



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Ilha Solteira

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

**NANOCARREADORES MAGNÉTICOS PARA LIBERAÇÃO
CONTROLADA DE HERBICIDA: PREPARO,
CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA
EM MACRÓFITAS**

Luiz Aparecido Ferreira Cavalcante

Ilha Solteira - SP
Agosto/2021



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Ilha Solteira

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

**NANOCARREADORES MAGNÉTICOS PARA LIBERAÇÃO
CONTROLADA DE HERBICIDA: PREPARO,
CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA
EM MACRÓFITAS**

Luiz Aparecido Ferreira Cavalcante

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – UNESP como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência dos Materiais.

Área de conhecimento: Química dos Materiais

Orientador: *Prof. Dr. Renato Grillo*

Ilha Solteira - SP
Agosto/2021

FICHA CATALOGRÁFICA
Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Cavalcante, Luiz Aparecido Ferreira.
C376n Nanocarreadores magnéticos para liberação controlada de herbicida:
preparo, caracterização e avaliação ecotoxicológica em macrófitas / Luiz
Aparecido Ferreira Cavalcante. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2021
67 f. : il.


Dissertação (Mestrado em Ciências dos Materiais) - Universidade Estadual
Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento:
Engenharia Agrônômica, 2021

Orientador: Renato Grillo
Inclui bibliografia

1. Nanopesticidas. 2. Sistema de liberação. 3. Polímeros.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Ilha Solteira


Raiane da Silva Santos
Supervisora Técnica de Seção
Seção Técnica de Referência, Atendimento ao usuário e Documentação
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
CRB/8 - 9999

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: NANOCARREADORES MAGNÉTICOS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE
HERBICIDA: PREPARO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO
ECOTOXICOLÓGICA EM MACRÓFITAS**

AUTOR: LUIZ APARECIDO FERREIRA CAVALCANTE

ORIENTADOR: RENATO GRILLO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIA DOS MATERIAIS,
área: Química dos Materiais pela Comissão Examinadora:

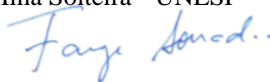
Prof. Dr. RENATO GRILLO (Participação Virtual)

Departamento de Física e Química / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP



Prof. Dr. FAUZE AHMAD AOUADA (Participação Virtual)

Departamento de Física e Química / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP



Prof. Dr. ETENALDO FELIPE SANTIAGO (Participação Virtual)

Programa de Pós Graduação em Recursos Naturais / Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul - UEMS



Ilha Solteira, 31 de agosto de 2021

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”. (Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por ter me dado força e saúde para chegar até aqui, pois a luta não foi fácil.

A minha mãe Maria Cristina, pois sem ela nada disso seria possível, uma guerreira que nunca deixou de lutar comigo nessa batalha, se hoje estou aqui o mérito é toda dela, ao meu padrasto Francisco, é como um pai que nos momentos difíceis esteve ali sempre com uma palavra de apoio e é um grande exemplo de vida, a minha tia Angela e meu pai Aparecido, que também sempre estiveram ao meu lado.

Às minhas irmãs e sobrinhas, pelo incentivo, que mesmo distante sempre estiveram presentes em cada etapa da minha vida. E que eu possa ser um exemplo para essas minhas queridas, que tudo é possível.

Aos meus amigos Weverton e Gabriel, por estar sempre ao meu lado, me dando forças para alcançar os meus objetivos.

Muito grato ao meu orientador, Prof. Dr. Renato Grillo, pela orientação, conhecimentos transmitidos, inspiração, motivação e paciência de estar ali do nosso lado nos momentos difíceis e comemorando conosco cada conquista. Em especial ao Grupo de Nanoquímica Ambiental: Mariana, Débora, Isabela, Manuela, Érica, Yasmin, Maíra, Milenye aos novos membros desse grupo que só vem aumentando.

A Fernanda, por ser aquela amiga que te chama atenção nas horas certas e elogia as conquistas. Esteve ao meu lado na maioria das vezes até tarde da noite no laboratório mesmo quando terminava as suas análises, uma companheira para toda vida.

Aos pais da Mariana, a Adriana e o Luiz, pela força e dedicação em nos ajudar em viagens a campos e congressos.

A Edneia Borges, que me aconselhou nos momentos de dúvidas, meus professores da graduação que estão super felizes pela conquista.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida e ao CNPq (#427498/2018-0) e a FAPESP (#2019/20124-2 e #2017/21004-5) pelo auxílio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Dos Materiais (PPGCM), UNESP Ilha Solteira.

Ao corpo docente, funcionários e amigos do Departamento de Física e Química (DFQ) da UNESP Campus de Ilha Solteira, pela contribuição na realização desse projeto e no meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço ao Laboratório de Nanotecnologia Ambiental da UNESP de Sorocaba pela análise de DLS, em especial Prof. Dr. Leonardo F. Fraceto pela disponibilidade.

Agradeço também, ao Grupo de Química Analítica e Materiais Nanoestruturados (GAMN) pelo uso de alguns equipamentos importantes para a realização deste trabalho, bem como ao Grupo de Polímeros (GPOL) por permitir o uso do espectrometro de UV/VIS.

Ao Grupo de Estudos em Recursos Vegetais da UEMS, em especial ao Ms. Montcharles da Silva Pontes e ao Prof. Dr. Etenaldo F. Santiago pelas análises em plantas aquáticas.

Ao Prof. Dr. Fauze A. Aouada, que me ensinou e por muitas vezes tirou dúvidas sobre o sistema de planejamento fatorial.

E à todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Atualmente inúmeras tecnologias estão surgindo a fim de melhorar as práticas agrícolas e aumentar a produção alimentar. O desenvolvimento de nanopesticidas é um exemplo disto, em que defensivos agrícolas podem estar encapsulados em nanoestruturas, permitindo assim um controle da liberação destes ativos no ambiente. Entretanto, o desenvolvimento de nanopesticidas, capazes de serem manipulados e aptos a liberarem ativos de forma responsiva ao ambiente, ainda é um desafio. Neste sentido, um planejamento fatorial com ponto central foi utilizado, neste estudo, para auxiliar no desenvolvimento de dois novos nanocarreadores híbridos de poli- ϵ -caprolactona magnéticos (NCs - PCL), um sem e outro revestidos com quitosana (CS), a fim de produzir um sistema de liberação responsivo ao pH para o herbicida atrazina (ATZ) com propriedade magnética. Além disso, a caracterização físico-química dos nanocarreadores (sem e contendo o revestimento com quitosana) foi estudada por diferentes técnicas físico-químicas, bem como o perfil de cinética de liberação *in vitro* do herbicida e o efeito ecotoxicológico dos nanopesticidas em macrófitas aquáticas foi avaliado. Os nanocarreadores apresentaram tamanho de 659 nm para os nanopesticidas sem quitosana (PCL/ATZ Fe₃O₄@OA) e 631 nm para os nanopesticidas revestidos com quitosana (PCL/ATZ Fe₃O₄@OA CS), potencial zeta de -21,9 mV e +11,2 mV, respectivamente, além de boa estabilidade coloidal e índice de polidispersão menor que 0,2 para ambas as formulações. Ensaio de cinética de liberação mostraram que os nanopesticidas revestidos com quitosana (PCL/ATZ Fe₃O₄@OA CS) foram responsivos ao pH, apresentando maior liberação em pH ácido. Ensaio de ecotoxicidade em macrófitas aquáticas (*Azolla Caroliniana*) mostraram que a atrazina não encapsulada apresentou um efeito tóxico mais rápido em relação aos nanopesticidas em função do tempo. Além disso, os nanopesticidas foram aplicados em solo e água, e devido a sua característica magnética foi possível recuperar os sistemas em ambas as matrizes. Desta forma, tais nanopesticidas híbridos abrem novos caminhos para o uso de liberação de pesticidas para a agricultura, uma vez que sua liberação pode ser controlada pela variação de pH, bem como, podem ser coletados (em caso de toxicidade) ou rastreados, quando se deseja estudar o destino e comportamento deles no ambiente, algo tão complexo de se fazer atualmente com as técnicas analíticas existentes.

Palavras chaves: nanopesticidas, polímeros, sistemas de liberação, pesticidas, materiais híbridos, nanotoxicologia.

ABSTRACT

Currently, numerous technologies are emerging in order to improve agricultural practices and increase food production. The development of nanopesticides is an example of this, in which agricultural pesticides can be encapsulated in nanostructures, thus allowing control of the release of these actives in the environment. However, the development of nanopesticides, capable of being manipulated and releasing actives in a responsive way to the environment, is still a challenge. In this sense, a central point factorial design was used in this study to assist in the development of two new magnetic poly- ϵ -caprolactone hybrid nanocarriers (NCs - PCL), one without and the other coated with chitosan (CS), in order to produce a pH-responsive delivery system for the magnetic-property herbicide atrazine (ATZ). In addition, the physicochemical characterization of nanocarriers (without and containing the coating with chitosan) was studied by different physicochemical techniques and the *in vitro* release kinetic profile of the herbicide and the ecotoxicological effect of nanopesticides on aquatic macrophytes was rated. The nanocarriers had a size of 659 nm for the nanopesticides without chitosan (PCL/ATZ Fe₃O₄@OA) and 631 nm for the nanopesticides coated with chitosan (PCL/ATZ Fe₃O₄@OA CS), the zeta potential of -21.9 mV and +11.2 mV, respectively, in addition to good colloidal stability and polydispersion index less than 0.2 for both formulations. Release kinetic assays showed that chitosan-coated nanopesticides (PCL/ATZ Fe₃O₄@OA CS) were pH-responsive, showing higher release kinetics at acidic pH. Ecotoxicity assays on aquatic macrophytes (*Azolla Caroliniana*) showed that unencapsulated atrazine had a faster toxic effect than nanopesticides as a function of time. In addition, nanopesticides were applied to soil and water, and due to their magnetic characteristics, it was possible to recover the systems in both environments. In this way, such hybrid nanopesticides open new paths for the use of pesticide release for agriculture, since their release can be controlled by pH variation, as well as, they can be collected (in case of toxicity) or tracked when wants to study their fate and behavior in the environment, something so complex to do today with existing analytical techniques.

Keywords: nanopesticides, polymers, release systems, pesticides, hybrid materials, nanotoxicology.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AFM	Microscopia de Força Atômica
ANOVA	Análise de Variância
ATZ	Atrazina
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CS	Quitosana
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz
E.E(%)	Eficiência de Encapsulação (porcentagem)
EC	Contaminante Emergente
ETC	Cadeira de transporte de elétrons
Fe ₃ O ₄	Óxido de Ferro
FeO	Óxido ferroso
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
m/v	Massa/Volume
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Min	Minutos
MO	Matéria Orgânica
MP	Micropartículas
MW	Megawatt
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sódio
NCs	Nanocarreadores
nm	Nanômetros
NPs	Nanopartículas
NTA	Rastreamento de nanopartículas
PCL	Poli (epsilon-caprolactona)
PET	Politereftalato de etileno
PGA	Ácido poliglicólico
pH	Potencial Hidrogeniônico
PLGA	Poli (ácido láctico-glicólico)
POA	Processo Oxidativo Avançado
PVA	Álcool polivinílico
PZ	Potencial zeta
TPP	Tripolifosfato de sódio
UV-VIS	Espectroscopia de absorção molecular no ultravioleta / visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1.Revisão da literatura.....	15
1.1.1. Nanotecnologia e Agricultura.....	15
1.1.2. Sistemas carreadores de liberação de herbicidas.....	17
1.1.3. Poli (ε-caprolactona)	20
1.1.4. Quitosana	20
1.1.5. Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro	21
1.1.6. Efeito ecotoxicológico dos nanopesticidas.....	22
1.1.7. Estudo em macrófitas	22
2. OBJETIVOS	25
2.1. Objetivos específicos.....	25
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	26
3.1.Materiais.....	26
3.2.Métodos.....	26
3.2.1. Padronização do herbicida pela técnica de UV-VIS	26
3.2.2. Planejamento fatorial.....	27
3.2.3. Síntese das nanopartículas inorgânicas	28
3.2.3.1 Síntese de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de Fe estabilizadas com ácido oleico.....	28
3.2.3.2 Síntese dos nanocarreadores poliméricos (PCL).....	28
3.2.4. Revestimento dos nanocarreadores com quitosana	29
3.2.5. Preparo das soluções tampões	30
3.2.6. Caracterização físico-química dos nanoherbicidas magnéticos	30
3.2.6.1 Espalhamento dinâmico de luz e potencial zeta.....	30
3.2.7. Rastreamento de nanopartículas	31
3.2.8. Microscopia eletrônica de varredura	31
3.2.9. Espectroscopia na região do infravermelho	32
3.3. Eficiência de encapsulação.....	33
3.4. Ensaio de liberação <i>in vitro</i> e modelo matemático.....	33
3.5. Estudo das propriedades magnéticas das formulações.....	34
3.6. Efeito ecotoxicológico em macrófitas.....	35
3.6.1. Ensaio de fluorescência de clorofila.....	35
4. Resultados e Discussão	36
4.1.Padronização da metodologia analítica para o herbicida ATZ.....	36
4.2.Planejamento fatorial.....	36
4.3.Caracterização físico-química dos nanoherbicidas.....	43

4.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	44
4.5. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	44
4.6. Eficiência de encapsulação e ensaios de liberação in vitro.....	46
4.6.1. Eficiência de encapsulação.....	46
4.6.2. Ensaio de liberação in vitro	46
4.7. Estudo da capacidade magnéticas dos nanopesticidas híbridos.....	48
4.8. Efeito no aparato fotossintético.....	50
5. Conclusão	53
6. Referências Bibliográficas	54
7. Apêndice: Impacto ambiental e Social.....	67

1. INTRODUÇÃO

É notável a preocupação em aumentar a produção de alimentos no planeta, visto que a população mundial está estimada a crescer cerca de 48% até 2100 (United Nations et al., 2017). Atrelado a isto, com a escassez de áreas cultiváveis e a necessidade de aumentar a produção em espaços reduzidos, cada vez mais os agroquímicos vêm sendo utilizados a fim de melhorar o rendimento de diversas culturas no campo. Tendo uma expansão da demanda global, a produção e o uso de pesticidas e fertilizantes, tem como vendas combinadas crescendo cerca de 4,1% ao ano e projetadas para atingir US \$ 309 bilhões em 2025 (FAO et al., 2021). Entretanto, sabe-se que apesar de seus benefícios, grande parte destes ativos aplicados no campo são perdidos no ambiente, devido a problemas físico-químicos, aplicação inadequada e condições ambientais adversas (Nuruzzaman et al., 2016), além de estar associado aos problemas relacionados com uma resistência a pesticidas, com a contaminação de ecossistemas terrestres e envenenamento de alimentos humanos. (Carvalho et al., 2017).

Nos dias atuais, com o crescimento da aplicação da nanobiotecnologia novos caminhos vêm sendo trilhados para se chegar a uma agricultura mais precisa e sustentável (Grillo et al., 2021). Algumas ferramentas e técnicas vêm sendo criadas, como o desenvolvimento de nanoformulações de liberação modificada de ativos (também conhecido como nanopesticidas), nanomateriais para o tratamento de sementes, encapsulação de agentes biológicos em micropartículas, entre outras (Grillo et al., 2016). A fabricação de nanoformulações para a agricultura tem mostrado grande potencial nos últimos anos, principalmente relacionados à liberação modificada de pesticidas (Grillo et al., 2021). Inúmeros são os sistemas carreadores produzidos para pesticidas, entre eles estão as nanopartículas poliméricas, os quais podem ser constituídos por diferentes tipos de polímeros, tanto de origem sintética (e.x. policaprolactona (PCL), ácido polilático (PLA), ácido poliglicólico (PGA), poli (ácidolático-glicólico) (PLGA), quitosana (CS)), como de origem natural (quitina, alginato), entre outros.

Tais nanopesticidas possuem tamanho reduzido e grande superfície de contato e, vem melhorando a ação de diversos herbicidas (Grillo et al., 2014a; Pereira et al., 2014b; de Oliveira et al., 2015; Oliveira et al., 2015b), fungicidas (Campos et al., 2015), inseticidas (de Oliveira et al., 2018), além de aumentar a persistência destes ativos no campo, reduzindo sua lixiviação e sorção no solo (Grillo et al., 2014a; Kah et al., 2016), sem contar com a redução da toxicidade em organismos não alvos (Grillo et al., 2012; Clemente et al., 2014; Grillo et al., 2015). Kah e colaboradores 2018, em um recente *review* compararam resultados de diferentes formulações convencionais com nanopesticidas, e observaram um aumento significativo na eficácia destes

novos materiais. Assim, estes e outros benefícios vem motivando um crescimento expressivo de estudos e investimentos neste setor, em escala mundial (Kah et al., 2016).

Vários nanopesticidas que estão em desenvolvimento, ou que já existem no mercado, consistem em reformulações de ingredientes ativos (IAs) registrados com propriedades inseticidas, fungicidas ou herbicidas. Tais nanocarreadores são muitas vezes constituídos de materiais orgânicos como, polímeros, lipídios e proteínas, mas também existem exemplos de nanopartículas inorgânicos, como as nanopartículas metálicas e óxidos metálicos. Estudos recentes, como o descrito por Grillo e colaboradores 2021 (Grillo et al., 2021), mostram que novos nanopesticidas mais inteligentes precisam ser desenvolvidos, podendo assim ser capazes de controlar a liberação do ativo encapsulado, bem como a localização do nanopesticida no organismo alvo. O desenvolvimento de sistemas híbridos, é um exemplo, em que em um único sistema é possível carrear mais de um IA ou um outro nanomaterial com distintas propriedades.

Tendo como exemplo, nanocarreadores poliméricos associados com quimioterápicos e nanopartículas magnéticas de óxido de ferro podem ser usados como um sistema de liberação controlado de ativos e servir como agente de contraste para diagnóstico de doenças na área médica (Grillo et al., 2016). No entanto, poucos desses transportadores híbridos são explorados para aplicação agrícola. A associação de NPs magnéticas com micro e nanoagroquímicos, por exemplo, pode fornecer vários benefícios para uma agricultura sustentável, uma vez que permite: i) direcionar nanopesticida para regiões mais específicas; ii) coletá-los através do uso de um campo magnético externo em caso de contaminação ambiental, caso necessário; iii) ser usados como micronutrientes, já que íons de ferro são essenciais para o funcionamento metabólico e fisiológico das plantas (Baldi et al., 2018). Além disso, Li mostraram que as nanopartículas de Fe e Fe₃O₄ podem aumentar a taxa de fotossíntese, o conteúdo de clorofila e a biomassa das plantas de milho 10 dias após a aplicação foliar, mostrando que sistemas nanoparticulados magnéticos de óxido de ferro, podem promover o crescimento de plantas (Li et al., 2020). Atrelado a isto, atualmente alguns nanopesticidas vêm sendo construídos com diferentes revestimentos (Zhao et al., 2017), os quais podem conferir ao carreador um novo perfil de liberação, bem como aumentar sua interação com organismos alvos, devido as suas diferentes cargas de superfície. Assim, neste trabalho foram preparados e caracterizados nanopesticidas poliméricos contendo o herbicida atrazina sem e revestidos com o polímero quitosana, a fim de criar um sistema de liberação magnético que possa ser responsivo a variação de pH e coletado do ambiente quando necessário, bem como avaliar sua cinética de liberação *in vitro* em diferentes pHs e compreender seu efeito ecotoxicológicos em macrofitas aquáticas da espécie *Azolla Caroliniana*.

1.1. Revisão da literatura

1.1.1. Nanotecnologia e Agricultura

A nanotecnologia é reconhecida pela Comissão Europeia como uma das suas seis “Tecnologias Capacitadoras” que contribuem para a competitividade sustentável, e o crescimento em vários campos de aplicação industrial (CE, 2012). As novas propriedades químicas e/ou físicas das partículas em nanoescala fornecem funções úteis para diferentes áreas do conhecimento (ObservatoryNANO, 2011). Além disso, a nanotecnologia está surgindo como um meio de melhorar a sustentabilidade das operações agrícolas. O uso geral de nanomateriais (inorgânicos e orgânicos) para a agricultura foi recentemente revisado para fornecer uma compreensão geral das oportunidades e prioridades de pesquisa nesta área (Rodrigues et al., 2017 e Raliya et al., 2018), bem como uma avaliação crítica da eficácia de pesticidas e fertilizantes nanoparticulados, em relação às formulações convencionais (Kah et al., 2018).

De acordo com as principais análises de P&D, estudos envolvendo a aplicação de nanotecnologia na agricultura esta em andamento há quase uma década, em busca de soluções para vários desafios agrícolas e ambientais, como sustentabilidade, variedade melhorada de espécies e aumento da produtividade. Vários autores têm mostrado a tendência crescente de publicações científicas e patentes em nanotecnologia agrícola, especialmente para gerenciamento de doenças e proteção de culturas (Sastry et al., 2010; Gogos et al., 2012 e ObservatoryNANO, 2011). Desta forma, os nanomateriais na agricultura visam, em particular, reduzir a quantidade de produtos químicos pulverizados por meio da entrega inteligente de ingredientes ativos, minimizar as perdas de nutrientes na fertilização (Gogos et al., 2012) e aumentar a produtividade por meio do gerenciamento e otimização de água e nutrientes. Ademais, dispositivos derivados da nanotecnologia, também estão sendo explorados no campo de melhoramento de plantas e transformação genética (Torney et al., 2007).

A agricultura sustentável é suma importancia para alcançar a “Fome Zero”, que está entre os 17 objetivos de desenvolvimento sustentável das Nações Unidas. A produção e distribuição mundial de alimentos estão enfrentando um grande desafio devido ao aumento da população, mudanças climáticas, contaminação ambiental e maiores demandas de água e energia. A agricultura atual usa uma quantidade impressionante de recursos. Por exemplo, a produção agrícola anual global excede três bilhões de toneladas, o que requer 187 milhões de toneladas de fertilizantes, 4 milhões de toneladas de pesticidas, 2,7 trilhões de metros cúbicos de água (cerca de 70% de todo o consumo de água doce globalmente) e mais de dois quatrilhões de unidades térmicas britânicas (BTU) de energia, de acordo com a Food and Agriculture Organization (FAO, 2017).

Além disso, grandes proporções de pesticidas aplicados não atingem sua meta (por exemplo, dependendo do método de aplicação, entre 10 e 75% do IA não chegam ao seu alvo desejado (Aktar et al., 2009 e Pimentel, 2005), e o uso de pesticidas frequentemente resulta na contaminação de ambientes terrestres e aquáticos (Aktar et al., 2009; Pimentel, 2005 e ReliefWeb, 2017). Todavia, um dos principais motivadores para a aplicação da nanotecnologia, é a redução na quantidade de pesticida necessária para garantir a proteção da cultura, que pode ser alcançada de várias maneiras, como solubilidade aparente melhorada, liberação controlada, entrega direcionada, biodisponibilidade aprimorada, adesão aumentada da folha e melhor estabilidade do IA no ambiente (Kah et al., 2013). Na figura 1 temos um sistema convencional a várias aplicações do herbicida podendo fazer com que ultrapasse a concentração máxima segura do composto, enquanto para a formulação de liberação modificada, já não é observado com frequência. Além disso, os sistemas de liberação modificada podem trazer diversas vantagens como a:

- Redução na quantidade de substância química necessária para o controle de pragas;
- Diminuição no risco de contaminação ambiental;
- Redução na quantidade de energia gasta, uma vez que se reduz o número de aplicações necessárias comparadas as formulações convencionais;
- Aumento na segurança das pessoas responsáveis pela aplicação do produto no campo (Grillo R., 2011).

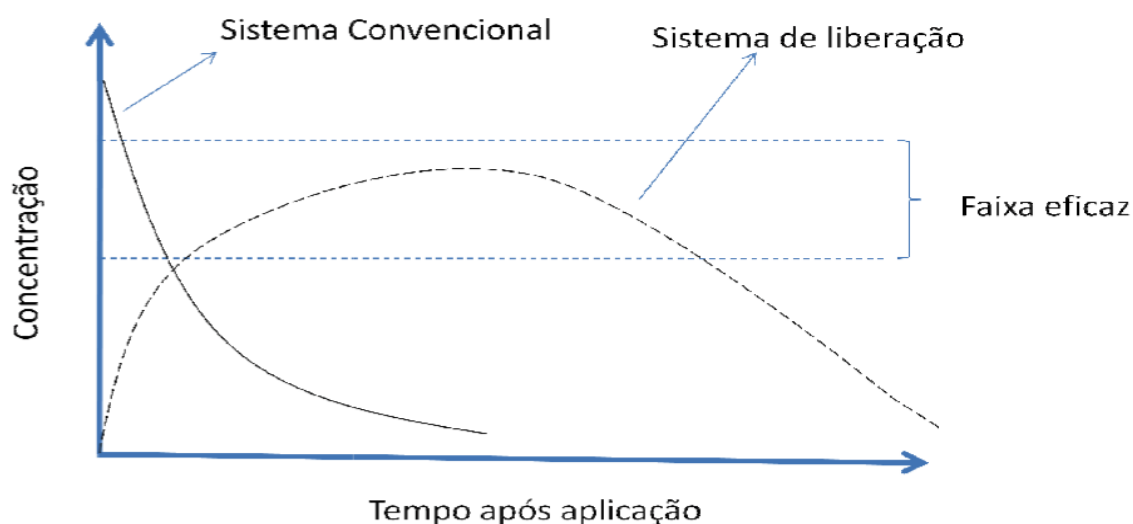


Figura 1: Representação dos sistemas de liberação pelos métodos tradicionais versus liberação controlada.

No entanto os processos tradicionais de fertilização e as necessidades nutricionais das plantas muitas vezes não coincidem. Por exemplo, existem situações em que até 70% dos

fertilizantes e herbicidas convencionais são perdidos, seja por lixiviação em solos, seja por volatilização. Além da redução na eficiência, a lixiviação excessiva de fertilizantes causa emissões gasosas perigosas e excesso de minerais na água que induz a eutrofização e consequente proliferação de espécies oportunistas, como excesso de plâncton e de algas. Assim, a adoção de estratégias tecnológicas de fertilização se faz necessária como forma de se evitar custos e perdas de nutrientes, podendo evitar a perda de nutrientes por rápida lixiviação. A liberação controlada condiciona o acesso aos nutrientes de uma forma mais lenta, uma vez que atrasa a disponibilidade destes para a absorção pelas plantas, ou que estende a sua disponibilidade para elas, de forma que se deseja que a liberação entre em sincronia com as necessidades nutricionais da planta. Um dos principais métodos para a produção de fertilizantes e herbicidas de liberação controlada é o encapsulamento do fertilizante solúvel em água com um material que seja insolúvel em água e que apresente microporos. Com isso, ocorre um controle da entrada e da saída, portanto controle da taxa de dissolução dos nutrientes, conciliando com as necessidades nutricionais da planta (Magalhães et al., 2013).

Recentemente as pesquisas tem indicado que por meio da nanotecnologia é possível impactar positivamente o setor agroalimentar (Grillo, et al., 2021). Assim, novos nanomateriais baseados no uso de nanopartículas inorgânicas, poliméricas e lipídicas, tem sido sintetizados por diferentes técnicas (por exemplo, emulsificação, gelificação iônica, polimerização, oxirredução, etc). Além disso, eles podem ser aplicados no desenvolvimento de “nano” sistemas inteligentes para imobilização de nutrientes e pesticidas e sua liberação no solo. Esses sistemas têm a vantagem de minimizar a lixiviação, melhorando a absorção de nutrientes pelas plantas e mitigando a eutrofização (Fraceto et al., 2016).

1.1.2. Sistemas carreadores de liberação de herbicidas

Os sistemas de liberação controlada são tecnologias emergentes que têm atraído interesse comercial e científico global nos últimos anos. Esses sistemas são usados em áreas como medicina, cosméticos, engenharia, alimentos e agricultura (Guo et al. 2015). As vantagens da liberação controlada para a entrega de defensivos agrícolas incluem redução da fitotoxicidade, perdas por lixiviação, volatilização, deriva (aplicação aérea) e degradação do solo, bem como maior segurança durante a aplicação (Aouada et al. 2015). No entanto, a liberação de agentes ativos das partículas carregadas ocorre, principalmente, por meio de difusão passiva, erosão da cápsula ou pressão osmótica, resultando em um controle deficiente da liberação de pesticidas (Guo et al. 2015). Portanto, os sistemas responsivos a estímulos são candidatos promissores para melhorar as propriedades de liberação controlada de defensivos agrícolas, promovendo a

liberação inteligente e específica no local do ativo, em resposta a estímulos bióticos ou abióticos (Liang et al., 2017).

O uso de pesticidas consiste em uma prática regular na agricultura comercial, e o desenvolvimento de pesticidas novos, eficientes e específicos para um determinado alvo é um processo contínuo. Portanto, um grande número de pesticidas é rastreado a cada ano (> 1 milhão de acordo com uma estimativa em 2009) (Resh e Cardé, 2009). Além da instabilidade físico-química dos pesticidas sérias consequências na cadeia alimentar e na saúde humana podem ser gerados com a má utilização destes ativos. Impacto sobre as espécies não-alvo, é um exemplo, e a presença de pesticidas no meio ambiente resultam no desenvolvimento de resistência em ervas daninhas, insetos e patógenos (Rai e Ingle, 2012). No geral, os nanopesticidas conservam energia e água, pois são aplicados em menor quantidade e com menos frequência do que os pesticidas convencionais, além de aumentarem a eficiência dos pesticidas e a produtividade da cultura, por meio de rendimentos mais elevados e menores custos de insumos, reduzindo o desperdício e os custos de mão de obra (Ragaei e Sabry, 2014)

Existem diferentes tipos de formulações de nanopesticidas, e vários estudos indicaram sua eficácia contra uma ampla gama de pragas. Como por exemplo, tem-se a nanoemulsão à base de surfactante que foi descrita por Wang (2018) como um sistema de entrega para o piretróide beta-cipermetrina, insolúvel em água. Já Kumar e colaboradores 2013, demonstraram a uma maior captação do inseticida permetrina na nanoformulação, do que a forma comercial contra *Aedes aegypti*. Além disso, os efeitos adversos nas bactérias e plantas do solo foram reduzidos no caso dos nanopesticidas (Kumar et al., 2013).

Quando usados em formulações agroquímicas, esses carreadores sensíveis podem permitir a liberação de compostos ativos em resposta a estímulos abióticos ou bióticos como luz, pH, temperatura, campo magnético, enzimas, entre outros (Wang et al., 2016; Goponenko et al., 2016). Os sistemas de liberação controlada por estímulo, podem ser preparados usando polímeros naturais (como alginato, ciclodextrina e amido), e polímeros sintéticos (como quitosana, carboximetilcelulose e etilcelulose) e sílicas, devido à sua ampla disponibilidade e biodegradabilidade (Neri-Badang et al., 2019). Recentemente, os portadores baseados em pilararenos e curcubit [n] urils foram estudados na aplicação de pesticidas e herbicidas, devido à sua capacidade de resposta a estímulos ambientais (Li et al., 2019; Shangguan et al., 2019 e Gao et al., 2018).

Os sistemas de liberação de nanocarreadores, que respondem às mudanças de pH, são baseados na presença de grupos funcionais ionizáveis na estrutura do carreador, como pirimidinas, carboxilatos, aminas, fosfatos e sulfonatos (Gao et al., 2019 e Tao et al., 2019). Em determinados valores de pH, dependendo do pKa do portador ou da molécula química, os grupos

funcionais apresentam uma carga, que pode ser positiva ou negativa, resultando em interações eletrostáticas. Os tamanhos dos portadores sensíveis ao pH podem ser modificados pelo inchaço (entumescimento), ou achatamento das macromoléculas em resposta às mudanças no pH do meio circundante (figura 2). Existem, essencialmente, dois tipos de materiais sensíveis ao pH: aqueles com grupos ácidos na estrutura ($-\text{COOH}$ e $-\text{SO}_3\text{H}$) e aqueles com grupos básicos ($-\text{NH}_2$), que aumentam de volume em pH básico e ácido, respectivamente. Logo, a resposta pode ser a mesma, mas o estímulo aplicado é diferente (Kocak et al., 2016 e Reyes-Ortega et al., 2014).



Figura 2: Liberação de substâncias promovidas pela modificação na estrutura do carreador em resposta a algum estímulo externo, tais como mudanças de pH ou temperatura. **Fonte:** Antunes, D., 2019.

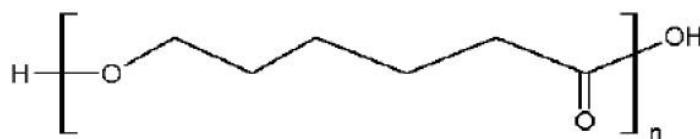
A literatura relata o desenvolvimento de vários nanocarreadores responsivos ao pH (Neri-Badang, 2019; Chauhan et al., 2017; Choudhary et al., 2017; Liang et al., 2018). Para este tipo de sistema, uma molécula química específica, como um pesticida, pode ser encapsulada devido a interações químicas (iônicas ou covalentes), ou ser presa em uma malha polimérica dentro do sistema durante a formação de nanopartículas (Sarmiento et al., 2006; Fan et al., 2012). Um exemplo clássico de um sistema nanocarreador responsivo ao pH é baseado em alginato e quitosana (Maruyama et al., 2016). A cadeia de polímero de alginato contém grupos carboxílicos (pK_a 4,8), portanto, em pH acima de 4,9, o polímero é desprotonado (Patel et al. 2018) e possui carga negativa. A quitosana é rica em grupos amina (pK_a 6,3), então em pH ácido ela é protonada, com grupos funcionais carregados positivamente (Wu et al., 2019).

Uma outra maneira de deixar um carreador de liberação inteligente, consiste em uma mistura de dois componentes (ou mais) em uma formulações híbridas, como é o caso da associação de nanopartículas inorgânicas em nanocarreadores orgânicos. Este tipo de sistema propõe, que são capazes de liberar uma grande quantidade do ingrediente ativo por mais tempo se comparado com outros sistemas, e ainda sugere que a eficiência da liberação de pesticidas pode ser ainda maior. Por exemplo, para sistemas carreadores de pesticidas associados com nanopartículas de óxido de ferro, além da propriedade magnética do materiais (como demonstrados por Forini et al., 2021 e Xiang et al., 2017), pode permitir uma maior taxa de

absorção pelas plantas e utilizar o material inorgânico como macro ou micronutrientes (SCHROEDER et al., 2019), uma vez que a disponibilidade de ferro para as plantas pode desempenhar um papel crucial no aumento da produtividade da cultura devido ao seu papel na fotossíntese, respiração, metabolismo do nitrogênio, manutenção do sistema redox da planta, biossíntese de hormônios, etc.

1.1.3. Poli (*ε*-caprolactona)

O poli (*ε*-caprolactona) é um poliéster alifático linear biodegradável amplamente utilizado para engenharia de tecidos, biomédica, alimentos e outras aplicações industriais (Dash e Konkimalla, 2012; Duncan, 2011). O PCL, geralmente, exibe uma baixa taxa de degradação em solução aquosa, com produtos de degradação não tóxicos. Mesmo que sua hidrofobicidade não possa promover e permitir a adesão celular, é possível tratar a amostra de forma a modificar sua superfície sem afetar a sua estrutura fibrosa, e diferentes tipos de tratamentos já foram feitos na literatura (Zhu et al., 2015; Marletta et al., 2007 e Castro, 2007). Também é possível adicionar PCL com outros polímeros, a fim de modular suas propriedades (Da Silva et al., 2008).



Figuro 3: Representação estrutural do polímero de poli epsilon-caprolactona.

PCL vem sendo estudado para sistema de liberação modificada de defensivos agrícolas, tais como o herbicida atrazina (GRILLO et al., 2012; PEREIRA et al., 2014a). Com o uso de nanopartículas de PCL levou ao desenvolvimento de abordagens eficazes para o controle de pragas. Para ser usado em preparos de novas formulações, como inseticidas, pesticidas e repelentes de insetos (Khoobdel et al., 2017). Por exemplo, nanocápsulas de PCL associadas ao herbicida atrazina demonstraram elevada eficiência de encapsulação (acima de 90%) e alta estabilidade físico-química, bem como uma liberação modificada do herbicida (GRILLO et al., 2012; PEREIRA et al., 2014a), e maior efeito herbicida (Oliveira et al., 2015).

1.1.4. Quitosana

A quitosana (CS) é um elemento estrutural do exoesqueleto de crustáceos e insetos e pode ser produzida pela desacetilação da quitina. Tal molécula possui pKa 6,5, o que faz com que em pH ácido seus grupos aminas primários estejam protonados e em pH básico, desprotonados (Zelenkova et al., 2018). Esta característica confere uma propriedade muito interessante a esta

molécula, uma vez que em meio ácido a quitosana pode-se ligar aos grupos carboxílicos presentes nas extremidades das nanopartículas de PCL, sendo capaz de revesti-las (Grillo et al., 2014b). Em contrapartida, em pH básico as moléculas desprotonadas da quitosana, deixam de interagir eletrostaticamente com as nanopartículas de PCL. Portanto, esta característica da CS, poderá modular a liberação do ativo das nanopartículas em questão. Alguns trabalhos mostram esta capacidade da quitosana em regular a liberação de ativos em diferentes pH, para distintos nanocarreadores (Wu et al., 2016), entretanto muitos destes estudos são para a área médica, sendo utilizado na forma de géis, filmes, películas e membranas, por ter uma estrutura química com características únicas como: biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa toxicidade e facilidade de processamento (Sousa et al. 2019). Assim, neste trabalho desenvolvemos um sistema de liberação inteligente que possa modular a liberação do herbicida atrazina em função do pH, através deste revestimento de quitosana.

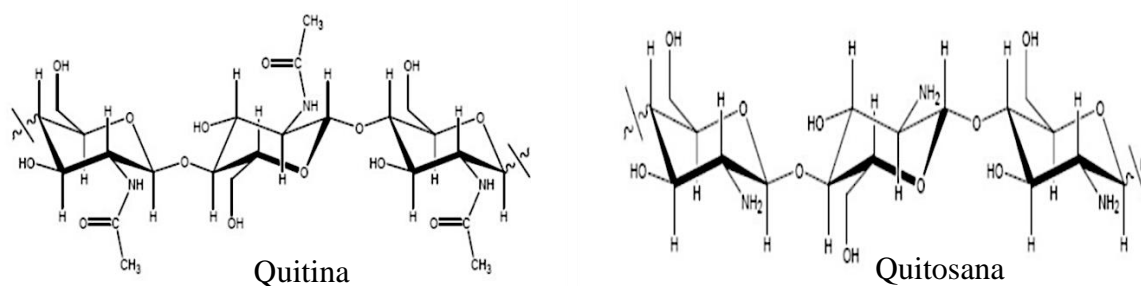


Figura 4: Representação estrutural da quitina e quitosana. **Fonte:** Wang, X., 2005)

1.1.5. *Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro*

Uma outra maneira de deixar um carreador de liberação inteligente, consiste em uma mistura de dois componentes (ou mais) em uma formulações híbridas, como é o caso da associação de nanopartículas inorgânicas em nanocarreadores orgânicos. Este tipo de sistema são capazes de liberar uma quantidade conhecida do ingrediente ativo se comparado com outros sistemas, e ainda sugere que a eficiência da liberação de pesticidas pode ser ainda maior. Por exemplo, para sistemas carreadores de pesticidas associados com nanopartículas de óxido de ferro, além da propriedade magnética dos materiais (como demonstrados por Forini et al., 2021 e Xiang et al., 2017) pode permitir uma maior taxa de absorção pelas plantas, uma vez que utiliza o material inorgânico como macro ou micronutrientes (SCHROEDER et al., 2019), já que a disponibilidade de ferro nas plantas pode desempenhar um papel crucial no aumento da produtividade da cultura devido ao seu papel na fotossíntese, respiração, metabolismo do nitrogênio, manutenção do sistema redox, biossíntese de hormônios, etc.

1.1.6. Efeito ecotoxicológico de nanopesticidas

Embora vários estudos tenham sido realizados em nanopesticidas para entender sua eficiência em organismos-alvo, (de Oliveira et al., 2018, Grillo et al., 2014, Pascoli et al., 2020), também é obrigatório avaliar seus efeitos em espécies-não alvo. Por exemplo, o timol (um monoterpeneo com atividade biocida contra fungos, bactérias, algumas pragas agrícolas e larvas de mosquitos) quando encapsulado em nanopartículas foi possível continuar com o seu efeito biocida e reduzir os seus efeitos tóxicos sobre organismos aquáticos e terrestres (Pereira et al. 2020).

A avaliação de risco da União Européia sobre os nanopesticidas no ambiente segue, atualmente, o paradigma geral para espécies não-alvo, e nenhum teste específico foi desenvolvido até o momento (Grillo et al., 2021). Portanto, a avaliação de riscos dos nanopesticidas, deve considerar tanto a natureza química quanto a forma em nanoescala dos carreadores (orgânico, inorgânico ou híbrido) (Grillo et al., 2021). Além disso, Kah e colaboradores 2018 destacam a ausência de dados em termos de resultados comparáveis sobre os efeitos dos ingredientes ativos (IA), formulações de produtos comerciais convencionais e as nanoformulações correspondentes (Kah et al., 2018). Além disso, os diferentes estados possíveis dos nanopesticidas no ambiente (como partícula única, agregação, aglomeração, parcialmente dissolvido/degradado e totalmente dissolvido) (Skjolding et al., 2016), bem como a persistência do IA no nanocarreador (por exemplo, rápido, moderado, lento ou sem liberação), especialmente nas condições experimentais, devem ser melhor avaliadas (Walker et al., 2018). Portanto, métodos de teste adicionais relevantes, que incluam testes de exposição de longo prazo devido à alta persistência no ambiente são necessários, tais como experimentos que tratem sobre o ciclo de vida completo do organismo (Bicho et al., 2017a), multigeracional (Bicho et al., 2017b), estudos metabólicos (Matich et al., 2019) e multiespécies ou testes de nível de mesocosmos (Mendes et al., 2018). Uma lista detalhada e perspectivas são relatadas em (Amorim et al. 2016).

1.1.7. Estudo em macrófitas

Vários autores têm considerado as macrófitas aquáticas na perspectiva de plantas indesejáveis devido ao seu rápido crescimento, as quais muitas vezes invadem lagos e causam problemas ambientais. Por outro lado, o seu poder de proliferação pode ser gerenciado adequadamente, sendo que sua capacidade de absorção de nutrientes e a bioacumulação de outros compostos da água a tornam uma ferramenta útil no tratamento de efluentes. No mundo e particularmente na Ásia, os agricultores produzem e colhem plantas aquáticas para diferentes fins, incluindo inclusive na fonte de alimento animal (Islam e Nishibori 2017).

As macrófitas são vegetais aquáticos de importância ecológica, pois participam do funcionamento dos ecossistemas, sendo capazes de estabelecer uma forte ligação entre o sistema aquático e o ambiente terrestre (Trindade et al. 2010). Tais organismos, podem ser utilizados de diversas formas, incluindo o uso do excesso da biomassa das macrófitas aquáticas de reservatórios para a formulação de medicamentos na fitoquímica, fertilizantes orgânicos para agricultura, biogás, ração animal, tratamento de efluentes (Pompêo, 2017). Além disso, a presença das macrófitas no ambiente aquático pode refletir em uma maior abundância de organismos vivos, animais e vegetais (Esteves, 2011), atuando como liberadores de nutrientes do sedimento por suas raízes e liberando-os na água, através de sua excreção ou durante sua decomposição (Maraschin-Silva et al. 2009). Uma ampla gama de macrófitas aquáticas são resistentes a poluentes e eficazes para extrair e remover vários contaminantes ambientais (por exemplo, pesticidas, metais pesados, derivados petroquímicos, nanomateriais e outros materiais prejudiciais) (Escoto et al., 2019; Goswami e Das, 2018). Nesse contexto, desenvolvemos um sistema híbrido magnético de liberação controlada do herbicida atrazina e, avaliamos seus efeitos tóxicos na fotossíntese em organismos não-alvo, como a macrófita samambaia d'água (*Azolla Caroliniana* Willd. (Pteridophyta: Azollaceae)) (Figura 5).

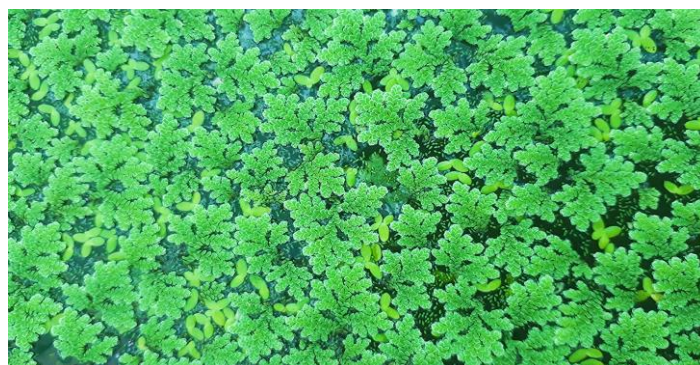


Figura 5: Plantas de samambaia d'água (*Azolla caroliniana* Willd. (Azollaceae)). **Fonte:** Autoria próprio.

Atrelado a isto, a atrazina, um herbicida de tipo triazinico (Figura 6), foi adotado como modelo neste estudo, devido ao seu elevado uso em milho e cana-de-açúcar como protetor de cultura, e sua lenta degradação no meio ambiente, o que torna ele um potencial contaminante para o solo, água e alimentos, além de efeitos nocivos para as espécies não-alvo e saúde humana. Assim, o desenvolvimento de sistemas de liberação sustentada, baseados em micro ou nanotecnologia, tornou-se uma alternativa promissora para reduzir os impactos negativos desse herbicida no meio ambiente. Por exemplo, alguns estudos mostraram que micro/nanopartículas carregadas de atrazina proporcionaram benefícios potenciais em comparação com a forma não encapsulada, como a redução da genotoxicidade de espécies não-alvo por exemplo, *Lactuca*

sativa (Grillo et al. 2010) e *Allium cepa* (Grillo et al. 2012), bem como, melhorou a atividade herbicida pós-emergência contra espécies-alvo como por exemplo, *Brassica juncea* (Oliveira et al. 2015) e *Raphanus raphanistrum* (de Oliveira et al. 2015).

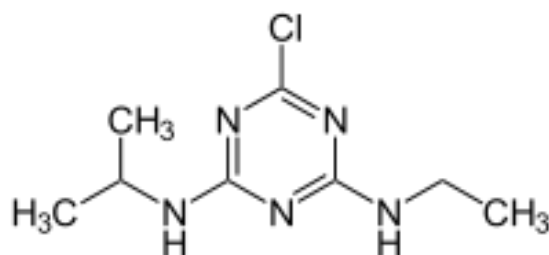


Figura 6: Representação estrutural da atrazina.

Portanto, neste estudo foram desenvolvidas nanopartículas de óxido de ferro (Fe_3O_4 @OA NPs) encapsuladas em nanocarreadores de PCL, com o objetivo de reduzir os impactos negativos deste herbicida no ambiente, através de um sistema de liberação responsivo ao pH. Além disso, foi possível criar novos sistema de entrega de herbicida com cargas distintas, com potencial de serem controlados pelas suas propriedades magnéticas ou servir como reforço nutricional para plantas não-alvo.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como principal objetivo preparar e caracterizar nanocarreadores poliméricos magnéticos para o herbicida atrazina com e sem revestimento de quitosana. Além disso, estudou-se a cinética de liberação *in vitro* do herbicida atrazina em diferentes valores de pHs para cada formulação, bem como avaliou-se sua capacidade de recuperação em diferentes matrizes ambientais e seu efeito ecotoxicológico em plantas aquáticas.

2.1. Objetivos específicos

- Padronização da metodologia analítica para quantificação do herbicida atrazina por UV-Visível;
- Planejamento fatorial dos nanopesticidas híbridos;
- Preparar nanopartículas magnéticas;
- Preparar nanocarreadores híbridos (PCL);
- Caracterização físico-química dos nanocarreadores;
- Cinética de liberação *in vitro*;
- Estudos das propriedades magnéticas;
- Efeito da ecotoxicidade em plantas aquáticas.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1. Materiais

O estudo foi desenvolvido na Universidade Estadual Paulista no Campus de Ilha Solteira/SP, no Departamento Física e Química. Por tanto foram utilizados os seguintes materiais para pesquisa: Poli-ε-caprolactona (PCL) - Sigma®, Atrazina (ATZ) (grau de pureza 95%) - Pestanal®, Clorofórmio - Synth®, Myritol® 318 - Spectratec, Poli(álcool vinílico) - Sigma®, Cloreto de ferro (III) hexa-hidratado - Sigma®, Cloreto de ferro (II) tetra-hidratado - Sigma®, Quitosana (MM 27 kDa, grau de desacetilação: 75-85%) - Sigma®, Hidróxido de sódio - Dinâmica, Ácido bórico - Synth®, Cloreto de potássio - Synth®, Bifalato de potássio - Synth®, Fosfato de potássio - Dinâmica. A água deionizada utilizada nesse procedimento foi obtida por meio do equipamento de osmose reversa com a condutividade elétrica de 18,2 Ωm⁻². Demais reagentes foram obtidos em grau analítico de fornecedores locais.

3.2. Métodos

3.2.1. Padronização do herbicida pela técnica de UV-VIS

As curvas de calibração foram realizadas em espectrofotômetro Cary 50 (Varian). Para a análise quantitativa do herbicida ATZ foram preparadas soluções de concentrações de 0,5 a 10 mg/L e analisadas em triplicata, no comprimento de onda de absorção máxima do composto (223 nm), obtido através de uma varredura desde a região do visível ao ultravioleta (UV). Todas as concentrações utilizadas para determinação da curva de calibração foram ajustadas de modo a apresentarem absorvância menor que 1. Após a determinação das absorvâncias nas diversas concentrações, foi construído um gráfico absorvância em função de concentração do herbicida e em seguida realizou-se a análise do comportamento matemático da curva (regressão linear), utilizando o programa Prisma 6.0. Além disso, o limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram realizadas a partir de dados obtidos com a regressão linear da curva analítica e aplicados às Equações 1 e 2, respectivamente (ANVISA, 2003).

$$LD = \frac{DP \times 3}{IC} \quad \text{Eq. (1)}$$

$$LQ = \frac{DP \times 10}{IC} \quad \text{Eq. (2)}$$

Onde, DP é o desvio padrão do intercepto com o eixo y e IC é a inclinação da curva analítica média.

3.2.2. Planejamento fatorial

O planejamento fatorial é empregado para se obter as melhores condições operacionais de um sistema em estudo, a fim de realizar um número menor de experimentos quando comparado com o processo univariado de otimização (De Barros et al., 2003). Tal metodologia determina quais fatores têm efeitos relevantes na resposta de um analito e, também, como o efeito de um fator varia com os níveis dos outros fatores. Além disso, permite medir as interações entre diferentes fatores, os quais são os principais componentes de muitos processos de otimização. Sem o uso de planejamentos fatoriais de experimentos, importantes interações de fatores não poderiam ser detectadas e a otimização máxima do sistema pode levar mais tempo para ser alcançada (Reis et al., 1999).

Baseado nisto, foi estudado um planejamento fatorial com ponto central de 2^3 para os nanopesticidas, a fim de obter formulações com as melhores estabilidades físico-químicas. Assim, foi levado em consideração a quantidade de PCL utilizada para o preparo da formulação, o volume de nanopartículas de Fe_3O_4 e, por fim o tempo de sonicação (min). O planejamento fatorial com ponto central de 2^3 está apresentado na Tabela 2, no qual os fatores estão representados da seguinte maneira: nível inferior (-), ponto central (0) e nível superior (+). Para o tratamento dos dados foram utilizados os programas de estatística: Statística Software versão 13.5.0.17 e Minitab 14, que também foram empregados para obter efeitos, coeficientes e desvio padrão dos coeficientes, gráficos dos efeitos padronizados, gráfico de Pareto e as superfícies de respostas e de outros parâmetros estatísticos dos modelos ajustados.

Tabela 2: Planejamento fatorial de ponto central 2^3

Níveis	Fatores	PCL (mg)	Fe_3O_4 (μ L)	Tempo (minutos)
Nível inferior	-	400	100	5
Ponto central	0	600	550	7,5
Nível superior	+	800	1000	10

Fonte: Aatoria propria.

Portanto, um ponto relevante do planejamento fatorial é que garante maior controle dos resultados, permitindo assim, uma combinação de todas as variáveis em todos os níveis, obtendo análise de uma variável, sujeita a todas as combinações das demais.

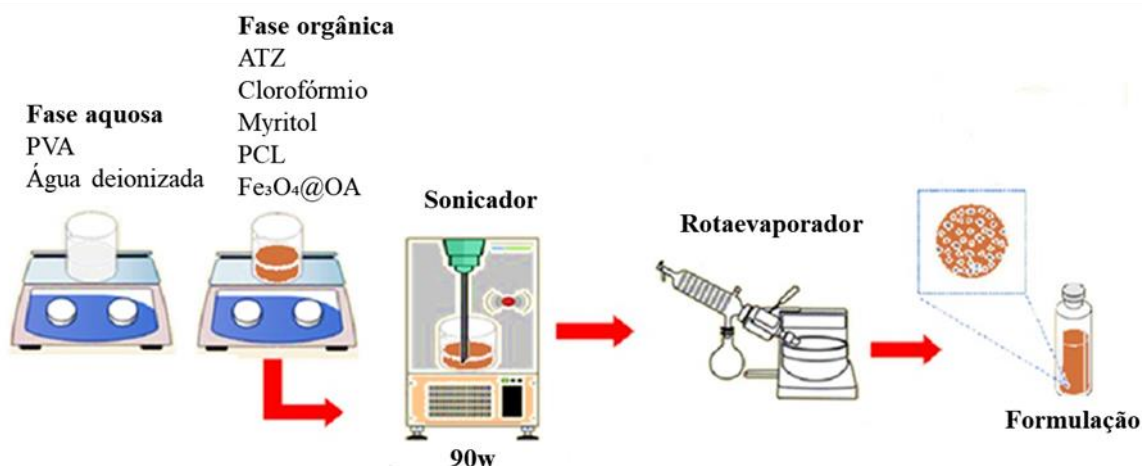
3.2.3. Síntese das nanopartículas inorgânicas

3.2.3.1. Síntese de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de Fe estabilizadas com ácido oleico

Nanopartículas superparamagnéticas ($\text{Fe}_3\text{O}_4@OA$ NPs) foram sintetizadas utilizando o método de coprecipitação descrito por (JADHAV et al., 2013), que consiste na adição de 15 g de cloreto de ferro (III) hexa-hidratado e 9,2 g de cloreto de ferro (II) tetra-hidratado em 250 mL de água Milli-Q e agitação por 10 min a 50 ° C. Após 10 min, NH_4OH (12 mol.L^{-1}) foram adicionados à solução, resultando em um precipitado escuro de Fe_3O_4 . Em seguida foram adicionados 2,5 mL de ácido oleico a mistura, e então foi aquecida a 80°C durante 1 h. O Excesso de NH_4OH e ácido oleico foi removido por isolamento magnético do precipitado, utilizando um ímã durante 15 minutos e subsequente redispersão em clorofórmio. O procedimento de lavagem foi repetido cinco vezes com água Milli-Q e quatro vezes com clorofórmio. Por fim as nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@OA$ (contendo 337,7 mg/L de Fe) foram armazenadas em frasco âmbar à temperatura ambiente.

3.2.3.2. Síntese dos nanocarreadores poliméricos (PCL)

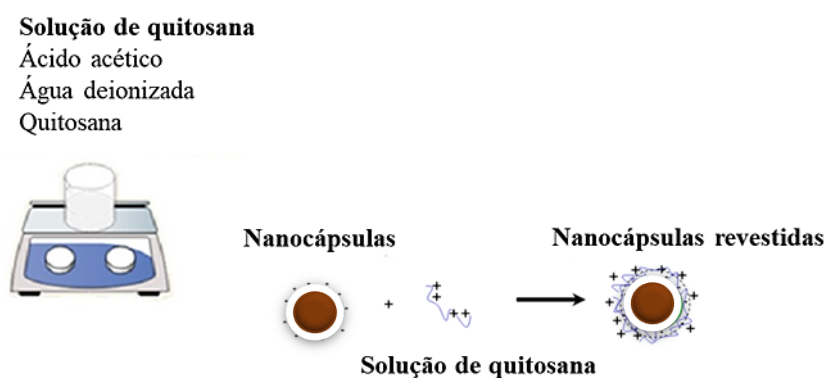
O preparo dos nanoherbicidas foi realizado segundo o método descrito por (Grillo, R. et al., 2016) com modificações. O método envolve duas misturas de fases, uma orgânica e outra aquosa. A fase orgânica é constituída por diferentes quantidades de PCL (mg) e Fe_3O_4 NPs (mL) como demonstrado na Tabela 1, 20 mL de solvente orgânico (clorofórmio), 200 mg de óleo (triglicerídeos de ácido cáprico e caprílico - Miglyol® 810) e 10 mg de herbicida (atrazina). Na fase aquosa temos 50 mL de água deionizada com a adição de 150 mg de PVA, dissolvendo sobre agitação magnética a 60°C por 40 minutos. Após as dissoluções das duas fases, é inserida a fase orgânica na fase aquosa e assim foi levada ao sonicador de ponteira ultrassônico - Ecos-sonics®, por diferentes tempos (Tabela 1). Em seguida, o solvente orgânico foi evaporado sob pressão e reduzido, sendo utilizado o Evaporador rotativo - MA120 - Marconi®. A formulação de nanoherbicida foi evaporada até um volume final de 20 mL e, a concentração de herbicida nas formulações após evaporação foi de 0,5 mg/mL. As formulações foram armazenadas em frascos âmbar a temperatura ambiente (30°C).



Esquema 1. Representação esquemática do preparo dos carreadores poliméricos nanoestruturados. **Fonte:** Autoria própria.

3.2.4. Revestimento dos nanocarreadores com quitosana

O preparo da solução de quitosana para revestir os nanocarreadores, foi efetuado a partir de 5,7 mL de Ácido acético - Synth®, 100 mL de água deionizada e 50 mg de quitosana, sendo preparada sob agitação por 24 horas. Em seguida, a solução foi filtrada em filtro *Nylon 0,22*. Dessa forma, sob agitação magnética foram colocados 5 mL da formulação de nanoherbicida e a mesma quantidade da solução de quitosana, com o auxílio de uma pipeta, objetivando o revestimento dos nanoherbicidas magnéticos com quitosana.



Esquema 2: Representação esquemática do preparo e revestimento dos nanoherbicidas. **Fonte:** Autoria própria.

3.2.5. Preparo das soluções tampões

Soluções tampões foram preparadas para os ensaios de liberação *in vitro* dos nanocarreadores. Assim, foi necessária a realização de uma mistura de um ácido fraco com uma base conjugada. Desta forma, uma solução de hidróxido de sódio foi preparada e assim utilizada para todas as demais soluções de bftalato de potássio, fosfato de potássio e ácido bórico com cloreto de potássio, nas proporções mostradas na Tabela 1, para os devidos valores de pH.

Tabela 1: Padronização do pH.

Soluções	Volume (mL)	Solução de NaOH (mL)	pH
Bftalato de potássio	50	0,40	4,0
Fosfato de potássio	50	29,63	7,0
Ácido bórico e cloreto de potássio	50	43,90	10,0

Fonte: Morita, Tokio – 2007.

Após a adição da solução de hidróxido de sódio nas demais soluções, acrescentou-se água deionizada para completar o volume final de 100 mL.

3.2.6. Caracterização físico-química dos nanoherbicidas magnéticos

3.2.6.1 Espalhamento dinâmico de luz e potencial zeta

O espalhamento dinâmico de luz (DLS) foi utilizado para análise da distribuição de tamanho, e índice de polidispersão (PDI) dos nanopesticidas híbridos, e a técnica de microeletroforese capilar foi empregada para quantificar o potencial zeta (carga de superfície) das nanoformulações geradas pelo planejamento fatorial. A formulação com melhor estabilidade coloidal, ou seja, menor tamanho, PDI e elevado potencial zeta, foi escolhida para continuar os estudos.

O DLS, é uma técnica bem estabelecida que avalia o raio hidrodinâmico de nanopartículas, baseada nas flutuações de intensidade de luz espalhadas em determinado ângulo. A luz é dispersada por partículas com tamanho menor ou igual ao comprimento de onda delas, assim quando o feixe de laser atinge partículas pequenas, ocorre espalhamento em todas as direções sem perda ou ganho de energia por meio da dispersão de Rayleigh (ROCHA et al.; 2010). Por esta análise é possível avaliar a distribuição de tamanho e o PDI das nanopartículas.

O potencial zeta refere-se ao potencial de superfície das partículas, no qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos

funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão, um valor de potencial zeta relativamente alto é importante para uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal (REZENDE et al., 2003). As formulações de nanoherbicida magnético foram diluídos em água Milli-Q (1:1000) e as amostras foram analisadas em temperatura ambiente.

3.2.7. *Rastreamento de nanopartículas*

O rastreamento de nanopartículas (NTA) é um método que permite a visualização de NPs, e utiliza propriedades de espalhamento de luz e movimento browniano para fornecer a distribuição de tamanho e contagem das partículas em suspensão líquida (PATTY, P. J.; FRISKEN, 2006). A técnica foi utilizada para determinar a concentração e distribuição de tamanho dos nanopesticidas híbridos. Assim, por intermédio de um feixe de laser que atravessa o compartimento da amostra, as partículas em suspensão espalham a luz, e a visualização ocorre por um microscópio e uma câmera de vídeo acoplada. Esta câmera captura o vídeo das partículas em movimento browniano, e pela equação de Stokes-Einstein (Equação 3) (PATTY, P. J.; FRISKEN, 2006) pode-se calcular o diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas.

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad \text{Eq. 3}$$

No qual, $d(H)$ é o raio hidrodinâmico, K é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta, η é a viscosidade da amostra (3) e D o coeficiente de difusão.

O rastreamento de nanopartículas foi realizado por meio de uma célula NanoSight LM 10 (laser verde, 532 nm), e uma câmera sCMOS usando software NanoSight versão 3.1. As formulações de nanoherbicida magnético foram diluídos em água Milli-Q (1:1000) e 1 mL da amostra foi analisada por 5 vídeos de 90 segundos cada. Esta técnica foi importante para quantificar a concentração de partículas das nanoformulações, bem como comparar com a distribuição de tamanho das análises de DLS. Estas análises, assim como as análises de DLS foram realizadas no Laboratório de Nanotecnologia Ambiental em colaboração com o Prof. Dr. Leonardo F. Fraceto, UNESP-Sorocaba.

3.2.8. *Microscopia eletrônica de varredura*

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma ferramenta útil na investigação da superfície de uma amostra, que é varrida com um feixe de elétrons e, o feixe refletido é coletado,

sendo exibido na mesma taxa de varredura sobre um tubo de raio catódico. A caracterização por microscopia eletrônica de varredura é de fundamental importância pois produz imagens que passam informações topográficas da superfície do material analisado (CALLISTER JUNIOR, 2008). Dessa forma, os nanopesticidas magnéticos foram analisados por MEV, a fim de avaliar sua distribuição de tamanho e morfologia. As nanoformulações foram diluídas (1:1000) e gotejadas em um suporte de silício, previamente limpo e, foram secas durante 24 horas em dessecador contendo Na₂SO₄. Posteriormente, as amostras receberam uma fina camada de ouro, e foram levadas ao MEV. As micrografias foram obtidas por um microscópio eletrônico de varredura, modelo EVOLS15 da marca Carl Zeiss, do DFQ, UNESP Campus de Ilha Solteira.

3.2.9. Espectroscopia na região do infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) é uma técnica fundamentada no aumento da energia de vibração, ou de rotação associado à uma ligação covalente, em que esse aumento resulta numa variação do momento dipolar da molécula. Portanto, os movimentos vibracionais de uma molécula, ativos no infravermelho, e que dão origem as absorções, são descritas dos tipos de vibrações de estiramento (ν) – movimentos ao longo do eixo de ligação, aumentando ou diminuindo a distância interatômica, e vibrações de deformações angulares (δ), caracterizadas por alterações no ângulo entre as ligações (PAVIA, D.et al., 2012). É uma técnica de grande importância na análise química, sendo largamente utilizada na identificação e elucidação estrutural de diferentes substâncias, como por exemplo, no controle e acompanhamento de reações e detecção de impurezas (CHART et al., 2004). Os espectros na região do infravermelho foram obtidos com a utilização de um espectrofotômetro, Nicolet 5DXB FT-IR (Nicolet Instruments, Madison, Wi) instalado no DFQ – UNESP Ilha Solteira. As pastilhas utilizadas na análise foram feitas a partir da mistura de brometo de potássio (KBr) e amostra suficiente para compor 1% (m/m) da mistura foi macerada até ficar totalmente uniforme. Para a obtenção dos espectros FTIR foi empregado, para cada amostra, um mínimo de 64 varreduras numa resolução de $\pm 4 \text{ cm}^{-1}$, na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} . Dessa forma, observamos as alterações nas bandas de absorção dos espectros de absorção, a fim de correlacioná-las com interações entre os nanocarreadores híbridos e o herbicida atrazina.

3.3. Eficiência de encapsulação

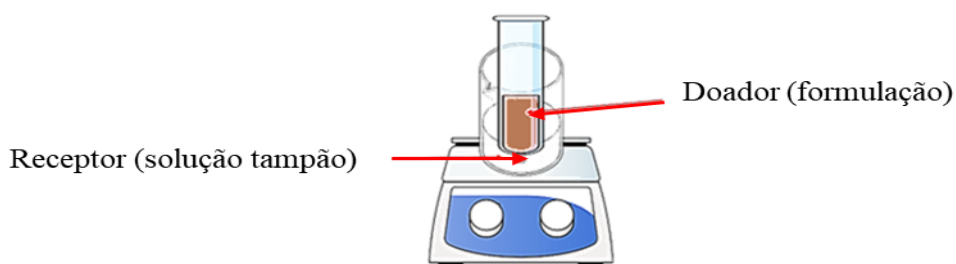
A eficiência de encapsulação é considerado um dos principais parâmetros que avalia a quantidade de ativo aprisionado na nanopartículas. Este parâmetro foi analisado a partir de um método indireto, calculando a diferença entre a quantidade total de pesticida usada para preparar

as partículas e a quantidade de pesticida livre presente no sobrenadante das partículas (KAMBA et al., 2013). A formulação foi centrifugada a 6000 rpm por 30 minutos em dispositivo de ultrafiltração/centrifugação, a fim de separar as partículas e a quantidade de atrazina livre presente no sobrenadante da solução. O sobrenadante foi medido no comprimento de onda de 223 nm em um espectrofotômetro UV-Vis, usando a curva padrão previamente validada. A eficiência de encapsulação do pesticida teve o cálculo a partir dessa equação:

$$EE\% = \left[\frac{\text{massa total de pesticida} - \text{massa de pesticida não encapsulado}}{\text{massa total de pesticida}} \right] \times 100 \quad \text{Eq. 4}$$

3.4. Ensaio de liberação *in vitro* e modelo matemático

Para verificar a cinética de liberação da ATZ livre e associada aos nanocarreadores foi utilizado um modelo de dois compartimentos (um compartimento doador e outro receptor), unidos por uma membrana de celulose (Spectrapore, com poro para exclusão molecular de 1 KDa.). As nanoformulações foram dispostas no compartimento doador (1,0 mL) enquanto o compartimento receptor contendo o solvente (50 mL de tampão em pH 4, 7 ou 10). Assim, sob agitação leve alíquotas de 2 mL foram retiradas para análises e repostas no mesmo recipiente, no intervalos de tempo, durante 1950 min e foram quantificadas por espectroscopia de UV-Vísivel e os dados resultantes, plotados em porcentagem de liberação em função do tempo. Nas formulações, o ingrediente ativo está protegido pela matriz, seja ela de qualquer natureza, sendo protegido contra ataques de agentes e processos microbianos e ambientais como, luz, oxigênio e hidrólise. Além disso, este perfil de liberação faz com que o ativo demore mais tempo para ser liberado, tendo como consequência direta o uso de doses menores de pesticidas no campo, menor número de aplicações, e assim, menor toxicidade e contaminação do meio ambiente (KOLI et al., 2015; SANDHYA et al., 2017). O modelo de Korsmeyer-Peppas (Tabela 3) foi aplicado na curva de calibração, a fim de se compreender o processo de liberação do herbicida nos diferentes nanocarreadores desenvolvidos.



Esquema 3: Representação esquemática da liberação do ativo. **Fonte:** Autoria própria.

Tabela 3: Modelos cinéticos aplicados ao perfil de liberação da atrazina nos diferentes nanopesticidas híbridos.

Modelo Cinético	Equações Matemáticas*
Korsmeyer-Peppas	$Q_t/Q_\infty = kt^n$

* onde Q_t : Q_t é a quantidade de herbicida liberada em um determinado tempo t^n , Q_∞ é a quantidade de herbicida liberada em um tempo infinito, k é a constante cinética de liberação de acordo com cada modelo e n é o expoente de liberação.

3.5. Estudo das propriedades magnéticas das formulações

Conhecer a forma com que os nanopesticidas liberam ativos no ambiente ainda é um grande desafio. Além disso, poucos sistemas de liberação de pesticidas têm a capacidade de serem coletados em matrizes ambientais, caso haja algum episódio de contaminação ambiental, por exemplo. Portanto neste estudo NPs/PCL-Fe₃O₄ foram inseridas em matrizes complexas (água e solo), e assim avaliou-se sua capacidade de recuperação utilizando um campo magnético simples (ímã de neodímio (50 × 50 × 24-N50)).

O solo é um material resultante de vários processos físicos e químicos que dificultam o entendimento do destino de nanopesticidas no ambiente. Portanto, para este experimento foi retirado todo material magnético já existentes no solo, a fim de não causar interferências no estudo. Assim, o solo proveniente do município de Ilha Solteira SP, foi dividido em seis amostras contendo 30 g cada em placas de petrti. Para cada uma dessas amostras foram aplicados volumes pré-determinados de formulação de NPs/PCL-Fe₃O₄, sendo uma delas destinada ao controle no qual não houve a aplicação de NPs. Após a aplicação dos nanopesticidas, as amostras foram pesadas obtendo assim o valor da massa úmida, secas em estufa a 80°C, e novamente pesadas para adquirir o valor da massa seca. Logo em seguida, um ímã de neodímio foi aproximado ao solo contendo as NPs, com intuito de recuperá-las, e todo material magnético recuperado foi pesado e plotou-se um gráfico volume de formulação versus massa recuperada.

A fim de avaliar se a recuperação de NPs ocorrem em ambiente aquoso, foi adicionado 3 mL de formulação de NPs/PCL-Fe₃O₄ em um bequer contendo 40 mL de água deionizada. Homogenizou-se a solução e em seguida, colocou o ímã de neodímio em contato ao frasco para avaliar se havia recuperação.

3.6. Efeito ecotoxicológico em macrófita

O efeito ecotoxicológico dos nanopesticidas híbridos foi avaliado em plantas da macrófita aquática *Azolla caroliniana* Willd. (Azollaceae), provenientes de matrizes coletadas na Estação Ecológica Municipal Veredas de Taquarussu, MS, Brasil (22 e 37°50,4 “S e 53°16’50,3” W) e, mantidas no Centro de Estudos de Recursos Naturais da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS), Dourados, MS, Brasil, em colaboração com o Prof. Dr. Etenaldo F. Santiago e MSc. Montcharles S. Pontes.

3.6.1. Ensaio de fluorescência de clorofila

Para o experimento, um total de 5 plantas por repetição (previamente selecionadas e mantidas em meio de nutrição Hogland) foram transferidas para um frasco vítreo contendo 1,0 mL de nanoformulação nas concentrações de 0,01 e 0,02 μmolL^{-1} , bem como água destilada foi usada como controle. O perfil de transporte de elétrons no complexo fotossintético do fotossistema II (FSII) foi estimado registrando as curvas de indução de fluorescência a clorofila-a, analisando a cinética de emissão (transiente OJIP) com base no efeito Kautsky, utilizando um fluorômetro portátil Hand PEA (Hansatech Instruments Ltd., Reino Unido) acoplado a um módulo de fase líquida. Todas as medições foram realizadas à temperatura ambiente após 30 min de adaptação ao escuro e com luz de excitação de pulso de saturação de 1 s fornecida por diodos emissores de luz (pico de 650 nm) e intensidade de luz de saturação de 3500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Cada transiente foi analisado de acordo com os seguintes dados: (etapa O) F_o , intensidade de fluorescência a 50 μs (todos os RCs estão abertos e o Q_A está totalmente oxidado); (Passo J) intensidade de fluorescência a 2 ms; (Etapa I) F_I , intensidade de fluorescência a 30 ms; e (etapa P) F_m , intensidade máxima de fluorescência (RCs fechados e Q_A totalmente reduzidos), respectivamente. Além disso, a cinética de diferença da fluorescência relativa variável é calculada para o transiente ChlF normalizado como $\Delta V_t = [(F_t - F_o) / (F_m - F_o) \text{ Tratamento} - (F_t - F_o) / (F_m - F_o) \text{ Controle}]$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Padronização da metodologia analítica para o herbicida ATZ

A curva de calibração mostra a resposta de um método analítico para quantidades conhecidas de analito. Na análise quantitativa do herbicida ATZ foram preparadas soluções de concentrações de 0,5 a 10 mg/L e foram quantificadas por espectrofotômetro UV-Visível de acordo com Ribeiro, 2021. Durante três dias consecutivos foram feitas as curvas em triplicas de acordo com ICH (ICH, 1996). A média das curvas analíticas foi calculada e apresentada na figura 7, tendo um comportamento linear, com coeficiente de correlação linear (r^2) próximo a 1.

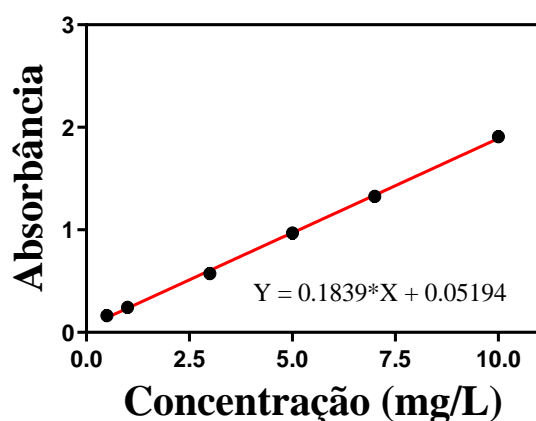


Figura 7: Curva de calibração analíticas para o herbicida Atrazina.

Os limites para detecção e quantificação dos métodos foram calculados de acordo com as equações 1 e 2 apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Limite de detecção e limite de quantificação dos métodos analíticos para a ATZ.

Limite	Atrazina
Detecção (mg.L ¹)	0,161
Quantificação (mg.L ¹)	0,539

4.2. Planejamento fatorial

Com o planejamento fatorial de ponto central, os experimentos foram avaliados com influência das variáveis de entrada (A = massa de PCL, B = volume de Fe₃O₄ e C = tempo de sonicação), como descrito na tabela 1. Assim, os resultados pertencentes a cada variável foram estudados em relação ao tamanho, índice de polidispersão (Pdi), potencial zeta (PZ) e eficiência

de encapsulação (EE (%)). Assim, buscando definir as faixas com ótimas respostas, foram totalizados onze experimentos para os valores reais dos níveis inferior (-), ponto central (0) e níveis superior (+). Tendo três réplicas para cada experimento do ponto central.

Além disso, nesse estudo, foram analisados dois métodos com e sem adição da quitosana, assim, podendo fazer a comparação entre os diferentes sistemas carreadores. Na Tabela 5, são verificadas as formulações sem a adição da quitosana, e na Tabela 7, são apresentados dados referentes à adição da quitosana. Importante destacar, que com o revestimento da quitosana foi possível observar diferentes resultados de respostas para cada análise.

Tabela 5: Matriz planejamento com valores obtidos para: Tamanho; PdI, Potencial zeta e Eficiência de Encapsulação.

Experimentos	A	B	C	Tamanho	PdI	Potencial	E.E.
						Zeta	(%)
1	-	-	-	614,5 ± 17,8	0,203 ± 0,017	-24,3 ± 0,4	91,89
2	+	-	-	823,9 ± 75,1	0,191 ± 0,062	-25,4 ± 0,5	94,67
3	-	+	-	659,6 ± 7,4	0,251 ± 0,026	-21,9 ± 0,6	93,15
4	+	+	-	931,2 ± 66,9	0,220 ± 0,055	-18,4 ± 0,3	94,08
5	-	-	+	702,2 ± 15,4	0,215 ± 0,018	-22,7 ± 0,2	91,32
6	+	-	+	809,8 ± 36,1	0,150 ± 0,101	-24,6 ± 0,7	95,14
7	-	+	+	713,6 ± 10,8	0,266 ± 0,015	-7,9 ± 0,2	93,24
8	+	+	+	1307,0 ± 116,2	0,182 ± 0,121	-2,8 ± 0,4	95,32
9	0	0	0	885,5 ± 32,9	0,239 ± 0,008	-9,5 ± 0,4	91,40
10	0	0	0	718,0 ± 5,4	0,451 ± 0,013	-24,4 ± 0,4	92,43
11	0	0	0	736,1 ± 0,3	0,281 ± 0,038	-23,5 ± 0,4	91,16

Fonte: Autoria própria.

Os nanopesticidas híbridos sem quitosana apresentaram tamanho média de 659 a 1307 nm, polidispersão variando de 0,4 a 0,1, potencial zeta negativo, e uma faixa de eficiência de encapsulamento de 91 a 95% (Tabela 5).

Tabela 6: Análise de variância (ANOVA) para os fatores A, B, e C e suas interações na resposta do Tamanho (PCL)

Fonte	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	Teste -F	P
Modelo	260932	3	869,77	0,29	0,090
A	295,95	1	147,75	4,55	0,045
B	165,25	1	82,63	2,54	0,126
C	125,85	1	62,93	1,94	0,192
A B	137,00	1	68,50	2,11	0,170
A C	55,00	1	27,50	0,85	0,487
B C	89,05	1	44,53	1,37	0,304
A B C	105,90	1	52,95	1,63	0,245
Curvatura	3554	1	3554	0,42	<0,583
Residual	16901	2	8451	-	-
Falta de ajuste	59448	3	19816	2,34	0,313
Erro puro	16901	2	8451	-	-
Total	363265	10	-	-	-

Fonte: Autoria propria.

Os resultados obtidos do planejamento para o tamanho (PCL), considerando o tratamento estatístico ANOVA (Tabela 6), mostra que apenas o fator A da variável é significativo em relação ao aumento do tamanho das nanopartículas, no ponto da curvatura P. Além disso, os efeitos de interação dos fatores B e C das variáveis foram todos não significativos, não interferindo no tamanho das nanopartículas.

Tabela 7: Matriz planejamento com valores obtidos para: Tamanho; PdI, Potencial zeta e Eficiência de Encapsulação, com revestimento de quitosana.

Experimentos	Tamanho			PdI	Potencial Zeta (1000µL CS)	E.E. (%)	
	A	B	C				
1	-	-	-	644,2 ± 24,9	0,210 ± 0,058	+ 11,1 ± 0,4	92,20
2	+	-	-	791,1 ± 57,3	0,180 ± 0,039	+ 6,4 ± 0,4	94,46
3	-	+	-	631,5 ± 20,5	0,229 ± 0,055	+ 11,2 ± 0,4	94,12
4	+	+	-	865,0 ± 67,0	0,236 ± 0,088	+ 11,3 ± 0,4	94,48
5	-	-	+	652,6 ± 39,6	0,234 ± 0,025	+ 7,0 ± 0,6	92,49
6	+	-	+	774,7 ± 42,2	0,260 ± 0,027	+ 7,0 ± 0,4	94,87

7	- + +	679,8 ± 25,7	0,270 ± 0,055	+ 14,8 ± 0,4	93,12
8	+ + +	984,2 ± 169,9	0,116 ± 0,095	+ 16,8 ± 0,8	93,69
9	0 0 0	796,4 ± 59,4	0,235 ± 0,104	+ 13,9 ± 1,0	94,10
10	0 0 0	793,4 ± 32,4	0,225 ± 0,042	+ 11,0 ± 0,8	95,00
11	0 0 0	760,4 ± 20,4	0,213 ± 0,030	+ 12,6 ± 1,3	94,10

Fonte: Autoria propria.

Já para as nanopartículas revestidas (Tabela 7), estas apresentaram tamanho médio de 631 a 984 nm, polidispersão menor que 0,3, potencial zeta positivo, com uma faixa de eficiência de encapsulamento de 92 a 94%.

Tabela 8: Análise de variância (ANOVA) para os fatores A, B, e C e suas interações na resposta do Tamanho - CS (PCL)

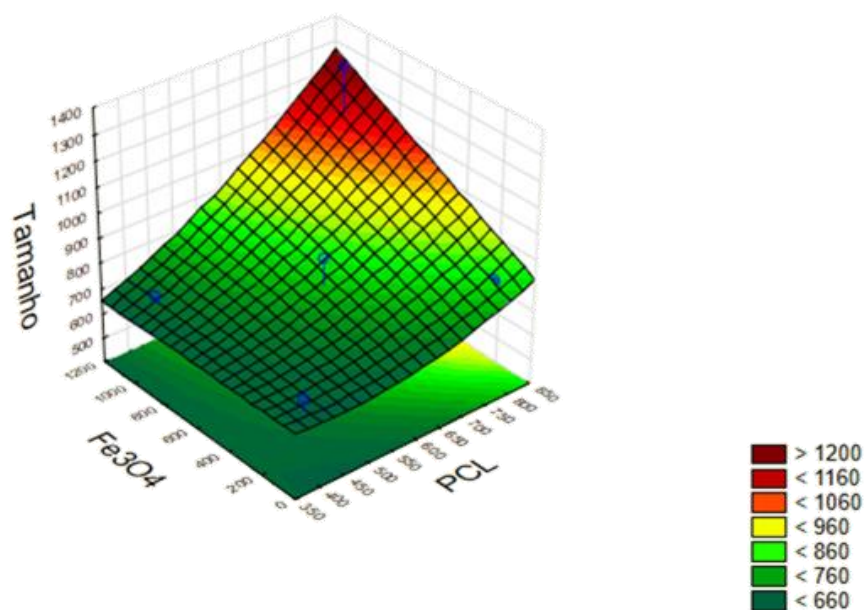
Fonte	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	Teste-F	P
Modelo	95659	3	31886,3	8,92	<0,051
A	201,725	1	147,75	6,95	0,020
B	74,475	1	82,63	2,57	0,124
C	39,875	1	62,93	1,37	0,303
A B	67,225	1	68,50	2,32	0,147
A C	11,525	1	27,50	0,40	0,730
B C	43,875	1	44,53	1,51	0,270
A B C	23,925	1	2,95	0,82	0,496
Curvatura	16	1	16,2	0,01	<0,931
Residual	3370	2	1685,0	-	-
Falta de ajuste	13154	3	4384,7	2,60	0,290
Erro puro	3370	2	1685,0	-	-
Total	113344	10	-	-	-

Fonte: Autoria propria.

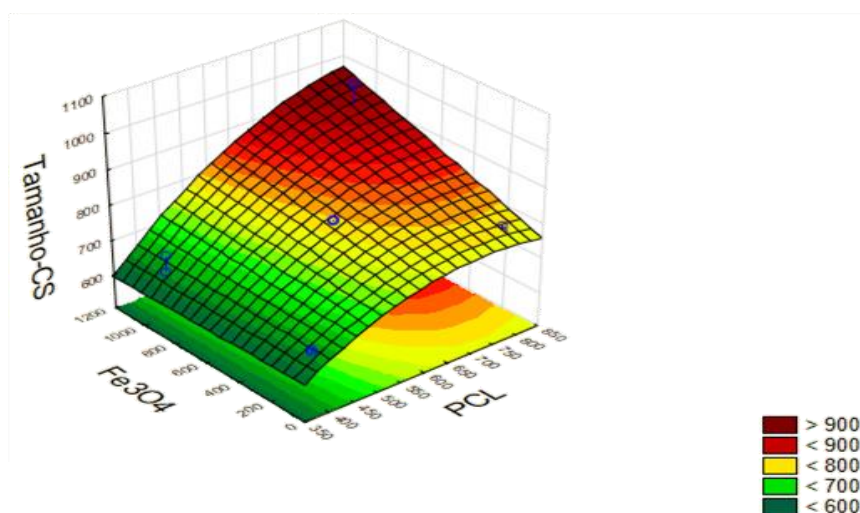
A curvatura da superfície de resposta de um planejamento fatorial demonstrou ser significativa para os intervalos de estudos. Assim, um modelo quadrático, ao invés do modelo linear, foi utilizado, uma vez que pode ser mais adequado para explicar o efeito desses fatores (Bruns, R. E., ed. Unicamp, 2001). Na Figura 8 são apresentadas as curvaturas de respostas para o tamanho das NPs, tendo a combinação de 3 variáveis principais: PCL x Fe₃O₄ x Tempo

(minutos). Sendo assim, o tamanho dos nanopesticidas foi avaliado. O ponto central foi utilizado como um terceiro nível para cada variável estudada, possibilitando a construção da superfície de resposta (curvatura), assim se observa que na superfície de resposta os resultados não são totalmente planos, tendo uma leve curvatura, indicando que a análise é completa. Além disso, as análises dos gráficos de Pareto e de probabilidade normal dos efeitos padronizados foram utilizadas para identificação da significância de cada variável principal e suas interações. Os resultados das variáveis e suas interações mostraram que a variável A (PCL) é estatisticamente significativa (figura 9-A e B). Além disso, quanto mais distante dessa linha for a variável, mais significativa essa é. Portanto, pela análise das figura 9-A e B, foi possível observar que a variável principal A é estatisticamente significativa, em relação ao tamanho da NPs.

Para ter uma variável significativa, a mesma deve estar inserida sobre a linha principal do gráfico de probabilidade normal dos efeitos padronizados, por tanto a partir desta informação, não teria nenhuma variável significativa, pois todas estão fora da linha, figura 8-C e D. Se a variável estiver à direita dessa linha, terá uma resposta maior em questão ao tamanho da NPs. Se a variável estiver à esquerda da linha, a resposta será menor ao tamanho da NPs. Tendo como o gráfico de Pareto, quanto mais distante da linha a variável estiver, mais significativamente essa contribui para a resposta dos tamanhos das NPs. O programa permite ainda realizar a análise da significância por meio da equação matemática (modelo) $y = b_0 + b_1X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_{12} X_1 X_2 + b_{13} X_1 X_3 + b_{23} X_2 X_3 + b_{123} X_1 X_2 X_3$, na qual y é a resposta, b_0 é uma constante, b_i são os coeficientes dos fatores e X_i é o nível do i -ésimo fator. (Ko et al. 2015). Feitas as alterações, X_1 foi modificado para PCL, X_2 para Fe_3O_4 e X_3 para tempo de sonicação (minutos). O modelo obtido foi: Tamanho = $820,23 + 147,75 * PCL$. Podendo observar que a variável de PCL, contribui negativamente para o aumento do tamanho. Assim, quanto maior for a adição de PCL maior será o aumento do tamanho das nanopartículas. Por outro lado, as variáveis de Fe_3O_4 e Tempo de sonicação foram insignificantes para a respostas de tamanho.



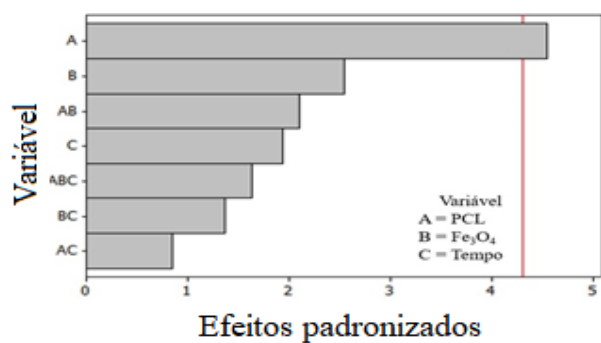
A



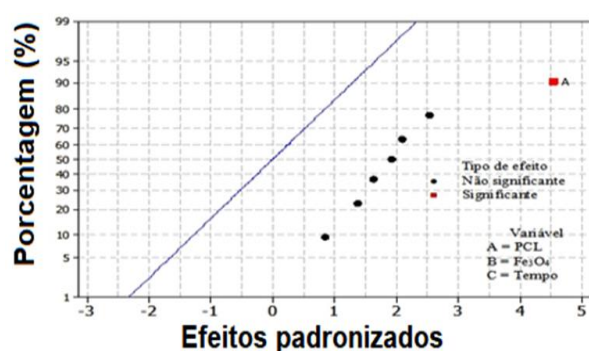
B

Figura 8: Superfícies das respostas tridimensional não plana, em relação ao tamanho das NPs de PCL Fe₃O₄ em função do tempo para combinações das variáveis: A) Nanopesticida magnético sem quitosana; B) nanopesticida magnético revestido com quitosana. **Fonte:** Autoria própria.

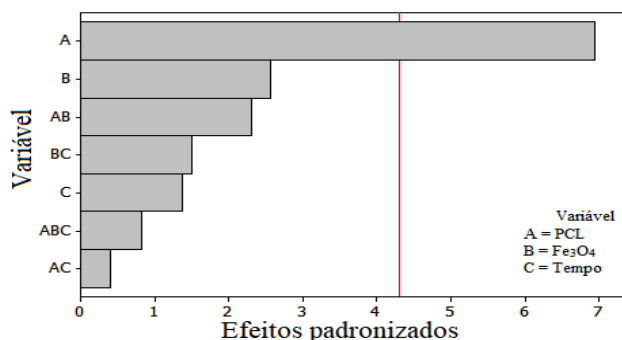
Na figura 8-A é mostrada a superfície de resposta a variação de tamanho em função da quantidade de PCL e nanopartículas magnéticas (Fe₃O₄). Como podemos observar claramente, a concentração do PCL atingiu um nível máximo para o intervalo de concentração utilizado na construção do planejamento fatorial, e a quantidade de polímero foi suficiente para aumentar o tamanho das NPs. Na figura 8-B é apresentada uma resposta de concentração inicial do PCL, só que agora com os nanopesticidas revestidos com quitosana (CS). Tais resultados mostraram que houve uma pequena redução no tamanho comparado ao nanopesticida sem quitosana, provavelmente devido a interação eletrostática entre os grupamentos nitrogenados da quitosana com os grupos carboxílicos do PCL, reduzindo assim o raio hidrodinâmico das NPs.



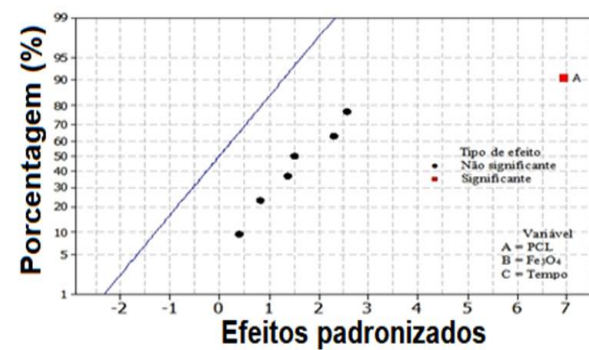
A – NPs de PCL/ATZ Fe₃O₄



C – NPs de PCL/ATZ Fe₃O₄



B – NPs de PCL/ATZ Fe₃O₄ . CS



D – NPs de PCL/ATZ Fe₃O₄ . CS

Figura 9: A e B – Gráficos de Pareto para os efeitos padronizados em $p = 0,05$; C e D – Probabilidade normal dos efeitos padronizados em $p = 0,05$. A linha tracejada em 50% de probabilidade divide os efeitos negativos dos positivos. **Fonte:** Autoria própria.

O gráfico de Pareto mostra os valores absolutos dos efeitos padronizados desde o maior efeito até o menor efeito. Os efeitos padronizados são estatísticas “t” que testam a hipótese nula de que o efeito é 0. O gráfico também traça uma linha de referência para indicar quais efeitos são estatisticamente significativos. A linha de referência para a significância estatística, depende do nível de significância (denotado por α). O gráfico Pareto determina a magnitude e a importância dos efeitos, no qual as barras cruzam a linha de referência estatisticamente significativa. O gráfico de probabilidade normal dos efeitos mostra os efeitos padronizados em relação a uma linha de ajuste de distribuição no caso em que todos os efeitos são 0. Os efeitos padronizados são estatísticas “t” que testam a hipótese nula de que o efeito é 0. Os efeitos positivos aumentam a resposta quando as definições mudam do valor baixo do fator para o valor alto do fator. Os efeitos negativos diminuem a resposta quando as definições mudam do valor baixo do fator para o valor alto do fator. Efeitos mais afastados de 0 que estão no eixo x têm maior magnitude. Efeitos mais afastados de 0 são estatisticamente mais significativos (Barros, et al. 2002).

Nas figuras 9 A e B são apresentados os gráficos de Pareto dos efeitos padronizados em $p = 0,05$. Tendo todos os efeitos padronizados, que estão em valores absolutos (para verificar os positivos e os negativos). As figuras 9 C e D indicam os efeitos que apresentaram valores maiores

que 4,3 ($p = 0,05$), que se localizam à direita da linha tracejada, estes foram significativos. Os valores absolutos padronizados dos efeitos de cada fator e das interações aparecem à direita de cada barra.

Analisando os gráficos da figura 9, a massa de PCL, volume de Fe_3O_4 e o tempo de sonicação pode ter uma interferência na variação do tamanho das NPs de PCL Fe_3O_4 . Portanto, o valor positivo de seu coeficiente significou que há um aumento no tamanho das NPs. O segundo fator importante na otimização do sistema foi o volume de Fe_3O_4 , porém não houve alteração no tamanho das NPs para ambas as formulações (sem e com revestimento de quitosana). O terceiro fator foi o tempo de sonicação (minutos), que também não resultou em variação de tamanho. Somente assim conseguimos as informações necessárias, que justificam o uso de planejamento estatístico de experimentos sobre o procedimento convencional de otimização univariada. Com o auxílio do planejamento foi possível encontrar as variáveis das nanopartículas, auxiliando assim na compreensão entre os fatores que interferem na formação das NPs. Portanto para seguir os ensaios de caracterização foi escolhido a formulação do experimento 3 do planejamento fatorial para ambas as formulações, uma vez que apresentavam menor tamanho, maior valor em módulo de potencial zeta, elevada eficiência de encapsulação e estabilidade coloidal.

4.3. Caracterização físico-química dos nanoherbicidas

A caracterização físico-química fornece informações importantes sobre as nanopartículas sintetizadas, tais como a morfologia, tamanho, concentração de nanopartículas, estado de distribuição, os grupos funcionais dos compostos que estão estabilizando ou funcionalizando as nanopartículas, entre outros. Existem diferentes técnicas para caracterizar os coloides, tais como: espectroscopia de absorção ultravioleta visível (UV-visível), espectroscopia de absorção no infravermelho (FTIR), potencial zeta (PZ), espalhamento dinâmico de luz (DLS), entre outras. Neste estudo, algumas destas técnicas foram utilizadas para caracterizar os nanoherbicidas magnéticos sem (PCL/ATZ_ Fe_3O_4 @OA) e com revestimento de quitosana (PCL/ATZ_ Fe_3O_4 @OA_CS) escolhidos do planejamento fatorial, como representada na figura 10.

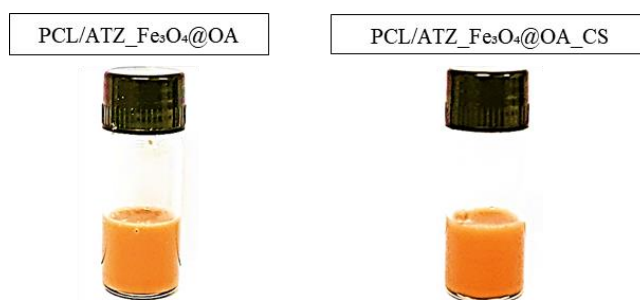


Figura 10: Formulação de nanopartículas de PCL. **Fonte:** Autoria própria.

4.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O tamanho e a morfologia das nanopartículas PCL/AZT Fe₃O₄@OA, sem e contendo a quitosana foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As micrografias presentes na figura 11 mostram que a morfologia das nanopartículas é predominantemente esférica com superfície lisa, sem a presença de agregados para ambas as formulações.

Assim, a presença de quitosana não diferiu significativamente na morfologia dos nanoherbicidas pelo MEV, e nenhuma micrografia mostrou cristais de atrazina, confirmando o alto valor de eficiência de encapsulação (E.E.%) (Tabelas 5 e 7).

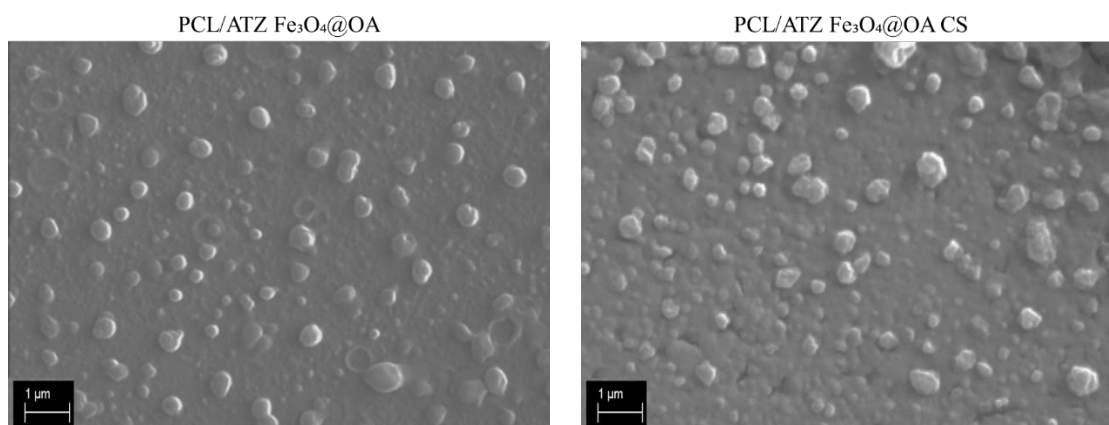


Figura 11: Micrografias das amostras dos PCLs. Está representado morfologia esférica, sem a presença de agregados. A) PCL/ATZ Fe₃O₄ e B) PCL/ATZ Fe₃O₄ CS. **Fonte:** Autoria própria.

4.5. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As amostras de atrazina (ATZ) não encapsulada e NPs Fe₃O₄@OA sem ATZ foram comparadas com os nanopesticidas híbridos sem (PCL/ATZ Fe₃O₄@OA) e com quitosana (PCL/ATZ Fe₃O₄@OA CS) por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (figura 12). O espectro da atrazina mostrou três picos característicos: (i) 3250 cm⁻¹ atribuído à ligação N – H da função amina presente na estrutura do herbicida, (ii) 2960 cm⁻¹ atribuído à

ligação C – H, e (iii) 1540 cm^{-1} atribuído à deformação angular da ligação N – H das aminas (Kolekar, PD; et at. 2014). Já no espectro de nanopartículas magnéticas foram observadas bandas em 3436 cm^{-1} atribuídas à ligação O – H, em 2927 cm^{-1} atribuídas à ligação C – H e em 611 cm^{-1} atribuídas a a ligação Fe-O (Lopez; et at. 2010). Nas amostras de nanopartículas de PCL/ATZ Fe_3O_4 @OA sem e com quitosana, observou-se bandas em 3438 cm^{-1} atribuídas à ligação O – H, 2940 a 2853 cm^{-1} atribuídas à ligação C – H, 1761 cm^{-1} atribuídas ao grupo éster C=O, 1162 cm^{-1} para a ligação C – O, e 1583 cm^{-1} atribuída à deformação angular da ligação N – H, confirmando a ligação física da atrazina ao carreador. Tendo em vista que a quantidade de quitosana é bem pequena comparada com os demais reagentes, nenhuma banda adicional foi encontrada nos nanoherbicidas híbridos revestidos com CS (PCL/ATZ Fe_3O_4 @OA CS), porém em todos os nanoherbicidas híbridos foi observado banda em 611 cm^{-1} atribuídas a ligação Fe-O.

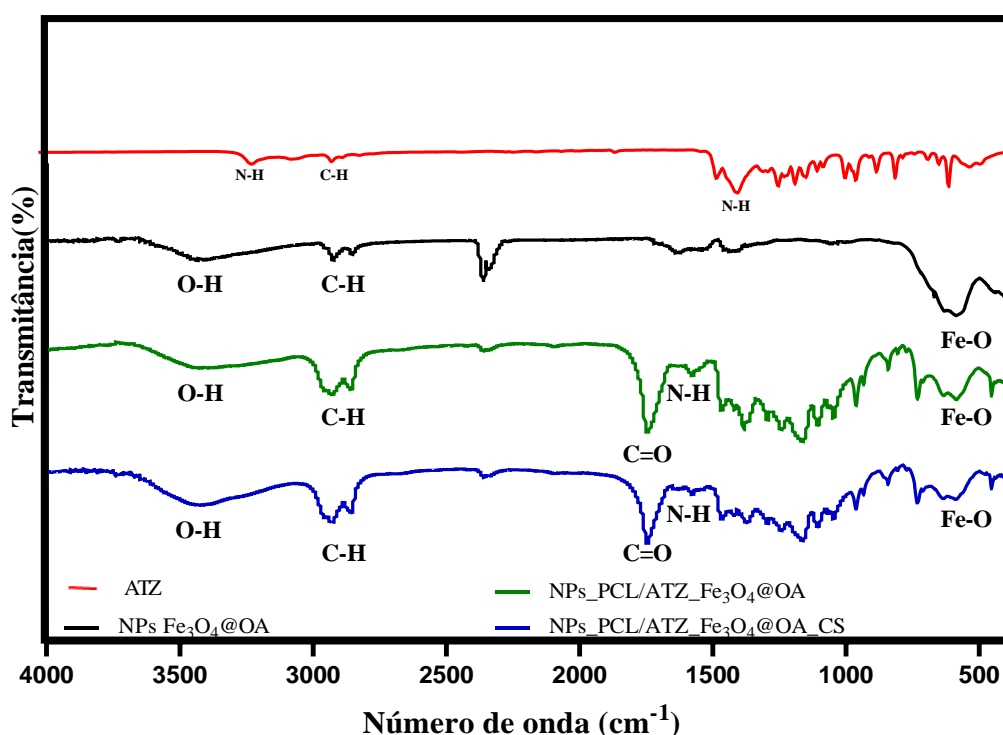


Figura 12: Espectro infravermelho da transformada de Fourier da atrazina não encapsulada (ATZ), nanopartículas magnéticas (Fe_3O_4 @OA), nanoherbicida sem quitosana (PCL/ATZ Fe_3O_4 @OA) e nanoherbicida com quitosana (PCL/ATZ Fe_3O_4 @OA CS) de 450 a 4000 cm^{-1} .

Fonte: Autoria própria.

4.6. Eficiência de encapsulação e ensaios de liberação *in vitro*

4.6.1. Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação da atrazina foi observada pelo método ultrafiltração/centrifugação e as amostras foram analisadas por espectrofotômetro UV-visível, apresentando resultados acima de 90%. Partículas em escala nanométricas possuem valores elevados de área/volume e isso permite que moléculas sejam facilmente encapsuladas em seu interior (LET; ZAVAREZE, 2012), porém a taxa de E.E. depende especificamente da natureza química de cada molécula e sua interação com o carreador. A tecnologia de encapsulamento com base nos métodos de remoção de solvente/emulsificação é considerada uma das técnicas mais promissoras para proteção e liberação de ativos, devido a sua alta eficiência de encapsulamento, manutenção da estabilidade química e liberação modificada do ativo (LU; KELLY; MIAO, 2016). No entanto, compostos hidrofílicos apresentam baixo valor de eficiência de encapsulação (~10%) quando associados em nanopartículas lipídicas, enquanto que compostos hidrofóbicos possuem alta afinidade (acima de 70%) (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Neste sentido o herbicida ATZ que possui baixa solubilidade em água (~ 28 mg/L) (EXTOXNET, 2011), está associado aos nanocarreadores poliméricos com o objetivo de uma liberação modificada, a fim de desenvolver nanoformulações que causam menos impacto ambiental e a saúde humana.

Os valores de eficiência de encapsulação para as nanoformulações de PCL/ATZ Fe₃O₄ e PCL/ATZ Fe₃O₄ CS foram elevados, mostrando uma boa afinidade do ativo com a matriz. Os dados estão representados nas Tabelas 4 e 6. Tendo assim uma eficiência de encapsulação com as médias de 93,07% para NPs de PCL/ATZ Fe₃O₄ e 93,72% para NPs de PCL/ATZ Fe₃O₄ CS para a formulação escolhido do planejamento fatorial.

4.6.2. Ensaio de liberação *in vitro*

A liberação de um ativo contido nas nanopartículas pode ser influenciada por inúmeros fatores, entre eles, tamanho das partículas, massa molar do lipídio, natureza dos reagentes e o tipo de interação entre eles (SIEPMANN; PEPPAS, 2001). Aqui comparamos a cinética de liberação da atrazina nos carreadores PCL/ATZ Fe₃O₄ e PCL/ATZ Fe₃O₄ CS em diferentes valores de pHs (4,0, 7,0 e 10,0), como mostrado na figura 13. As taxas de liberação de PCL/ATZ Fe₃O₄ e PCL/ATZ Fe₃O₄ CS foram rápidas durante os primeiros 700 minutos, e depois diminuiu a velocidade mantendo-se constante. Para o PCL/ATZ Fe₃O₄ não apresentou diferença

significativa na liberação em diferentes valores de pHs. Já para PCL/ATZ Fe₃O₄ CS houve uma liberação maior da ATZ em pHs 4 e 7 do que em pH 10,0. Essa liberação rápida do herbicida em pH < 7 ocorreu por conta do revestimento da CS nos carreadores. Sabe-se que a quitosana é rica em grupos amina (pKa 6,3), então em pH < 7 ela é protonada e permanece com seus grupos funcionais carregados positivamente (Wu et al., 2019), portanto isto favorece a liberação da atrazina nos nanocarreadores devido ao seu efeito de protonação e dissolução que pode facilitar a liberação do herbicida pelos poros. Outra hipótese é que a condição ácida reduz as ligações de hidrogênio com CS, o que também poderia promover a liberação de molécula do herbicida (Xiang et al., 2017). Com isso os resultados indicam que PCL/ATZ Fe₃O₄ CS é um carreador responsivo ao pH, podendo ser controlado pela variação do pH do ambiente.

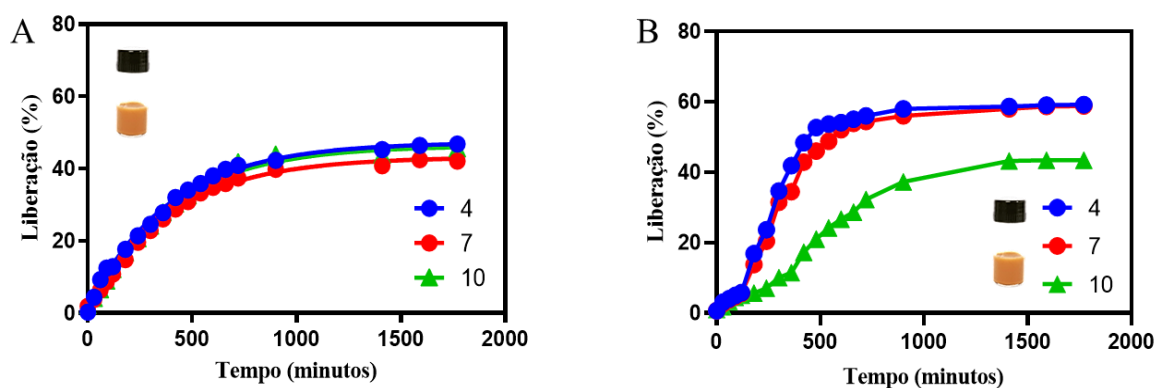


Figura 13: Cinética de liberação *in vitro* dos carreadores lipídicos nanoestruturados, em diferentes sistemas, determinação em triplicata (n=3), pHs = 4, 7 e 10: A) PCL/ATZ Fe₃O₄ e B) PCL/ATZ Fe₃O₄ CS. **Fonte:** Autoria própria.

O modelo semi-empírico de Korsmeyer-Peppas (Figura 14) foi utilizado para se compreender o mecanismo de liberação do herbicida dos nanocarreadores magnéticos. Neste contexto, a partir das curvas de liberação, e em função deste modelo foram realizadas regressões lineares a fim de se determinar os valores da constante cinética de liberação (k), bem como o coeficiente de correlação linear (r). O expoente da liberação (n) também foram calculados (tabela 8). Observa-se pelo valor de n, que PCL/ATZ Fe₃O₄ (em todos os pHs) e PCL/ATZ Fe₃O₄ CS (em pH 10) possui transporte anômalo de liberação ($n \leq 0,92$), enquanto que os nanoherbicidas revestidos apresentam mecanismo de liberação do tipo super caso II ($n > 1,0$) (Siepmann e Peppas, 2001). Nos sistemas de liberação controlada, a extensão e a velocidade de liberação resulta da combinação do transporte anômalo com o mecanismo de liberação do tipo super caso II das moléculas do ativo através das cadeias poliméricas. Tendo em vista, que o anômalo obedece às leis de Fick, enquanto o de caso II (Lopes et al., 2005) reflete na influência do relaxamento do

polímero no movimento das moléculas na matriz. Resultado este muito interessante, mostrando que o revestimento de quitosana altera o modelo com que a atrazina é liberada do nanocarreador.

Tabela 8 : Dados referentes a modelagem matemática segundo Korsmeyer Peppas

Formulações	pHs	Constante de liberação (k)	Expoente de liberação (n)	Equação da reta
PCL:ATZ	4	0,00585	0,65	$Y = 0,652 * X - 5,140$
	7	0,00344	0,72	$Y = 0,722 * X - 5,672$
	10	0,00466	0,72	$Y = 0,729 * X - 5,368$
PCL:ATZ_	4	0,00061	1,06	$Y = 1,061 * X - 7,391$
CS	7	0,00050	1,07	$Y = 1,078 * X - 7,582$
	10	0,00065	0,92	$Y = 0,920 * X - 7,333$

Fonte: Autor proprio.

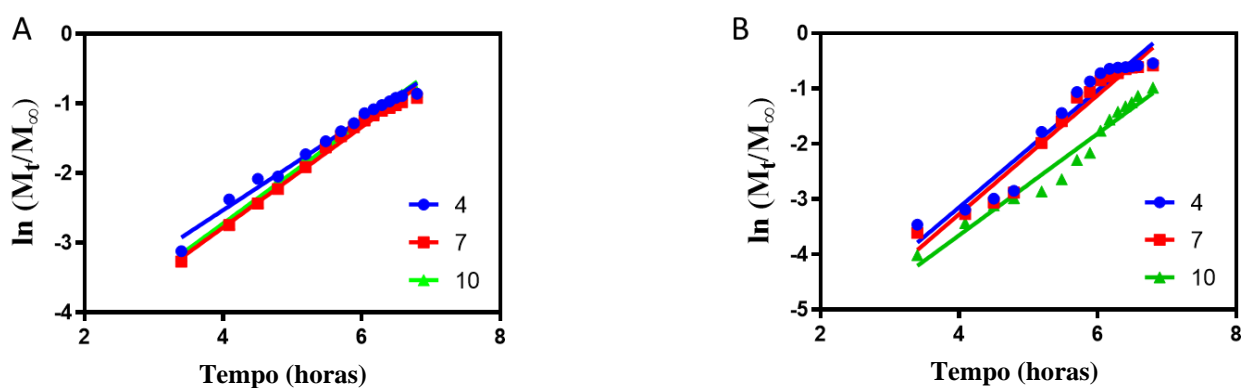


Figura 14 : Modelagem matemática segundo o modelo de Korsmeyer Peppas. A) NPs de PCL/ATZ Fe₃O₄ e B) NPs de PCL/ATZ Fe₃O₄CS. Fonte: Autoria propria.

4.7. Estudo da capacidade magnéticas dos nanopesticidas híbridos

A capacidade magnética de recuperação dos nanopesticidas foi avaliada em água e solo. Assim, um ímã de neodímio (50 × 50 × 24-N50) foi aproximado as formulações em água para avaliar sua capacidade magnética, mostrando excelente atração magnética, o que pode conferir uma melhor manipulação estes carreadores em ambientes aquáticos (Figura 15).

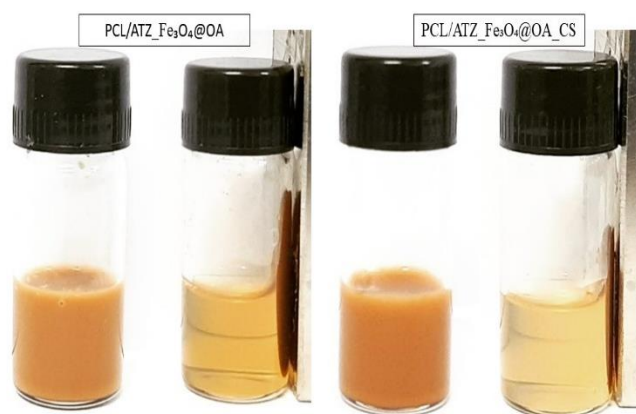


Figura 15: Avaliação da capacidade magnética dos nanopesticidas em água e recuperação.

Fonte: Autoria propria.

Além dos estudos em água, NPs de PCL/ATZ Fe_3O_4 foram adicionadas ao solo, e avaliou-se a sua capacidade de recuperação em função do volume de formulação. Em todas as foi possível fazer a retirada de NPs/PCL_ Fe_3O_4 , mostrando a eficiência em recuperação dessa formulação em uma matriz complexa como o solo. Todos os dados podem ser encontrados na Tabela 9 e Figura 16. Ademais, observou-se que a recuperação dos nanopesticidas foi dose-dependente (Figura 17), o que é muito interessante, pois a partir destes resultados, pode-se contruir uma metodologia analítica para se entender o destino de nanopesticidas biodegradáveis no solo.

Tabela 9: Dados referente a massa recuperada de nanopesticidas no solo.

NPs/PCL_ Fe_3O_4	Solo			Metal recuperado
	Volume aplicado (mL)	Massa inicial (g)	Massa úmida (g)	Massa seca (g)
03	30,00	33,02	30,00	0,25
06	30,00	36,07	30,08	1,01
09	30,00	39,05	30,01	2,20
12	30,00	41,97	30,28	4,27
15	30,00	45,99	30,46	6,51

Fonte: Autoria propria

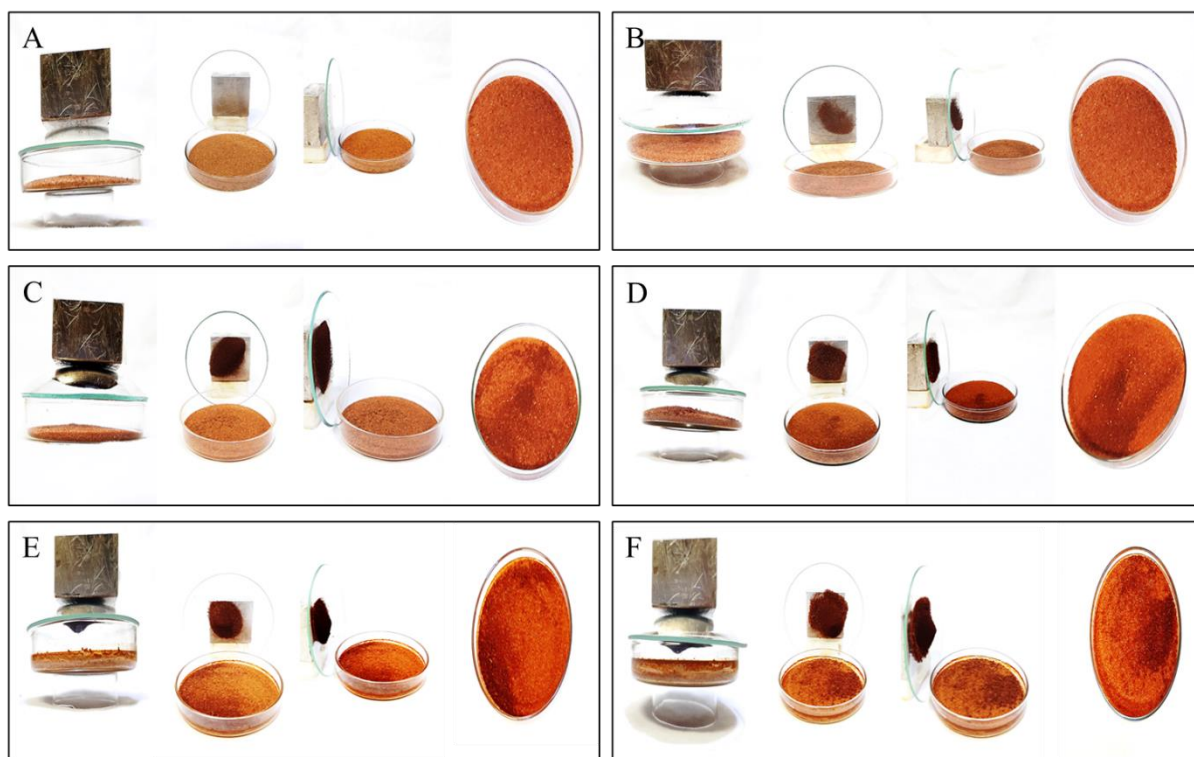


Figura 16: Tratamento solo com diferentes volumes (mL) de formulação e recuperação dos metais: A) Controle, B) 3 mL, C) 6 mL, D) 9 mL, E) 12 mL e F) 15 mL. **Fonte:** Autoria própria.

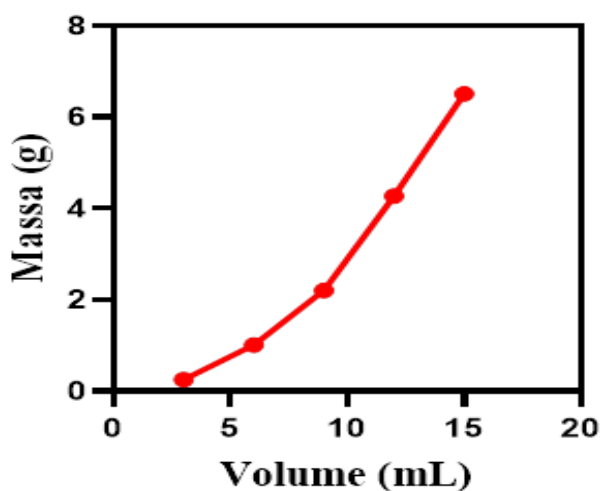


Figura 17: Perfil entre a massa recuperada no solo e o volume de formulação. **Fonte:** Autoria própria.

4.8. Efeito no aparato fotossintético

O efeito ecotoxicológico dos nanopesticidas híbridos foi avaliada em plantas aquática da espécie *Azolla caroliniana*. Tais resultados sugerem uma resposta dependente da dose/tempo da inibição do FSII por nanoformulação contendo herbicida atrazina, como mostrado na figura 18. A presença de quitosana revela pequenas alterações nas formas das curvas de dinâmica de

emissão de fluorescência, avaliada por meio dos steps OJIP e, portanto, menos inibição do FSII foi percebida. Além disso, o efeito da carga na superfície foi observado e pode ser atribuído à diferença no tipo de sistemas de entrega pela presença e ausência de quitosana (carga positiva) na superfície dos nanocarreadores. Por outro lado, pode-se observar pela primeira vez na literatura, o comportamento da liberação do herbicida atrazina no efeito do FSII, em plantas.

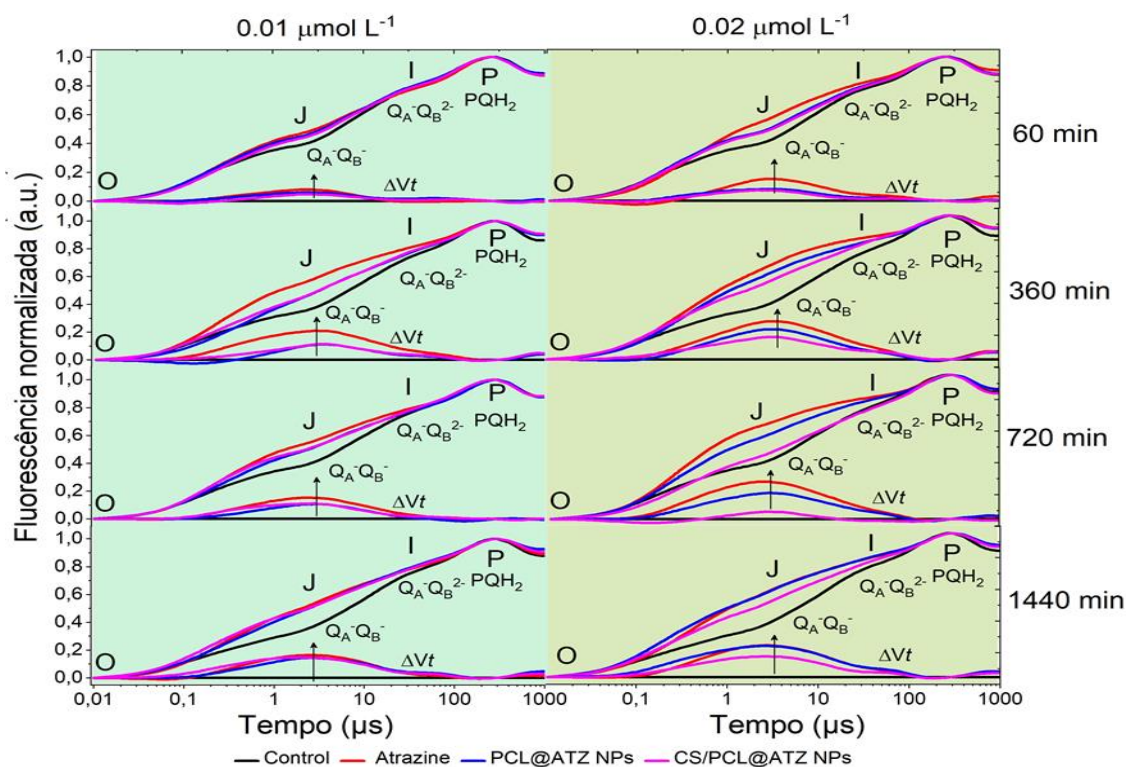


Figura 18: Cinética de emissão de fluorescência da clorofila-a (OJIP) e curvas de variação da fluorescência em intervalos de tempo (ΔVt) para plantas de *Azolla caroliniana* expostas à atrazina, bem como à nanoherbicidas magnéticos sem (PCL/ATZ_Fe₃O₄@OA) e com revestimento de quitosana (PCL/ATZ_Fe₃O₄@OA_CS). **Fonte:** Autoria própria.

O aumento da intensidade de emissão do transiente de fluorescência da clorofila a na etapa J (ou FJ) em cerca de 2 ms, está relacionado à inibição de FSII no nível de quinona secundária, bloqueando o transporte de elétrons de Q_A^- para Q_B e, conseqüentemente, aumentando o número de Q_A em sua forma reduzida (Strasser e Stirbet 2001; Strasser et al. 1995; Forini et al. 2020; Santos et al. 2020; Pontes et al. 2020). Assim, a reoxidação de Q_A^- para Q_A é inibida devido ao local de inibição alvo do herbicida atrazina (Antonacci et al. 2020). A principal ação direta da atrazina é o local Q_B da plastoquinona (PQ) da proteína D1 no FSII por inserções da molécula de atrazina no nicho de ligação de Q_B . Este nível mais alto da etapa J ao longo do tempo foi demonstrado ser devido à taxa mais baixa de fluxo de elétrons de Q_A para Q_B . Na membrana tilacóide adaptada ao escuro, o Q_A promove interferência, após adição da nanoformulação e atrazina, assim o aumento na emissão de fluorescência (etapa J e ΔVJ) está

relacionado ao estado redox do Q_A e ao bloqueio das derivações de reoxidação. Assim, impede a ligação do Q_B na proteína D1 e, conseqüentemente, o fluxo fotossintético de elétrons para o FSI é interrompido (Antonacci et al., 2020). Estes dados são muito interessantes, podendo auxiliar na compreensão do efeito e toxicidade de nanopesticidas em plantas.

5. CONCLUSÃO

Com aumento dos nanopesticidas produzidos na última década, e muitos deles apresentam resultados promissores com relação a sua eficácia e redução da toxicidade. Neste estudo foram produzidos dois nanopesticidas poliméricos magnéticos para o herbicida atrazina, um com carga negativa e outro com carga positiva (revestido com quitosana). Assim, dois planejamentos fatoriais de 2^3 com ponto central foram realizados, sendo possível selecionar duas formulações para os demais ensaios. Através dos gráficos de paretos, gerado pelo planejamento fatorial, pode-se concluir que a quantidade de polímero interfere na distribuição de tamanho dos nanoherbicidas, ao contrário da quantidade de NPs magnéticas e tempo de sonicação. Ambos os nanoherbicidas selecionados apresentaram alta eficiência de encapsulação, maior que 90%, indicando boa interação do herbicida com o sistema carreador. Os nanocarreadores sem quitosana (PCL/ATZ Fe₃O₄) apresentaram distribuição de tamanho de 659,6 nm, PDI menor que 0,2 e potencial zeta de $-21,8 \pm 0,551$ mV. Os nanoherbicidas revestidos com quitosana (PCL/ATZ Fe₃O₄_CS) apresentaram distribuição de tamanho de 631,5 nm, PDI menor de 0,2 e potencial zeta positivo de $11,2 \pm 0,351$ mV.

A liberação da atrazina nos nanoherbicidas revestidos foram responsivas ao pH e mais rápidas em relação ao nanoherbicida sem quitosana em pH 10. Ensaios em água e solo mostraram que os nanoherbicidas magnéticos podem ser recuperados após sua aplicação.

Os ensaios de plantas sugerem uma resposta dependente da dose/tempo da inibição do FSII por nanoformulação contendo herbicida atrazina, e foi possível avaliar a liberação controlada do ativo pelo efeito no aparato fotossintético das macrófitas. Assim, tais sistemas carreadores poliméricos híbridos são promissores para controlar a liberação da atrazina, e conseqüentemente, podem diminuir a dose de herbicidas que causam impactos ambientais e afeta a saúde humana. Além disso, abrem novos caminhos para o uso de liberação de pesticidas para a agricultura, uma vez que sua liberação pode ser controlada pela variação de pH, bem como, podem ser coletados (em caso de toxicidade) ou rastreados, quando se deseja estudar o destino e comportamento deles no ambiente, algo tão complexo de se fazer atualmente com as técnicas analíticas existentes. No entanto, mais estudos necessitam ser realizados em plantas e organismos não alvos, a fim de se compreender o potencial uso destes nanopesticidas na agricultura.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A. Gogos , K. Knauer , TD Bucheli J. Agric. Food Chem. , 60 (2012) , pp. 9781 – 9792 CrossRefVer registro no Scopus, 2012.

ABDI – Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial. Cartilha sobre Nanotecnologia. Brasília: MDCI; Campinas: UNICAMP, 2010.

Aktar, MW, Sengupta, D. & Chowdhury, A. Impacto do uso de pesticidas na agricultura: seus benefícios e perigos. *Interdiscip. Toxicol.* 2 , 1–12, 2009.

Amorin, MJB.; CP Roca, JJ Scott-Fordsmand.; Avaliação do efeito de nanopartículas projetadas em mídia sólida - visão atual e o caminho a seguir - *Environ. Pollut.*, 218, pp. 1370 – 1375, 2016.

Antonacci A, Celso FL, Barone G, Calandra P, Grunenber J, Moccia M, Gatto E, Giardi MT, Scognamiglio V. Novel atrazine-binding biomimetics inspired to the D1 protein from the photosystem II of *Chlamydomonas reinhardtii*. *International Journal of Biological Macromolecules.* 163, 817-823, 2020.

Antunes, D.R.; Dissertação: Síntese e caracterização de nanocarreadores lipídicos híbridos visando a liberação controlada de herbicidas; UNESP, 2020.

Aouada FA, De Moura MR. Nanotecnologia aplicada à agricultura: liberação controlada de agroquímicos. In: Rai M, Ribeiro C, Mattoso L, Duran N, editores. *Nanotecnologias em Alimentos e Agricultura.* Springer: Cham. p. 103–18. https://doi.org/10.1007/978-3-319-14024-7_5, 2015.

Barros Netos, B. de – Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria / Benício de Barros Neto, Ieda Spacino Scarminio, Roy Edward Bruns. – 2ª ed. - Campinas, Sp: Editora da Unicamp, 2002.

Bicho, RC.; FCF Santos, JJ Scott-Fordsmand, MJB Amorim.; Os efeitos dos nanomateriais de óxido de cobre (CuONMs) são dependentes do estágio de vida - ciclo de vida completo em *Enchytraeus crypticus* - *Environ. Pollut.*, 224, pp. 117 – 124, 2017a.

Bicho, RC.; FCF Santos, JJ Scott-Fordsmand, MJB Amorim.; Os efeitos multigeracionais dos nanomateriais de cobre (CuONMs) são diferentes daqueles do CuCl₂: exposição no invertebrado do solo *Enchytraeus crypticus* - *Sci. Rep.* p. 7, 2017b.

Calister Junior, W. D. *Ciência e engenharia de materiais: uma introdução.* [s.l.: s.n.].

Campos, E.V.R., de Oliveira, J.L., da Silva, C.M.G., Pascoli, M., Pasquoto, T., Lima, R., Abhilash, P.C., and Fraceto, L.F. - Polymeric and Solid Lipid Nanoparticles for Sustained Release of Carbendazim and Tebuconazole in Agricultural Applications. *Scientific Reports* 5. doi: ARTN 13809 10.1038/srep13809, 2015.

Campos, E.V.R., de Oliveira, J.L., da Silva, C.M.G., Pascoli, M., Pasquoto, T., Lima, R., Abhilash, P.C., and Fraceto, L.F. (2015). Polymeric and Solid Lipid Nanoparticles for Sustained Release of Carbendazim and Tebuconazole in Agricultural Applications. *Scientific Reports* 5. doi: ARTN 13809 10.1038/srep13809.profiles. Disponível em: <<http://extoxnet.orst.edu/pips/ametryn.htm>> Acesso em: 24 outubro 2019.

Carriger et al., 2006; JF Carriger, GM Rand, PR Gardinali, WB Perry, MS Tompkins, AM Fernandez - Pesticidas de potencial interesse ecológico em sedimentos de canais do sul da Flórida: uma priorização de risco ecológico para artrópodes aquáticos, *Solo Sediment Contam.*, 15, pp. 21 – 45, 2006.

Carvalho, F.P. - Pesticides, environment, and food safety. *Food and Energy Security* 6, 48-60, 2017.

CE, Comunicação da Comissão ao Parlamento Europeu, ao Conselho, ao Comité Económico e Social Europeu e ao Comité das Regiões. «Uma estratégia europeia para as tecnologias facilitadoras essenciais - Uma ponte para o crescimento e o emprego». <http://eur-concepts/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2012:0341:FIN:EN:PDF>, 2012.

Chart, F.; Lopes, W. A. e Fracio, M - Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. v. 27, n. 4, p. 670–673, 2004.

Chauhan N, Dilbaghi N, Gopal M, Kumar R, Kim KH, Kumar S. Desenvolvimento de nanocápsulas de quitosana para a liberação controlada de hexaconazol. *Int J Biol Macromol.* 97: 616–24, 2017.

Choudhary RC, Kumaraswamy RV, Kumari S, Sharma SS, Pal A, Raliya R, et al. As nanopartículas de cu-quitosana aumentam as respostas de defesa e o crescimento da planta em milho (*Zea mays* L.). *Sci Rep.* 7: 9754, 2017.

Clemente, Z., Grillo, R., Jonsson, M., Santos, N.Z.P., Feitosa, L.O., Lima, R., and Fraceto, L.F. - Ecotoxicological Evaluation of Poly(epsilon-Caprolactone) Nanocapsules Containing Triazine Herbicides. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 14, 4911-4917, 2014.

Da Silva, GR; Lima, TH; Oréface, RL; Fernandes-Cunha, GM; Silva-Cunha, A.; Zhao, M.; Behar-Cohen, F. In vitro e in vivo ocular biocompatibility of electrospun poly (ϵ -caprolactone) nanofibers. *EUR. J. Pharm Sci.* 73, 9-19, 2015.

Dash, TK; Konkimalla, VB Poli- ϵ -caprolactona com base em formulações para entrega de drogas e engenharia de tecidos: Uma revisão. *J. Control. Release*, 158, 15–33, 2012.

De Barros Neto, B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E.; Como Fazer Experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria, Ed. da Unicamp: Campinas, 2003.

de Oliveira, J.L., Campos, E.V.R., da Silva, C.M.G., Pasquoto, T., Lima, R., and Fraceto, L.F. - Solid Lipid Nanoparticles Co-loaded with Simazine and Atrazine: Preparation, Characterization, and Evaluation of Herbicidal Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63, 422-432. doi: 10.1021/jf5059045, 2015.

de Oliveira, J.L., Campos, E.V.R., Pereira, A.E.S., Pasquoto, T., Lima, R., Grillo, R., de Andrade, D.J., dos Santos, F.A., and Fraceto, L.F. - Zein Nanoparticles as Eco-Friendly Carrier Systems for Botanical Repellents Aiming Sustainable Agriculture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66, 1330-1340, 2018.

dos Sousa, M.V.; de Lima, F. R.; de Macêdo, H. R.; Macêdo, M. de O. C.; e Sousa, J. M. de C. - Studi of LCC incorporation in Chitosan Membrane – *Brazilian Journal of Health Review*, ISSN: 2595-6825; Vol 2, No 4, 2019.

Duncan, TV Aplicações da nanotecnologia em embalagens de alimentos e segurança alimentar: materiais de barreira, antimicrobianos e sensores. *J. Colloid Interface Sci.* 363, 1-24, 2011.

Escoto, D.F.;Gayer, M.C.; Bianchini, M.C.; Cruz, P.G.; Roehrs, R.; Denardin, E.L: Uso de Pistia stratiotes para fitorremediação de recursos hídricos contaminados por clomazone *Chemosphere*, 227, pp. 299 – 304, 2019.

Esteves, F. A. (Org.) *Fundamentos de Limnologia*. 3. ed. Rio de Janeiro: Interciencia. 826 p, 2011.

EXTOXNET - (EXTENSION TOXICOLOGY NETWORK). Pesticides information, 1998.

Fan W, Yan W, Xu Z, Ni H. Mecanismo de formação de nanopartículas de quitosana monodispersas de baixo peso molecular por técnica de gelificação iônica. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 90: 21–7, 2012.

FAO, – FAO: O futuro da alimentação e da agricultura “Tendências e desafios” 2017.

FAO, UNEP, WHO, Stakeholders and Major Groups, United Nations Programme, Agency or Fund - UNEP report identifies the main actions to minimize the adverse impacts of pesticides and fertilizers – *SDG*, 2021.

Forini MML, Antunes DR, Cavalcante LAF, Pontes MS, Biscalchin ER, Sanches AO, Santiago EF, Fraceto LF, Grillo R. Fabrication and characterization of a novel herbicide delivery system with magnetic collectability and its phytotoxic effect on photosystem ii of aquatic macrophyte. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 68(40), 11105-11113, 2020.

Fraceto, L. F.: Nanotechnology in Agriculture : Which Innovation Potential Does It Have ? *Frontiers in Chemistry*, v. 4, n. March, p. 1–5, 2016.

Gao, C.; Huang, Q.; Lan, Q.; Feng, Y.; Tang, F.; Hoi, M.P.M.: Um herbicida fácil de usar derivado de vesículas supramoleculares foto-responsivas. *Nat Commun*; 9: 2967. 2018.

Gao, Y.; Zhang, Y.; He, S.; Xiao, Y.; Qin, X.; Zhang, Y.: Fabricação de um híbrido de sílica mesoporosa oca para melhorar o direcionamento de um pesticida. *Chem Eng J*. 2019; 364: 361–9, 2019.

Goponenko AV, Dzenis YA. Papel de fatores mecânicos em aplicações de géis de polímero responsivos a estímulos - status e perspectivas. *Polímero*. 101: 415–49, 2016.

Goswami e Das, S. Goswami, S. Das Eichhornia crassipes mediou a fitorremediação de cobre e seu sucesso usando bioensaio de bagre *Chemosphere*, 210, pp. 440 – 448, 2018.

Grillo, R. Desenvolvimento de sistemas de liberação modificada para herbicidas triazínicos utilizando nanocápsulas poliméricas. 101 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP, 2011.

Grillo, R., Abhilash, P.C., and Fraceto, L.F. - Nanotechnology Applied to BioEncapsulation of Pesticides. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 16, 1231- 1234, 2016a.

Grillo, R., Clemente, Z., de Oliveira, J.L., Campos, E.V.R., Chalupe, V.C., Jonsson, C.M., de Lima, R., Sanches, G., Nishisaka, C.S., Rosa, A.H., Oehlke, K., Greiner, R., and Fraceto, L.F. - Chitosan nanoparticles loaded the herbicide paraquat: The influence of the aquatic humic substances on the colloidal stability and toxicity. *Journal of Hazardous Materials* 286, 562-572, 2015.

Grillo, R., dos Santos, N.Z.P., Maruyama, C.R., Rosa, A.H., de Lima, R., and Fraceto, L.F. - Poly(epsilon-caprolactone)nanocapsules as carrier systems for herbicides: Physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. *Journal of Hazardous Materials* 231, 1-9, 2012.

Grillo, R., Pereira, A.E.S., Nishisaka, C.S., de Lima, R., Oehlke, K., Greiner, R., and Fraceto, L.F. - Chitosan/tripolyphosphate nanoparticles loaded with paraquat herbicide: An environmentally safer alternative for weed control. *Journal of Hazardous Materials* 278, 163-171, 2014a.

Grillo, R., Rosa, A.H., and Fraceto, L.F. Poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules carrying the herbicide atrazine: effect of chitosan-coating agent on physicochemical stability and herbicide release profile. *International Journal of Environmental Science and Technology* 11, 1691-1700, 2014b.

Grillo, R.; AES Pereira, CS Nishisaka, R. de Lima, K. Oehlke, R. Greiner, LF Fraceto.; Nanopartículas de quitosana / tripolifosfato carregadas com herbicida paraquat: uma

alternativa ambientalmente mais segura para controle de ervas daninhas - J. Hazard. Mater., 278, pp. 163 – 171, 2014.

Grillo, R.; de Melo, NFS; de Lima, R.; Lourenço, RW; Rosa, AH; Fraceto, LF.; Characterization of Atrazine-Load Biodegradable Poly (Hydroxybutyrate-Co-Hydroxyvalerate) Microspheres. J. Polym. Environ. 18, 26 - 32, DOI: 10,1007 / s10924-009-0153-8, 2010.

Grillo, R.; dos Santos, NZP; Maruyama, CR; Rosa, AH; de Lima, R.; Fraceto, LF Nanocápsulas de poli (epsilon-caprolactona) como sistemas de transporte para herbicidas: caracterização físico-química e avaliação da genotoxicidade. J. Hazard. Mater, 231–232, 1 - 9, DOI: 10.1016 / j. jhazmat.2012.06.019, 2012.

Grilo, R.; Mattos, B. D. ; Antunes, D. R. ; Forini, M. M. L. ; Monikh, F. A. ; Rojas, O. J. . Foliage adhesion and interactions with particulate delivery systems for plant nanobionics and intelligent agriculture. Nano Today, v. 37, p. 101078, 2021.

Guan et al., 2008; Y. Guan , RC Pearce , AV Melechko , DK Hensley , ML Simpson , PD Rack - Desparafinação a laser pulsada de catalisador de níquel para crescimento de nanofibras de carbono, Nanotecnologia , 19, Artigo 235604, 2008.

Guo M, Zhang W, Ding G, Guo D, Zhu J, Wang B, et al. Preparação e caracterização de microcápsulas de benzoato de emamectina responsivas a enzimas baseadas em uma matriz de copolímero de sílica-epiclorohidrina-carboximetilcelulose. RSC Adv.; 5: 93170–9, 2015.

Islam, M.A. & Nishibori, M. - Use of multivitamin, acidifier and Azolla in the diet of broiler chickens. Asian-Australian; Journal of Animal Sciences. 30(5): 683–689. Available: doi: 10.5713/ajas.16.0395. Consulted: February 12, 2019.ABDI – Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial (2010). Cartilha sobre Nanotecnologia. Brasília: MDIC; Campinas: UNICAMP, 2017.

Jadhav, N. V.; Prasad, A. I.; Kumar, A.; Mishra, R.; Dharas, S. .; Babu, K. R.; Prajapat, C. L.; Mmisra, N. L.; Ningthoujam, R. S. . P.; B. N.; VATSA, R. K. Synthesis of oleic acid functionalized Fe₃O₄ magnetic nanoparticles and studying their interaction with tumor cells for potential hyperthermia applications. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 108, p. 158–168, 2013.

Kah et al., 2019; M. Kah , N. Tufenkji , JC White: Estratégias nano-habilitadas para melhorar a nutrição e proteção da cultura, Nat. Nanotechnol, pp. 532 – 540. F. Torney , BG Trewyn , VSY Lin , K. Wang Nat. Nanotechnol. , 2, pp. 295 – 300 CrossRefVer registro no Scopus, 2007.

Kah, M., Beulke, S., Tiede, K. & Hofmann, T. Nanopesticidas: estado do conhecimento, destino ambiental e modelagem de exposição. Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 43, 1823–1867, 2013.

Kah, M., Machinski, P., Koerner, P., Tiede, K., Grillo, R., Fraceto, L.F., and Hofmann, T. - Analysing the fate of nanopesticides in soil and the applicability of regulatory protocols using a polymer-based nanoformulation of atrazine. *Environmental Science and Pollution Research* 21, 11699-11707, 2014.

Kah, M., Weniger, A.K., and Hofmann, T. - Impacts of (Nano)formulations on the Fate of an Insecticide in Soil and Consequences for Environmental Exposure Assessment. *Environmental Science & Technology* 50, 10960-10967. doi: 10.1021/acs.est.6b02477, 2016.

Kah, M.; RS Kookana, A. Gogos, TD Bucheli.; Uma avaliação crítica de nanopesticidas e nanofertilizantes em comparação com seus análogos convencionais - *Nat. Nanotechnol*, 13 (8) (2018), pp. 677 – 684.

Kamba, S. A.; Ismail, M.; Hussein-AL-ALI, S. H.; et al. In Vitro Delivery and Controlled Release of Doxorubicin for Targeting Osteosarcoma Bone Cancer. *Molecules*, v. 18, p. 10580–10598, 2013.

Kay, L., & Shapira, P. - Developing nanotechnology in Latin America. *Journal of Nanoparticle Research*, 11(2), 259-278. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s11051-008-9503-z>, February, 2009.

Khoobdel, M.; Ahsaei, S. M.; Farzaneh, M. - Insecticidal activity of polycaprolactone nanocapsules loaded with *Rosmarinus officinalis* essential oil on *Tribolium castaneum* (Herbst) – *Entomological Research*, Vol. 47, ed 3, pag. 175 – 184, 2017.

Klochikhin, E. A., & Shapira, P. - Engineering small worlds in a big society: assessing the early impacts of nanotechnology in China. *Review of Policy Research*, 29, 752-775. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1541-1338.2012.00596.x>, 2012.

Ko, W.; Chang, C.; Wang, H.; Wang, S.; Hsieh, C.; *Food Chem*, 172, 497, 2015.

Kocak G, Tuncer C. Bütün V. pH-Responsive polymers. *Polym Chem*. 8: 144, 76, 2016.

Kolekar, PD; Phugare, SS; Jadhav, JP Biodegradation of atrazine by *Rhodococcus* sp. BCH₂ para N-isopropilammelida com subsequente avaliação da toxicidade dos metabólitos biodegradados. *Environ. Sci. Pollut. Res*, 21, 2334 – 2345, DOI: 10.1007 / s11356-013-2151-6, 2014.

Koli, P.; Singh, B. B.; Shakil, N. A.; Kumar, J.; Kamil, D. Development of controlled release nanoformulations of carbendazim employing amphiphilic polymers and their bioefficacy evaluation against *Rhizoctonia solani*. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, v. 50, n. 9, p. 674–681, 2015.

Kumar, P. Shiny, C. Anjali, J. Jerobin, KM Goshen, S. Magdassi, A. Mukherjee, N. Chandrasekaran - Efeitos distintos da permetrina de tamanho nano no meio ambiente, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 20, pp. 2593 – 2602, 2013.

Let, A.; Zavareze, R. Revisão : Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos Review : Characteristics of nanoparticles and their potential applications in foods. p. 99–109, 2012.

Li X, Han J, Wang X, Zhang Y, Jia C, Qin J, et al. Um sistema de entrega de hormônio responsivo a estímulos triplos equipado com nanoválvulas magnéticas de pilarareno. *Mater Chem Front.*; 3: 103–10, 2019.

Li, X; Xie, J.; Yuan, X.; Xia, Y. Revestimento de fibras de poli (ϵ -caprolactona) eletrofiadas com gelatina e fosfato de cálcio e seu uso como suportes biomiméticos para engenharia de tecido ósseo. *Langmuir*, 24, 14145–14150, 2008.

Liang W, Yu A, Wang G, Zheng F, Jia J, Xu H. Nanopartículas de avermectina à base de quitosana para controlar os nematóides da madeira do pinheiro. *Int J Biol Macromol*; 112: 258–63, 2018.

Liang Y, Guo M, Fan C, Dong H, Ding G, Zhang W, et al. Desenvolvimento de novas microcápsulas pendimetalina responsivas à urease usando sílica-IPTS-PEI como materiais transportadores de liberação controlada. *ACS Sustain Chem Eng.*; 5: 4802–10, 2017.

Lopes, C. M.; Lobo, J. M. S. e Costa, P. – Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos – *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 41, 2005.

Lopez, JA; González, F.; Bonilla, FA; Zambrano, G.; Gómez, ME Síntese e caracterização de nanofluido magnético Fe_3O_4 . *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, 30, 60 – 66, 2010.

Lu, W.; Kelly, A. L.; Miao, S. Trends in Food Science & Technology Emulsion-based encapsulation and delivery systems for polyphenols. *Trends in Food Science & Technology*, v. 47, p. 1–9, 2016.

M. Kah, RS Kookana, A. Gogos e TD Bucheli, A Critical Evaluation of Nanopesticides and Nanofertilizers Against their Conventional Analogues, *Nat. Nanotechnol.* 13 , 677–684, 2018.

Maraschin-Silva, F.; Scherer, A.; Baptista, M. R. L.; Diversidade e estrutura do componente herbáceo-subarbusivo em vegetação secundária de Floresta Atlântica no sul do Brasil. *Revista brasileira Biociência*, Porto Alegre, v. 7, n. 1, p. 53-65, jan./mar. 2009.

Marletta, G.; Ciapetti, G.; Satriano, C.; Perut, F.; Salerno, M.; Baldini, N. Melhoria da diferenciação osteogênica de células estromais da medula humana cultivadas em poli- ϵ -caprolactona quimicamente estruturada induzida por íons. *Biomaterials*, 28, 1132–1140, 2007.

Maruyama CR, Guilger M, Pascoli M, Bileshy-José N, Abhilash PC, Fraceto LF, et al. Nanopartículas à base de quitosana como carreadores dos herbicidas combinados Imazapic e Imazapyr. *Sci Rep.*; 6: 19768, 2016.

Matich, EK.; NGC Soria, DS Aga, GE Atilla-Gokcumen.; Aplicações da metabolômica na avaliação dos efeitos ecológicos de contaminantes e poluentes emergentes nas plantas - *J. Hazard. Mater.*, 373, pp. 527 – 535, 2019.

Mendes, LA.; MJB Amorim, JJ Scott-Fordsmand.; As interações das espécies de solo expostas a CuO NMs são diferentes do sal de Cu: um teste multiespécies - *Environ. Sci. Technol.*, 52 (7), pp. 4413 – 4421, 2018.

Ministério da Ciência e Tecnologia. Livro Azul da 4^a Conferência Nacional de Ciência e Tecnologia e Inovação para o Desenvolvimento Sustentável. Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia, Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2010.

Mora-Huertas, C. E.; Fessi, H.; Elaissari, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutical*, v. 385, p. 113–142, 2010.

Morita, T; Viegas, R. M. A. - Manual de soluções, reagentes e solventes padronização, preparação, purificação, indicadores de segurança e descarte de produtos químicos – São Paulo: Editora Blucher, 2007.

Nações Unidas, Relatório do Conselho de Direitos Humanos do Relator Especial sobre o Direito à Alimentação (A / HRC / 34/48) (ReliefWeb); <https://reliefweb.int/report/world/report-special-rapator-right-food-ahrc3448>, 2017.

Neri-Badang MC, Chakraborty S. Carbohydrate polímeros como dispositivos de liberação controlada para pesticidas. *J Carbohydr Chem*; 38: 67–85, 2019.

Nuruzzaman, M., Rahman, M.M., Liu, Y.J., and Naidu, R. Nanoencapsulation, Nano-guard for Pesticides: A New Window for Safe Application. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64, 1447-1483. doi: 10.1021/acs.jafc.5b05214, 2016.

ObservatoryNANO FP7, European nanotechnology landscape report, 2011. <http://www.scor.com/en/sgrc/pac/motor/item/1327-european-nanotechnology-landscape-report.html> .

ObservatoryNANO, Briefing No. 20. Análise Estatística de Patentes. Patentes: um indicador de inovação em nanotecnologia, 2011. http://www.nanopinion.eu/sites/default/files/briefing_no.20_patents_-_an_indicator_of_nanotechnology_innovation.pdf .

Oliveira, H. C.; Moreira, R.S.; Martinez, C.B.R.; Grillo, R.; de Jesus, M.B.; Fraceto, L. F. - Nanoencapsulation Enhances the Post-Emergence Herbicidal Activity of Atrazine against Mustard Plants - *journal. pone.013297*, 2015.

Oliveira, H. C.; Stolf-Moreira, R.; Martinez, C. B. R.; Grillo, R.; de Jesus, M. B.; Fraceto, L. F., *Plos One*, 2015.

Oliveira, H.C., Stolf-Moreira, R., Martinez, C.B.R., Sousa, G.F.M., Grillo, R., de Jesus, M.B., and Fraceto, L.F. Evaluation of the side effects of poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules containing atrazine toward maize plants. *Frontiers in Chemistry* 3, 2015b.

Oliveira, HC.; Stolf-Moreira, R.; Martinez, CBR.; Grillo, R.; de Jesus, MB.; Fraceto, LF.; Nanoencapsulation Enhances the Post-Emergence Herbicidal Activity of Atrazine against Mostarda Plants. *PLoS One*, 10, e0132971DOI: 10.1371 / journal. pone.0132971, 2015.

Paiva, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S.; Vyvyan, J. R. Introdução à espectroscopia. São Paulo, 2012.

Pascoli, M.; FP de Albuquerque, AK Calzavara, B. Tinoco-Nunes, WHC Oliveira, KC Gonçalves, RA Polanczyk, JF Della Vechia, STS de Matoss, D. de Andrade, HC Oliveira, JA Souza-Neto, R. de Lima, LF Fraceto.; O potencial do nanobiopesticida com base em nanopartículas de zeína e óleo de nim para o controle aprimorado de pragas agrícolas - *J. Pest Sei.*, 93 (2), pp. 793 – 806, 2020.

Patel S, Bajpai J, Saini R, Bajpai AK, Acharya S. Liberação sustentada de pesticida (cipermetrina) de nanocarreadores: uma técnica eficaz para proteção ambiental e de cultivo. *Processo Saf Environ Prot.*; 117: 315–25, 2018.

Patty, P. J.; Frisken, B. Direct determination of the number-weighted mean radius and polydispersity from dynamic light-scattering data. 45, 2006.

Peixoto, F. J. M. Nanotecnologia e sistemas de inovação: implicações para política de inovação no Brasil. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2013.

Pereira, A.E.S., Grillo, R., Mello, N.F.S., Rosa, A.H., and Fraceto, L.F. 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* 268, 207-215, 2014a.

Pereira, A.E.S., Grillo, R., Melo, N.F.S., Rosa, A.H., and Fraceto, L.F. Poly-epsilon-caprolactone nanoparticles containing atrazine: From the preparation to evaluation of the herbicide activity and genotoxic effects. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 248, 2014b.

Pereira, I. B. Avaliação toxicogenética do biocida timol encapsulado em nanopartícula biogênica de sílica sobre organismos aquáticos. 2020. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2020.

Pimentel, D. Custos ambientais e econômicos da aplicação de pesticidas principalmente nos Estados Unidos. *Environ. Dev. Sustent.* 7, 229–252, 2020.

Pompêo, M. Monitoramento e manejo de macrófitas aquáticas em reservatórios tropicais brasileiros / Marcelo Pompêo. São Paulo; Instituto de Biociências da USP, 2017. 138p.

Pontes MS, Graciano DE, Antunes DR, Santos JS, Arruda GJ, Botero ER, Lima SM, Grillo R, Andrade LHC, Caires ARL, Santiago EF. In vitro and in vivo impact assessment of eco-designed CuO nanoparticles on non-target aquatic photoautotrophic organisms. *Journal of Hazardous Materials*. 396, 122484, 2020.

Pourzahedi, L.; M. Pandorf, D. Ravikumar, JB Zimmerman, TP Seager, TL Theis, P. Westerhoff, LM Gilbertson, GV Lowry.; Considerações sobre o ciclo de vida dos agroquímicos nano-habilitados: as ferramentas de hoje estão à altura da tarefa? - *Environ. Sci. Nano*, 5 (5), pp. 1057 – 1069, 2018.

R. Raliya, V. Saharan, C. Dimkpa e P. Biswas, Nanofertilizer for Precision and Sustainable Agriculture: Current State and Future Perspectives, *J. Agric. Food Chem.* , 66 , 6487–6503, 2018.

R.J. Strasser, A. Srivastava, Govindjee, Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochem. Photobiol.* 61, 32–42, 1995.

R.J. Strasser, A.D. Stirbet, Estimation of the energetic connectivity of PS II centers in plants using the fluorescence rise O-J-IP; Fitting of experimental data to three different PS II models. *Math. Comp. Simul.* 56, 451–461, 2001.

Ragaei e Sabry; M. Ragaei, A-kh Sabry - Nanotecnologia para controle de pragas de insetos, *Int. J. Sci. Environ. Technol*, 3, pp. 528 – 545, 2014.

Rai e Ingle; M. Rai, A. Ingle - Papel da nanotecnologia na agricultura, com referência especial ao manejo de pragas de insetos, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 94, pp. 287 – 293, 2012.

Reis, C.; De Andrade, J. C.; Bruns, R. E.; *Quim. Nova*, 22, 189, 1999.

Renn, O., & Roco, M. (2006). Nanotechnology risk governance. International Risk Governance Council, Geneva. Acesso em 20 de novembro de 2020, de <http://www.irgc.org/issues/nanotechnology/nanotechnology-risk-governance/>.

Resch, Sibelly; Farina, Milton Carlos, *REV. ADM. MACKENZIE*, 16(3), Edição Especial, 51-75 • SÃO PAULO, SP • MAIO/JUN. • ISSN 1518-6776 (impresso) • ISSN 1678-6971 (on-line), 2015.

Resh e Cardé; VH Resh, RT Cardé: *Enciclopédia de Insetos*, Imprensa acadêmica 2009.

Reyes-Ortega, F. Polímeros responsivos ao pH: propriedades, síntese e aplicações. In: Román, JS, Aguilar, MR, editores. Polímeros inteligentes e suas aplicações. Cambridge: Woodhead Publishing; . <https://doi.org/10.1533/9780857097026.1.45>. 2014.

Rezende, S. S.; Guterres, S. S.; Freitas, L. de L. e Pohlmann, A. R. - Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

RK Sastry , HB Rashmi , NH Rao J. Intellect. Prop. Rights , 15 (2010) , pp. 197 - 205

Rocha, M. N.; Fujimoto, T. G. O azul do céu e o vermelho do p^h. v. 3501, 2010.

Sandhya; Kumar, S.; Kumar, D.; Dilbaghi, N. Preparation, characterization, and bio-efficacy evaluation of controlled release carbendazim-loaded polymeric nanoparticles. Environmental Science and Pollution Research, v. 24, n. 1, p. 926–937, 2017. Environmental Science and Pollution Research. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11356-016-7774-y>>.

Santos JS, Pontes MS, Grillo R, Fiorucci AR, Arruda GJ, Santiago EF. Physiological mechanisms and phytoremediation potential of the macrophyte *Salvinia biloba* towards a commercial formulation and an analytical standard of glyphosate. Chemosphere. 259, 127417, 2020.

Sarmiento B, Ferreira D, Veiga F, Ribeiro A. Caracterização de nanopartículas de alginato carregadas de insulina produzidas por pré-gelificação ionotrópica através de estudos DSC e FTIR. Carbohydr Polym; 66: 1–7, 2006.

Schoeder, A. O. I. N. G. Functionalized polystyrene beads as carriers in release studies of two herbicides : 2 , 4 - dichlorophenoxyacetic acid and 2 - methyl - 4 - chlorophenoxyacetic acid. International Journal of Environmental Science and Technology, v. 16, n. 10, p. 5623–5634, 2019.

Scognamiglio V, Antonacci A, Arduini F, Moscone D, Campos EVR, Fraceto LF, Palleschi G. An eco-designed paper-based algal biosensor for nanoformulated herbicide optical detection. Journal of Hazardous Materials. 373, 483-492, 2019.

Shangguan L, Shi B, Chen Q, Li Y, Zhu H, Liu Y, et al. Pilar solúvel em água [5] arenos: uma nova classe de reguladores de crescimento de plantas. Tetrahedron Lett; 60: 150949, 2019.

Siepmann, J.; Peppas, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). Advanced Drug Delivery Reviews, v. 48, p. 139–157, 2001.

Skjolding, LM; SN Sorensen, NB Hartmann, R. Hjorth, SF Hansen, A. Baun.; Teste de ecotoxicidade aquática de nanopartículas - a busca para divulgar os efeitos das nanopartículas - *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 55 (49), pp. 15224 – 15239, 2016.

SM Rodrigues, P. Demokritou, N. Dokoozlian, CO Hendren, B. Karn, MS Mauter, OA Sadik, M. Safarpour, JM Unrine e J. Viers, Nanotecnologia para Produção Sustentável de Alimentos: Oportunidades Promissoras e Desafios Científicos, *Environ. Sci. : Nano*, 4 , 767–781, 2017.

Strasser RJ, Srivastava A, Govindjee, Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochemistry and Photobiology*. 61, 32-42, 1995.

Strasser RJ, Stirbet AD. Estimation of the energetic connectivity of PS II centers in plants using the fluorescence rise O-J-IP; Fitting of experimental data to three different PS II models. *Mathematics and Computers in Simulation*. 56, 451-461, 2001.

Suport ao Minitab; Gráficos de resíduos para analisar experimento de caracterização do processo definitivo. 2018. Disponível em: <<https://support.minitab.com/pt-br/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/doe/how-to/screening/analyze-screening-design/interpret-the-results/all-statistics-and-graphs/residual-plots/>> Acesso em 09 março de 2021.

Tao W, Wang J, Parak WJ, Farokhzad OC, Shi J. Nanobuffering de polímeros responsivos ao pH: um fenômeno conhecido, mas às vezes esquecido, e suas aplicações biológicas. *ACS Nano*; 13: 4876–82, 2019.

Trindade, T. R. C.; Pereira, A. S.; Albertoni, F. E.; Palma-Silva, C.; Caracterização e importância das macrófitas aquáticas com ênfase nos ambientes límnicos do campus Carreiros – FURG, Rio Grande, RS. *Cadernos de ecologia aquáticas*. v. 5 (2): 1-22, 2010.

U. Schreiber, Assessment of maximal fluorescence yield: donor-side dependent quenching and Q_B -quenching. In: VanKooten, O., Snel, J.F.H. (eds) *Plant spectrofluorometry: applications and basic research*. Rozenberg Publishers, Amsterdam, The Netherlands, pp 23–47, 2002.

United Nations. "World Population Prospects: The 2017 Revision. ", in: Department of Economic and Social Affairs, Population Division. (New York: United Nations), 2017.

V. Scognamiglio, A. Antonacci, F. Arduini, D. Moscone, E.V.R. Campos, L.F. Fraceto, G. Palleschi. An eco-designed paper-based algal biosensor for nanoformulated herbicide optical detection. *J. Haz. Mater.* 373 483-492, 2019.

V. Scognamiglio, D. Raffi, M. Lambreva, G. Rea, A. Tibuzzi, G. Pezzotti, U. Johanningmeier, M.T. Giardi, *Chlamydomonas reinhardtii* genetic variants as probes for fluorescence sensing system in detection of pollutants. *Anal. Bioanal. Chem.* 394 1081, 2009.

Walker, G.W.; RS Kookana, N.E. Smith, M. Kah, C.L. Doolette, P.T. Reeves, W. Lovell, D.J. Anderson, T.W. Turney, D.A. Navarro.; Avaliação de risco ecológico de pesticidas nano-habilitados: uma perspectiva sobre a formulação do problema - *J. Agr. Food Chem.*, 66, pp. 6480 – 6486, 2018.

Wang, D.; Green, M.D.; Chen, K.; Daengngam, C.; Kotsuchibashi, Y. - Polímeros responsivos a estímulos: projeto, síntese, caracterização e aplicações. *Int J Polym Sci.* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6480259> .

Wang, X.; Du, Y.; Fan, L.; Liu, H. e Hu, Y. - Chitosan-metal complexes as an antimicrobial agent: Synthesis, characterization and structure-activity study - *Polymer Bulletin*, v. 55, p 105 – 113, 2005.

Wu, J., Jiang, W., Tian, R.B., Shen, Y.W., and Jiang, W. - Facile synthesis of magnetic-/pH-responsive hydrogel beads based on Fe₃O₄ nanoparticles and chitosan hydrogel as MTX carriers for controlled drug release. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition* 27, 1553-1568, 2016.

Xiang, Y; Zhang, G; Chi, Y; Cai, D; Wu, Z - Fabrication of a controllable nanopesticide system with magnetic collectability - *Chemical Engineering Journal*, Elsevier – 2017.

Yusoff, S.N.M., Kamari, A., and Aljafree, N.F.A. (2016). A review of materials used as carrier agents in pesticide formulations. *International Journal of Environmental Science and Technology* 13, 2977-2994.

Zelenkova, T., Mora, M.J., Barresi, A.A., Granero, G.E., and Fissore, D. (2018). On the Production of Chitosan-Coated Polycaprolactone Nanoparticles in a Confined Impinging Jet Reactor. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 107, 1157-1166.

Zhu, W.; Castro, N.J.; Cheng, X.; Keidar, M.; Zhang, L.G. Cold Atmospheric Plasma Modified Electrospun Scaffolds com Embedded Microspheres for Improved Cartilage Regeneration. *PLoS ONE* 2015, 10.

7. APÊNDICE: IMPACTO AMBIENTAL E SOCIAL

O desenvolvimento de nanopesticidas se expandiu consideravelmente nos últimos anos, com o potencial de impactos positivos na agricultura, uma vez que podem reduzir a concentração de ativos no campo, e assim sua toxicidade. No entanto, o nível atual de conhecimento sobre os efeitos de liberação dos ativos nestes nanocarreadores e o seu efeito ecotoxicológico ainda é escasso, principalmente em relação aos seus mecanismos de ação. Assim, desenvolver carreadores de liberação de herbicidas responsivos e que possam ser rastreados (por um campo magnético) ou coletados do ambiente (em caso de contaminação ambiental) são cruciais para avaliar seus efeitos e prever futuras aplicações mais seguras para a agricultura no planeta.



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A52401E

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: A52401E
Usuário: Renato Grillo
CPF/CNPJ: 334.857.178-27
Objeto do Acesso: Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso: Pesquisa

Espécie

Lenma valdiviana

Azolla caroliniana

Título da Atividade: Monitoramento das alterações induzidas em organismos fotossintéticos por nanocarreadores contendo bioativos via técnica de fluorescência e espectroscopia óptica.

Equipe

Renato Grillo	UNESP
Etenaldo Felipe Santiago	UEMS

Data do Cadastro: 29/05/2021 12:27:30

Situação do Cadastro: Concluído

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 12:27 de 29/05/2021.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - SISGEN