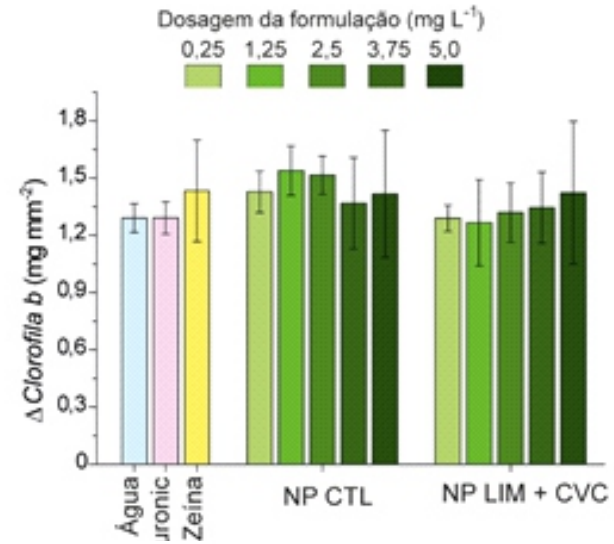


FIG. 11C

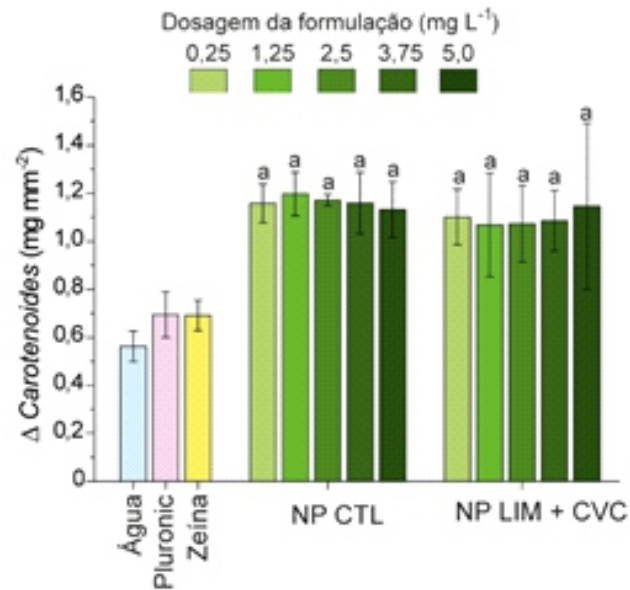


FIG. 12A

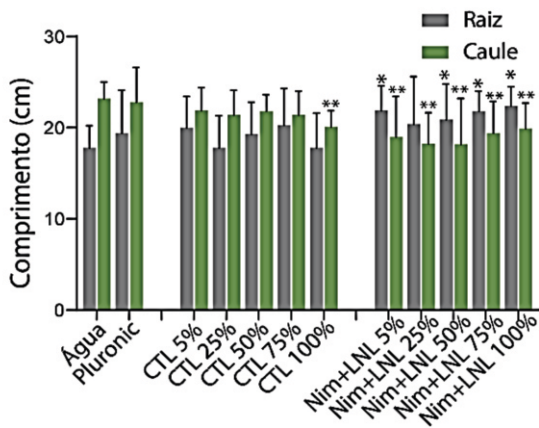


FIG. 12B

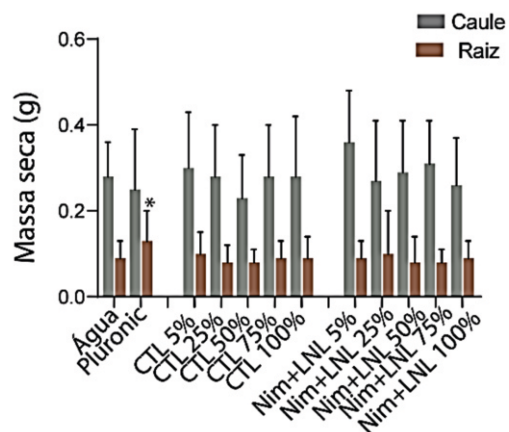


FIG. 12C

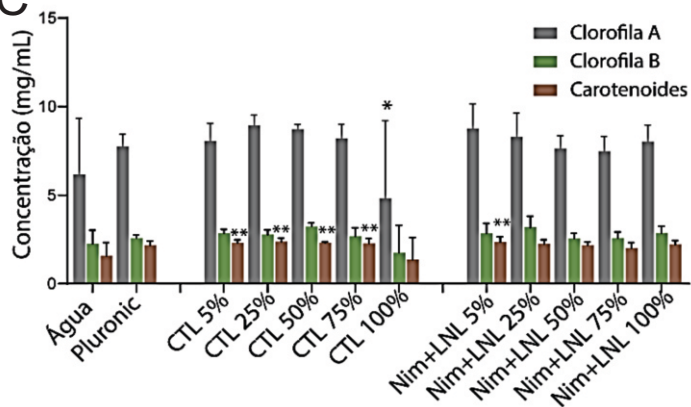


FIG. 12C

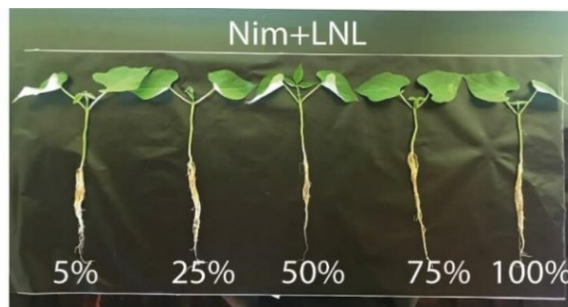
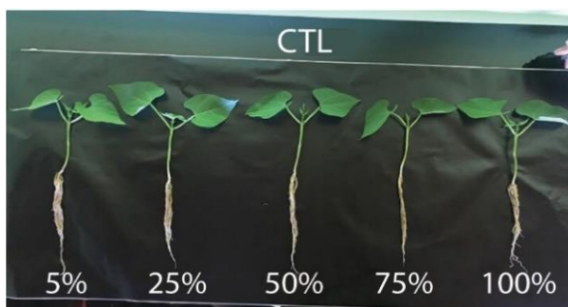


FIG. 13

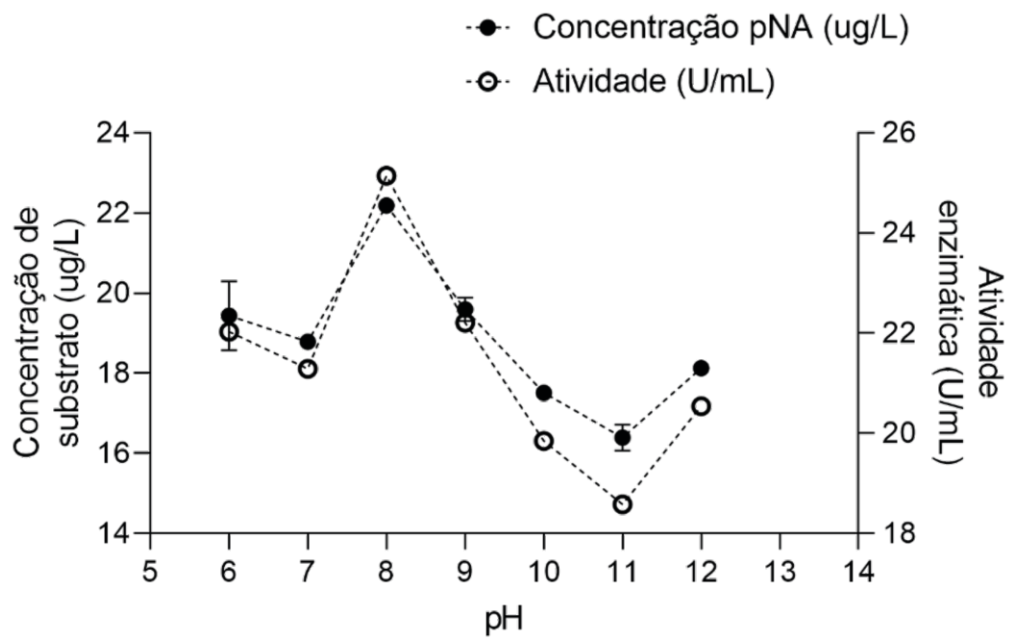




FIG. 14A

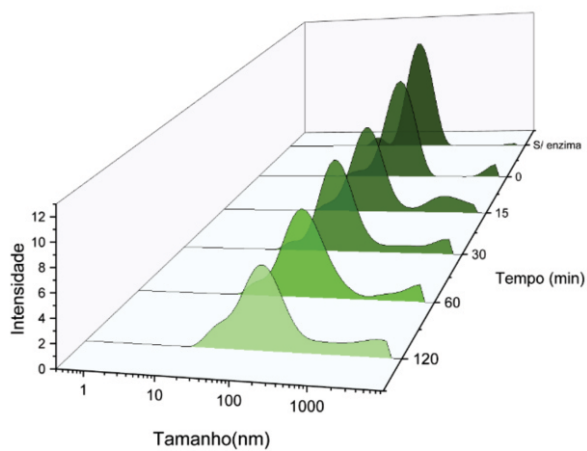


FIG. 14B

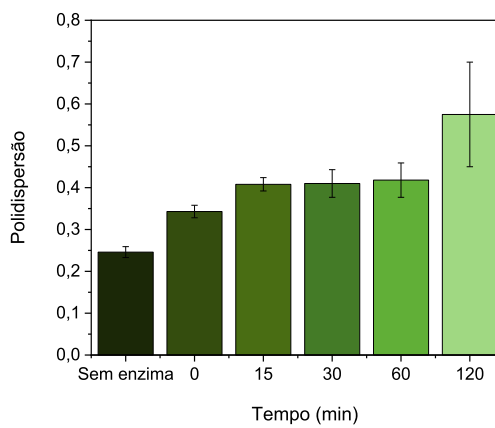


FIG. 14C

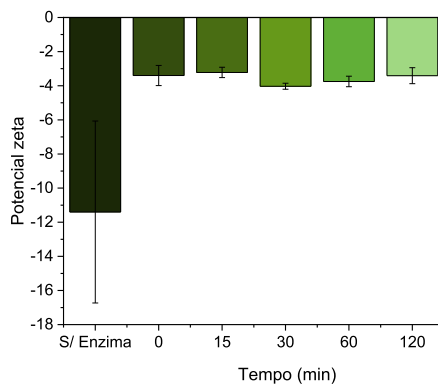


FIG. 14D

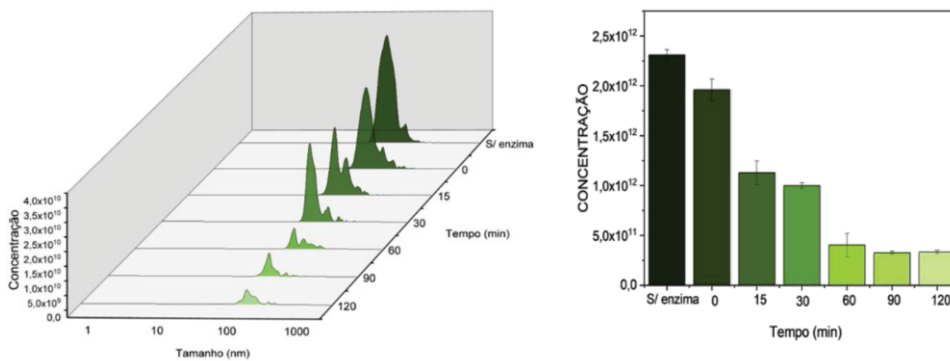


FIG. 15

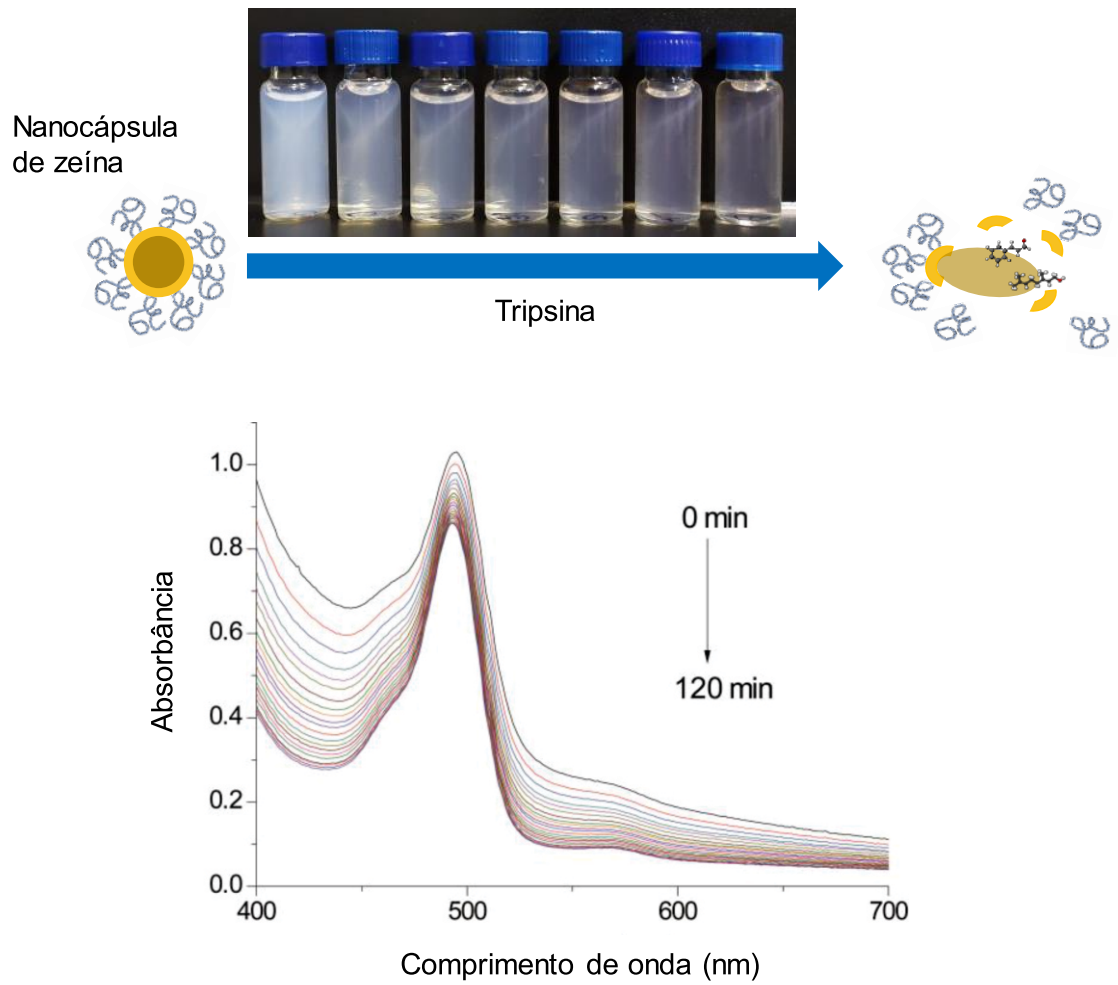


FIG. 16A

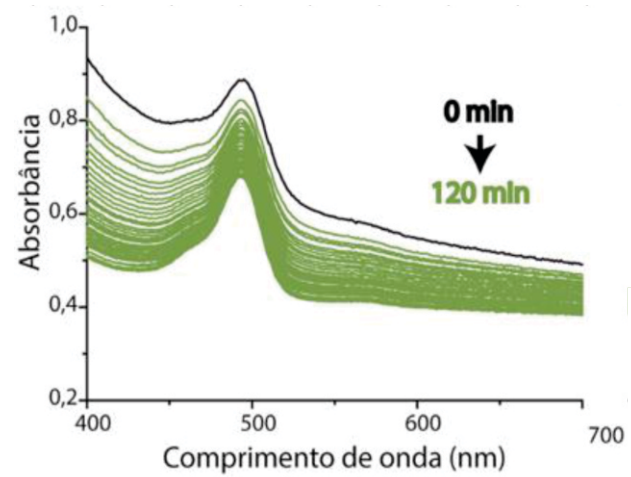


FIG. 16B

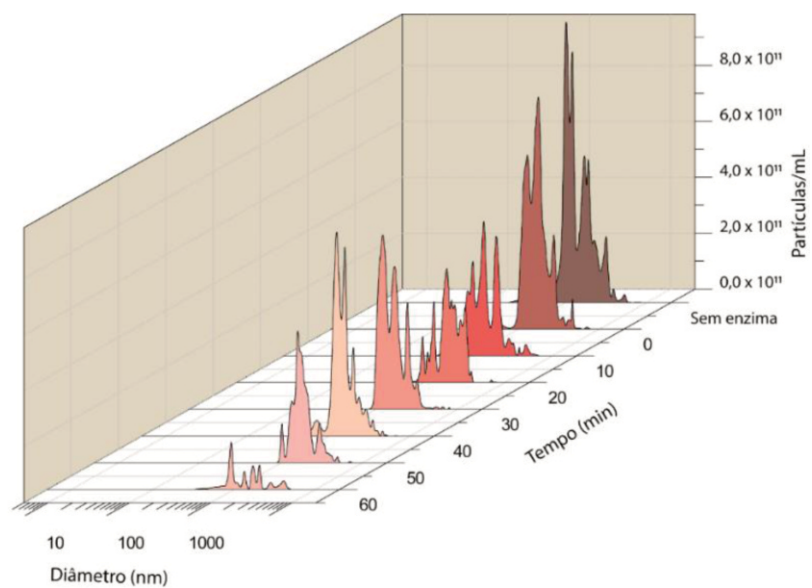
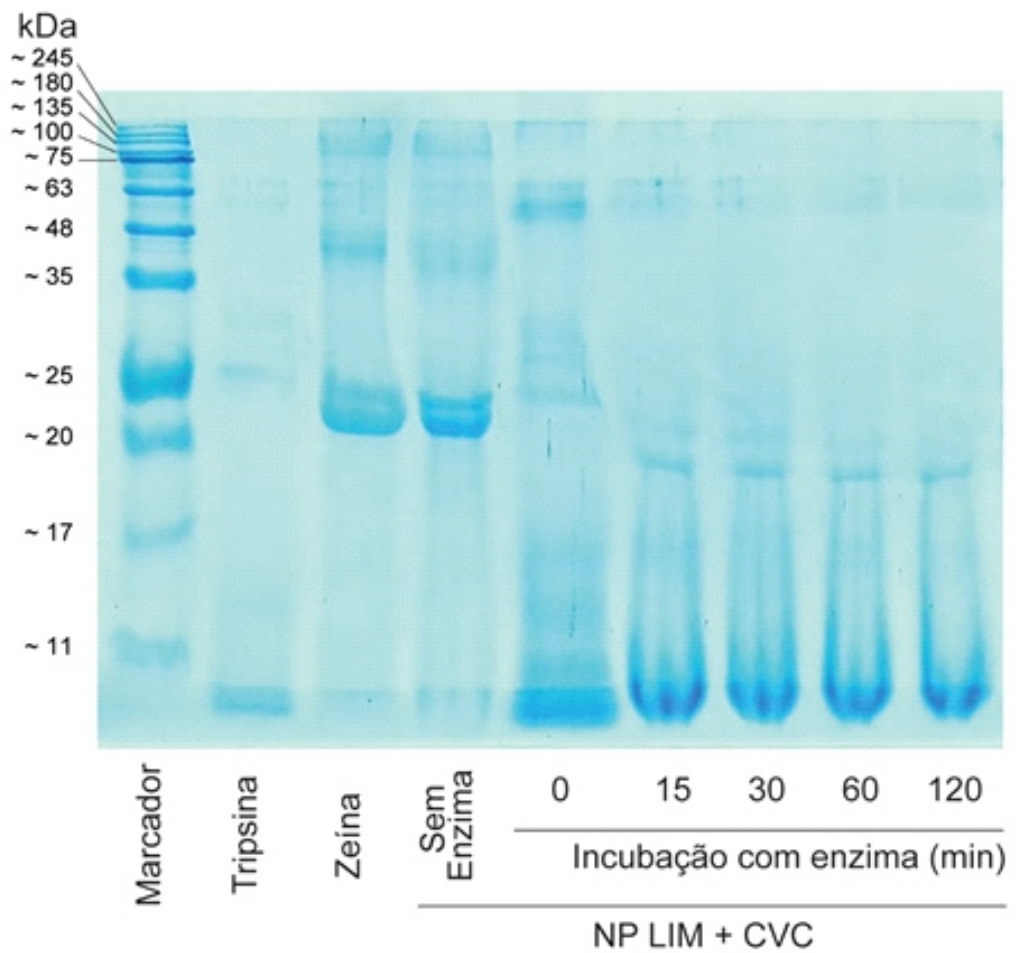


FIG. 17



RESUMO

**“MÉTODO DE PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCARREADORES PROTEÍCOS PARA LIBERAÇÃO DE COMPOSTOS BOTÂNICOS POR ESTÍMULOS AMBIENTAIS E RESPECTIVAS FORMULAÇÕES”.**

Trata-se de método de preparo e caracterização de nanocarreadores proteícos permitindo a aplicação agrícola no controle específico de uma determinada praga, reduzindo perdas e efeitos adversos para organismos não-alvo; dito método de preparo e caracterização das nanopartículas de zeína que contém mistura de diferentes compostos botânicos como geraniol, linalol, limoneno, cinamaldeído e nim e suas associações serem suscetíveis a ação enzimática da enzima tripsina.