



(21) BR 102021025893-4 A2

República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria,  
Comércio e Serviços  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(22) Data do Depósito: 21/12/2021

(43) Data da Publicação Nacional:  
04/07/2023

(54) **Título:** FORMULAÇÃO HERBICIDA, PROCESSO DE OBTENÇÃO DA FORMULAÇÃO HERBICIDA E USO DA FORMULAÇÃO HERBICIDA

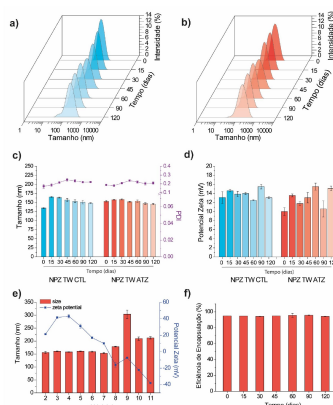
(51) **Int. Cl.:** A01N 25/28; A01P 13/00.

(52) **CPC:** A01N 25/28; A01P 13/00.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO.

(72) **Inventor(es):** LEONARDO FERNANDES FRACETO; LUCAS BRAGANÇA DE CARVALHO; PATRÍCIA LUIZA DE FREITAS PROENÇA; ISABELA SILVA GODOY; HALLEY CAIXETA DE OLIVEIRA; GILIARDI DALAZEN.

(57) **Resumo:** FORMULAÇÃO HERBICIDA, PROCESSO DE OBTENÇÃO DA FORMULAÇÃO HERBICIDA E USO DA FORMULAÇÃO HERBICIDA. A presente inovação contempla o campo de invenção da Agricultura, mais especificamente no desenvolvimento de novos compostos químicos, tais como herbicidas. O presente documento propõe o desenvolvimento de uma nova formulação de herbicida, pertencente preferencialmente a classe dos herbicidas triazínicos, a partir do uso de nanopartículas baseadas em proteínas vegetais. Elas são capazes de liberar gradualmente os compostos envolvidos e de promover um aumento de absorção do herbicida, permitindo uma melhoria na efetividade do herbicida, além de reduzir as dosagens aplicadas. A inovação proposta permitiu a redução da toxicidade e da degradação deste novo herbicida. O herbicida proposto pode ser usado tanto em pré quanto em pós-emergência e os ensaios de atividade herbicida foram realizados, nas duas condições (pré e pós) com a utilização de modelos biológicos de plantas alvo e não-alvo. Nos ensaios foram avaliados a mortalidade das plantas, as atividades máxima e efetiva do fotossistema II, e parâmetros fitométricos. Os resultados alcançados demonstraram que o sistema carreador, desenvolvido com nanopartículas de zeína, proporcionou maior efetividade herbicida, mesmo em dosagens reduzidas, sem aumentar a toxicidade para as plantas não-alvo avaliadas. O desenvolvimento objetivou (...).



## **FORMULAÇÃO HERBICIDA, PROCESSO DE OBTENÇÃO DA FORMULAÇÃO HERBICIDA E USO DA FORMULAÇÃO HERBICIDA.**

### **Campo da invenção**

[001] A presente inovação pertence à área da Agricultura em sua vertente tecnológica de compostos químicos, mais especificamente a subárea dos herbicidas, tais como os herbicidas triazínicos incluindo o processo de obtenção das formulações deste composto químico, mas não limitando a invenção a este único campo, uma vez que o produto final desenvolvido pode ser aplicado em distintas áreas tecnológicas.

### **Fundamentos da invenção**

[002] O uso de herbicidas tem uma participação importante na agricultura mundial, mantendo a viabilidade econômica e melhoria da produtividade agrícola. Sabe-se que mais de 90% da quantidade aplicada dos pesticidas não atingem o seu alvo devido a perdas que ocorrem por deriva, volatilização, lixiviação, escoamento ou degradação. Assim, em consequência das perdas esperadas, quantidades superiores à necessidade efetiva são empregadas para combater as pragas, incluindo as plantas daninhas.

[003] A classe dos herbicidas triazínicos é bastante utilizada na agricultura, e atua inibindo o processo fotossintético, ocasionando a morte da planta. Entre os herbicidas triazínicos, destacam-se a atrazina, ametrina, simazina e propazina. Além de possuírem um amplo espectro de ação, esses herbicidas podem ser utilizados em diferentes culturas para o controle pré e pós-emergente de plantas daninhas.

[004] A atrazina pertence ao grupo químico das triazinas, cujo mecanismo de ação se baseia na inibição do transporte de elétrons no

fotossistema II durante a fase fotoquímica da fotossíntese. Dessa forma, o bloqueio no transporte de elétrons leva à formação de espécies reativas de oxigênio na planta, causando inicialmente os sintomas de clorose e necrose e, por fim, levando à mortalidade das plantas.

[005] A atrazina é um herbicida seletivo utilizado no controle de plantas daninhas de folhas largas principalmente, mas também algumas poáceas, em uma variedade de culturas como o milho, cana-de-açúcar, sorgo, soja, trigo, abacaxi, seringueira e sisal, por exemplo. No Brasil, existem 40 diferentes produtos formulados com esse ingrediente ativo. Dentro da classe de herbicidas, a atrazina é um dos ingredientes ativos mais usados no Brasil. No ano de 2017, foram utilizadas aproximadamente 29 toneladas em todo o país.

[006] Em virtude do seu grande uso, há preocupações ambientais e sanitárias por causa do resíduo que pode ser deixado no solo e nas águas, podendo ser consumido pelos seres vivos e causar efeitos tóxicos. Estudos já mostraram que a atrazina tem baixo poder de sorção no solo, aumentando a chance de ser escoada e lixiviada, ou seja, ela pode ser facilmente carregada e contaminar os solos e as águas. Além de eventuais danos ambientais, à microbiota do solo e à fauna, o consumo frequente de água contaminada com esse herbicida pode ocasionar danos no sistema reprodutor, cardiovascular e disfunções endócrinas.

[007] Dessa forma, novas tecnologias buscam diminuir a quantidade de atrazina aplicada, sem reduzir o efeito herbicida contra as plantas invasoras, e uma opção é a utilização de nanopartículas como sistemas carreadores para herbicidas. As nanopartículas podem ser produzidas com vários materiais e são capazes de liberar gradualmente os compostos envolvidos por elas e/ou proporcionar modificações no modo de ação do

herbicida (absorção, translocação e estabilidade metabólica), além de reduzirem a toxicidade e a degradação dessas moléculas.

[008] A atrazina possui caráter básico devido seus grupos amino e baixa solubilidade em água (33 mg/l). Apresenta moderado *log kow* 2,7, o que indica caráter lipofílico do ingrediente ativo, boa interação com a cutícula foliar e translocação preferencial pelo xilema. Os carreadores nanométricos são capazes de melhorar propriedades físico-químicas dos compostos herbicidas, o que melhora sua efetividade e, assim, reduzir as doses aplicadas, minimizando os impactos ambientais e custos com processos de remediação de áreas contaminadas.

[009] A nanotecnologia aplicada à agricultura na formulação de pesticidas é uma tecnologia emergente, bastante estudada devido aos seus potenciais benefícios. Majoritariamente, é voltada ao desenvolvimento de produtos e processos que ofereçam vantagens em relação aos sistemas convencionais. Além das vantagens elencadas anteriormente, a utilização de formulações produzidas em escala nano pode impactar na redução do número de intervenções a serem feitas na cultura e, consequentemente, impactar na redução nos custos com o manejo. Comumente, são necessárias quantidades maiores de ativo para que ele alcance os organismos-alvo, em quantidade mínima efetiva. Além disso, muitos compostos apresentam um período de eficácia limitado, durante o cultivo a cultura, e são necessárias inúmeras aplicações desses defensivos agrícolas. Caso contrário, as culturas terão o rendimento afetado devido à competição por água, luz, nutrientes, CO<sub>2</sub> e espaço físico.

[0010] Os nanopesticidas, em sua maioria, apresentam maior eficácia, além de se degradarem mais lentamente quando aplicados no ambiente, permitindo que menores doses sejam utilizadas, mantendo-se a efetividade.

Desta forma, há uma diminuição no uso geral destes compostos, garantindo a produtividade das culturas e a segurança alimentar. Além disso, vale ressaltar que o uso de nanopesticidas pode gerar benefícios secundários, como por exemplo, diminuir os investimentos na produção de pesticidas, bem como diminuir a poluição ambiental. As características resultantes dessas formulações podem proporcionar maior distribuição dos ativos na área foliar, por exemplo, aumentando sua eficácia. Além disso, muitos estudos vêm demonstrando que, além de promover maior controle de pragas, as nanoformulações possibilitam a redução de intoxicação de organismos não-alvo pelos pesticidas.

[0011] O desenvolvimento de nanopartículas tem aplicação nas mais distintas áreas. O processo proposto na presente invenção contempla o desenvolvimento de nanopartículas, através do uso de proteína vegetal, para a utilização em um sistema de liberação sustentada de herbicidas. A inovação tem como escopo os herbicidas, preferencialmente os herbicidas triazínicos, que atuam de modo a inibir o processo fotossintético e então ocasionar a morte da planta daninha. Estes herbicidas são utilizados no controle pré e pós emergente de plantas daninhas, principalmente nas culturas de gramíneas, como o milho, o sorgo e a cana-de açúcar. O uso da atrazina, componente mais comum nos herbicidas triazínicos, causa diversos danos quando usado em excesso, como contaminação dos solos e águas, além de eventuais danos ambientais, à microbiota do solo e à fauna. A tecnologia desenvolvida visa diminuir a dose de atrazina aplicada, sem reduzir o efeito herbicida, através do uso de nanopartículas, sendo preferencialmente as nanopartículas de zeína (proteína vegetal) usadas como sistemas carreadores que liberam gradualmente o composto envolvido por elas.

[0012] Em 2007, o pedido de patente PI 0714177-7 – “ PROCESSO DE PREPARO DE COMPOSIÇÃO BIOCIDA, COMPOSIÇÃO BIOCIDA LIVRE DE SOLVENTES, DISPERSÃO AQUOSA, PROCESSO PARA O TRATAMENTO DE UM SUBSTRATO, PROCESSO PARA A DISTRIBUIÇÃO DE UM BIOCIDA E USO DA COMPOSIÇÃO” detalhou um sistema carreador para biocidas em geral e também reivindicou um processo de tratamento de um substrato com sistema carreador nanoestruturado. Porém, este documento não fez referência sobre a nanoencapsulação de herbicidas da família das triazinas e nem o uso de proteínas, como por exemplo a zeína.

[0013] Em 2013, o pedido de patente WO2013120856 – “NANOPARTICLES COMPRISING A VEGETABLE HYDROPHOBIC PROTEIN AND A WATER MISCIBLE NON-VOLATILE ORGANIC SOLVENT AND USES THEREOF” descreveu o uso de proteínas hidrofóbicas vegetais, incluindo a zeína, para produção de formulações de nanopartículas para o carregamento de produtos variados, incluindo produtos de interesse agrícola (como herbicidas), mas o pedido WO2013120856 não fez nenhuma menção a herbicidas específicos. Os ensaios que foram descritos são de testes de encapsulação de uma molécula lipofílica pequena como modelo. Os métodos de preparo de formulações fizeram uso de solventes não-voláteis e miscíveis em água. O presente pedido apresenta uma tecnologia diferente, na qual os resultados dos ensaios apresentados são com uma molécula herbicida. Em relação ao solvente, foi utilizado um solvente volátil. Além disso, a presente tecnologia é voltada para a melhora de eficácia herbicida associada à redução de dose.

[0014] Também em 2013, a patente US 2015 0141249 - “HERBICIDE FORMULATIONS” propôs o preparo de nanopartículas de polímeros com

herbicidas. No relatório descritivo são citados os seguintes grupos de herbicidas: aryloxyphenoxypropioates, cyclohexanedione, triazolinone, sulfonamides e sulfonylureas. O método de preparo visou à associação e dissolução do ativo juntamente com o polímero em um solvente e combinou com outro solvente e depois no final removeu um ou parcialmente o outro ou totalmente os dois solventes. Juntamente com o herbicida, foram usados também safeners, solução esta que impacta no aumento de custo do produto final e do processo produtivo.

[0015] Na tecnologia desenvolvida na presente inovação, foram desenvolvidas nanopartículas a base de proteína vegetal (zeína) contendo o herbicida triazínico atrazina, que não foi contemplado na patente US 2015 0141249.

[0016] Uma proteína pode ser entendida como um polímero de aminoácidos, mas pode também ser tratada por proteína vegetal. Na tecnologia desenvolvida, temos o uso de proteínas vegetais, como a zeína. A zeína é uma proteína obtida do milho, portanto, ambientalmente mais segura por ser mais facilmente biodegradável. Além disso, faz parte da alimentação humana e animal, o que torna mais segura sua aplicação. Na patente US 2015 0141249, a zeína não foi considerada como um potencial polímero para a solução.

[0017] Ainda em 2013, o pedido de patente BR 10 2013 022912-1 - “PROCESSO DE PRODUÇÃO DE SISTEMA DE LIBERAÇÃO SUSTENTADA DE HERBICIDAS BIOATIVOS; NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS E USO DO SISTEMA DE LIBERAÇÃO SUSTENTADA DE HERBICIDAS BIOATIVOS” propôs 1) desenvolvimento de um processo de liberação sustentada de herbicidas, 2) produção de um sistema para liberação sustentada de herbicidas e 3) desenvolvimento de método de

combate a pragas agrícolas. De maneira mais detalhada, a invenção tratou do desenvolvimento de processo de produção do sistema de liberação sustentada de herbicidas bioativos compreendido das etapas de a) formação de uma fase orgânica, b) formação de uma fase aquosa, c) emulsificação e d) remoção de solventes. Preferencialmente, a invenção consistiu em um sistema de liberação sustentada de herbicidas triazínicos, que consiste de um polímero de caprolactona dissolvida em um solvente polar aprótico (como acetona e diclorometano) e, mais preferencialmente ainda, de uma solução polimérica em diclorometano e solução herbicida de atrazina em acetona. No processo descrito, a solução polimérica orgânica e a solução herbicida foram sonicadas em potência elevada, entre 30 a 90 segundos, seguida da adição de solução aquosa de álcool polivinílico sob sonicação por mais 5 a 10 minutos para obtenção de uma emulsão água/óleo contendo nanopartículas poliméricas do herbicida encapsulado. A etapa final de obtenção consistiu na remoção dos solventes orgânicos, preferencialmente com o uso de evaporador rotativo. O sistema possuía nanopartículas com diâmetro entre 400 a 520 nm e pH entre 6,3 e 6,6. A tecnologia proposta neste documento também pertence ao campo das composições agrícolas, e prevê a produção de um sistema de liberação sustentada de herbicidas baseado em soluções poliméricas oriundas de proteína vegetal. De maneira mais detalhada, é compreendido pelas etapas de a) formação de uma fase orgânica, b) formação de uma fase aquosa, c) precipitação antissolvente e d) remoção dos solventes. O sistema de liberação sustentada de herbicida, aqui relatado, possui nanopartículas com dimensões inferiores à invenção BR 10 2013 022912-1. O diâmetro médio das nanopartículas é, majoritariamente, entre 50 a 380 nm; mais especificamente, no caso das nanopartículas de zeína é de  $138 \pm 32$  nm.



Vale destacar também que, em comparação ao sistema anterior, a tecnologia da presente invenção apresenta menor custo de produção, maior facilidade no processo de síntese (menos etapas, não demanda sonicação) e uso de solventes mais seguros, etanol ao invés de acetona e diclorometano.

[0018] Em 2014, o pedido de patente WO2014164418 – “FUNCTIONALIZED ENVIRONMENTALLY BENIGN NANOPARTICLES” alvitrou a preparação de nanopartículas através de três estágios: 1) preparo da nanopartícula nativa; 2) funcionalização com agente ativo e 3) customização adicional da superfície com o uso de um ou mais modificadores. Para a parte nativa, é citada uma enorme gama de partículas, dentre elas a zeína. Na tecnologia proposta, foi previsto o preparo das nanopartículas em uma única etapa, na qual a organização da partícula já contempla: 1) a presença do material para formação da estrutura da partícula; 2) a presença do ativo e 3) a presença de surfactantes para estabilização superficial. Dessa forma, comprovamos que, mesmo que alternativamente o sistema da patente WO2014164418 contemple a zeína, a forma de construção da arquitetura da tecnologia é totalmente diferente da invenção proposta.

[0019] Em 2020, o pedido de patente WO2020049433 – “CRYSTALLIZATION INHIBITORS IN AGRICULTURAL FORMULATIONS” abordou a produção de formulações e métodos para inibição da cristalização de ingredientes ativos de interesse agrícola, incluindo herbicidas. Polímeros polieletrólitos foram utilizados na composição das formulações, sem menção as proteínas, como a zeína. Mesmo que, seja indicado que os polímeros podem estar na forma nanoparticulada, o foco do pedido foi a inibição de cristalização e não o carregamento. A tecnologia no

presente pedido visa resolver outro problema técnico que tem por solução o aumento da eficácia do herbicida associada à redução de dose, solução que não foi proposta na patente WO2020049433.

[0020] Em suma, nenhum dos documentos disponíveis no estado da técnica propôs o desenvolvimento de um herbicida com nanopartículas de zeína de modo a potencializar o uso dos herbicidas triazínicos e então permitir a redução do seu consumo nas aplicações em campo.

### **Objetivos da Invenção**

[0021] A presente inovação tem por objetivo a síntese e o desenvolvimento de um novo herbicida com uso de nanopartículas baseadas em proteínas vegetais, tais como a zeína.

[0022] A utilização de proteínas vegetais tem como objetivo reduzir os custos do produto final, além de também reduzir o impacto ambiental no desenvolvimento das nanopartículas (que no caso específico da zeína, pode ser obtida do milho), deste modo, garantindo uma solução mais ambientalmente segura.

[0023] É ainda objetivo da solução proposta obter um produto final que seja mais facilmente biodegradável devido ao uso de uma proteína vegetal, ou mais especificamente da proteína zeína, no novo composto químico desenvolvido.

### **Breve descrição dos desenhos**

[0024] De modo a facilitar o entendimento da presente invenção, esta patente traz as figuras, algumas em forma de gráficos, descritas na sequência:

[0025] A figura 1 apresenta os gráficos da distribuição de tamanho das nanopartículas em relação ao tempo (a, b), tamanho médio e índice de polidispersão das nanopartículas em relação ao tempo (c), potencial zeta

das nanopartículas em relação ao tempo (d), estabilidade em relação às variações de pH (e) e eficiência de encapsulação da atrazina em função do tempo (f).

[0026] A figura 2 apresenta a micrografia e distribuição de tamanho das nanopartículas de zeína contendo atrazina.

[0027] A figura 3 apresenta as curvas de liberação da atrazina em função do tempo.

[0028] A figura 4 ilustra a mortalidade de *Brassica juncea* em ensaio de pré-emergência.

[0029] A figura 5 traz os sintomas visuais de *Brassica juncea* em tratamento pré-emergência.

[0030] A figura 6 contém a atividade máxima do fotossistema II de *Brassica juncea* em ensaio de pós-emergência.

[0031] A figura 7 contém a atividade efetiva do fotossistema II de *Brassica juncea* em ensaio de pós-emergência.

[0032] A figura 8 ilustra os sintomas visuais de *Brassica juncea* em tratamento pós-emergência.

[0033] Na figura 9 são ilustradas as atividades máxima e efetiva do fotossistema II de *Zea mays* em ensaio de pré-emergência.

[0034] A figura 10 apresenta os sintomas visuais de *Zea mays* em tratamento pré-emergência.

[0035] A figura 11 contém a atividade máxima do fotossistema II de *Zea mays* em ensaio de pós-emergência.

[0036] A figura 12 contém a atividade efetiva do fotossistema II de *Zea mays* em ensaio de pós-emergência.

[0037] A figura 13 ilustra os sintomas visuais de *Zea mays* em tratamento pós-emergência.

**Descrição da invenção**

[0038] A presente invenção trata do processo de produção do sistema de liberação sustentada de herbicidas baseados em proteína vegetal compreendido das etapas de:

- (a) formação de uma fase orgânica;
- (b) formação de uma fase aquosa;
- (c) precipitação antissolvente; e,
- (d) remoção dos solventes.

[0039] A fase orgânica da etapa (a) é formada pela mistura de uma solução contendo uma proteína vegetal, com a solução herbicida. A solução proteica é constituída 1:1 a 60:1 mg/ml de uma proteína dissolvida em uma primeira solução aquosa contendo solvente polar da classe dos álcoois (1:3 a 1:9,5, v/v); e a solução herbicida é constituída de entre 0,1:1 a 1200:1 mg/ml de uma triazina dispersa em um tensoativo.

[0040] Preferencialmente, a solução proteica é constituída de entre 1:1 a 60:1 mg/ml de zeína dissolvida em solução aquosa contendo um primeiro solvente polar do tipo álcool, como etanol, metanol; propanol e metilpropanol; a solução herbicida é constituída de entre 0,1:1 a 1200:1 mg/ml de um herbicida pertencente ao grupo consistido de atrazina, ametrina, simazina ou uma mistura destes dispersas em um tensoativo.

[0041] Preferencialmente, é utilizado Polisorbato 80 como tensoativo para o herbicida atrazina.

[0042] Preferencialmente, é realizado um tratamento de centrifugação e filtragem da solução de zeína para sua utilização. A solução de zeína é centrifugada e realizado um tratamento térmico durante 3 a 60 min e temperatura de 40 a 90°C. A solução de zeína é filtrada em filtros de membrana com poros de 0,150 a 0,800 µm

[0043] A fase aquosa da etapa (b) é formada pela diluição em água de um surfactante ou polímero, preferencialmente sintético, hidrossolúvel em proporções de 1:1 a 60:1 mg/ml.

[0044] Preferencialmente, a fase aquosa é constituída de entre 1:10 a 40:1 mg/ml de um surfactante não-iônico, tal como o Poloxamer 188.

[0045] A precipitação com antissolvente da etapa (c) ocorre pela adição da fase orgânica na fase aquosa em proporções de 1:0,5 a 1:20, v/v.

[0046] Preferencialmente, a fase orgânica é adicionada rapidamente na fase aquosa sob agitação, que é mantida por 5 a 30 minutos.

[0047] A etapa (d) é a etapa final para a obtenção do sistema de liberação e corresponde à remoção de solvente da mistura da fase orgânica com a aquosa.

[0048] Preferencialmente, a remoção de solvente é feita em condições de vácuo por um período de 5 a 60 min. Preferencialmente é utilizado um evaporador rotativo para eliminar o solvente orgânico.

[0049] O sistema de liberação sustentada de herbicidas possui nanopartículas com diâmetro entre 50 e 380 nm e contém uma quantidade de nanopartículas contendo herbicida (0,1 a 500 mg de ingrediente ativo/ml) suficientes para efetuar o controle de plantas daninhas, e preferencialmente, a quantidade agronomicamente ativa para aplicação do herbicida em culturas é compreendida entre 0,01 a 4 kg/ha, em relação à quantidade de ingrediente ativo.

[0050] As vantagens desse sistema de liberação sustentada de herbicidas em relação ao estado da arte, tal como descrito no pedido BR 10 2013 022912-1, estão na utilização de matéria prima mais biocompatível, biodegradável e a utilização de álcool como solvente. Preferencialmente é utilizada a zeína, uma proteína obtida do milho, e utilizado etanol como

solvente, que possui baixo custo e é menos nocivo ao meio ambiente. As partículas também são de dimensões menores que as partículas apresentadas no estado da técnica, o que resulta em uma forma diferenciada na captação pelas plantas.

[0051] Ainda como característica positiva para essa formulação, é que na dissolução do herbicida na fase orgânica não é utilizado nenhum triglicerídeo. A utilização de um tensoativo comumente oferecerá menos riscos de fitotoxicidade para os organismos não alvo.

[0052] No Brasil, a atrazina é um herbicida bastante conhecido e é indicada para o controle de ervas daninhas em uma série de culturas,

[0053] Dessa forma, constitui ainda objeto da presente invenção o uso do sistema de liberação sustentada de herbicidas bioativos baseados em nanopartículas proteicas no controle de plantas daninhas na agricultura.

[0054] Esse sistema é para o tratamento de áreas agrícolas contendo por exemplo: culturas de milho, cana-de-açúcar, sorgo, soja, trigo, abacaxi, seringueira e sisal. O sistema objeto dessa invenção é usado para controlar o crescimento de plantas daninhas de folhas largas e folhas estreitas, pertencentes aos gêneros Acanthospermum, Ageratum, Alternanthera, Amaranthus, Bidens, Brachiaria, Cenchrus, Conyza, Cyperus, Commelina, Digitaria, Desmodium, Eleusine, Emilia, Euphorbia, Galinsoga, Hyptis, Indigofera, Ipomoea, Lepidium, Melampodium, Nicandra, Portulaca, Raphanus, Richardia, Sida, Spermacoce e Urochloa, mas não limitando a solução a estas espécies.

### **Exemplos de concretizações da invenção**

[0055] Os objetos desta invenção, acima descritos, têm suas concretizações ilustradas pelos exemplos abaixo. São exemplos ilustrativos que possibilitam a compreensão desses objetos.

[0056] Exemplo 1 – Preparo das nanopartículas proteicas. As nanopartículas foram preparadas, inicialmente, pela solubilização de 200 mg de zeína em 10 ml de solução hidroetanólica 85% (v/v). A solução foi submetida à centrifugação a 2500 x g durante 30 min para separação de eventuais impurezas ou proteína não solúvel. A solução de zeína foi submetida a um tratamento térmico a 75 °C por 15 min e filtrada em filtros de membrana com porosidade de 0,45 µm. 30 mg do herbicida atrazina foram dispersos em 300 mg do tensoativo Polisorbato 80 e a essa dispersão foram adicionados os 10 ml de zeína e então mantida sob agitação para garantir a completa dissolução. Separadamente, foi preparada a fase aquosa que consistiu de uma solução aquosa de Poloxamer 188 (2% m/v) com pH ajustado para 4. Posteriormente, a atrazina dissolvida no tensoativo e zeína foi injetada em 30 ml de solução do surfactante Poloxamer 188 sob constante agitação. A dispersão coloidal resultante foi mantida em agitação durante 20 minutos e o etanol foi evaporado em um evaporador rotativo obtendo um volume final de 30 ml da formulação.

[0057] Exemplo 2 – Avaliação das nanopartículas. Exemplo 2.1 – Medidas de polidispersão e raio hidrodinâmico. Na determinação do raio hidrodinâmico e índice de polidispersão (PDI) das nanopartículas, foi empregada a espectroscopia de correlação de fótons. Essa técnica permite avaliar a estabilidade de suspensões coloidais em função do tempo a partir das medidas de tamanho e homogeneidade das nanopartículas em suspensão.

[0058] As determinações foram feitas a partir de suspensões coloidais das nanopartículas de zeína contendo ou não atrazina. Para as medidas, as suspensões foram diluídas em água deionizada (5:1000, v/v), seguida de análise em equipamento *Zetasizer Nano ZS 90* (Malvern) operando em um

ângulo de detecção de 90°. As medidas foram realizadas em triplicata em função do tempo (0, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 dias) e temperatura de 25°C.

[0059] Exemplo 2.2 – Determinação do potencial zeta das nanopartículas. O potencial zeta é comumente utilizado como um indicador de estabilidade de uma dispersão, em que valores distantes de 0 preveem uma dispersão mais estável. O que se mede é a carga superficial de uma partícula, que pode ser influenciada por mudanças na interface com o meio dispersante. A técnica de microeletroforese foi utilizada para as medidas de potencial zeta das nanopartículas diluídas com água deionizada (5:1000, v/v). Os resultados foram expressos como médias de três determinações, realizadas utilizando um equipamento *Zetasizer Nano ZS 90* (Malvern). Todas as medidas foram realizadas em função do tempo (0, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 dias).

[0060] Exemplo 2.3 – Morfologia das nanopartículas. A análise morfológica das nanopartículas foi feita utilizando-se da microscopia de força atômica (AFM) (Nanosurf Easy Scan 2 Basic AFM – Pattern BT02217, Suíça). A técnica possibilitou a identificação da forma e tamanho das nanopartículas. A preparação da amostra para obtenção das micrografias deu-se pelo gotejamento da suspensão de nanopartículas diluídas em placa de silício e sua secagem em um dessecador. As micrografias foram obtidas operando-se em modo não-contato, com cantiléver TapAl-G (BudgetSensor, Bulgária) com uma taxa de varredura de 90 Hz. As imagens foram tratadas pelo software Gwyddion.

[0061] Exemplo 2.4 – Medida de eficiência de encapsulação. A eficiência de encapsulação da atrazina nas nanopartículas de zeína foi determinada de forma indireta pelo método de ultrafiltração/centrifugação. Para as medidas, 400 µl de suspensão de nanopartículas, a qual é



conhecida a concentração de atrazina, foram pipetados em dispositivo de ultrafiltração de celulose regenerada com poro de exclusão de 10 kDa (Microcon-Millipore®) e submetido à centrifugação a 10000 x g por 10 min. Esse dispositivo permite a passagem da atrazina livre através da membrana. A atrazina foi quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

[0062] Assim, a partir do valor da quantidade de atrazina total e não encapsulada, determinou-se a eficiência de encapsulação nas nanopartículas. A eficiência de encapsulação foi medida em triplicata em função do tempo (0, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 dias).

[0063] Exemplo 2.5 – Quantificação de atrazina por cromatografia líquida de alta eficiência. Para a quantificação da atrazina, foi adotada a metodologia analítica como descrita na tabela 1, em que são apresentadas as condições cromatográficas utilizadas nesse estudo.

Tabela 1: Condições cromatográficas para análise da atrazina por CLAE.

| Amostra                      | Atrazina                                           |
|------------------------------|----------------------------------------------------|
| Fase móvel                   | Acetonitrila:água (50:50, v:v)                     |
| Coluna                       | Phenomenex, Germini 5 µm C18, 110 Å, 250 x 4,60 mm |
| Temperatura da coluna (°C)   | 30                                                 |
| Volume de injeção (µl)       | 100                                                |
| Fluxo (ml/min)               | 1,5                                                |
| Detector                     | Ultravioleta, λ=223 nm                             |
| Curva analítica              | $Y = 12,0268X + 0,00312$                           |
| Limite de detecção (LD)      | 1,187 µg/ml                                        |
| Limite de quantificação (LQ) | 3,958 µg/ml                                        |

[0064] Exemplo 2.6 – Estabilidade físico-química das nanopartículas. A estabilidade físico-química da formulação foi realizada aferindo-se o pH das formulações em função do tempo de armazenamento (0, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 dias). Também foram feitas medidas de tamanho e potencial zeta para a formulação de nanopartículas de zeína diluídas em diferentes pH (2 a 11). As medidas foram feitas em um potenciômetro acoplado a um eletrodo de pH previamente calibrado. As alterações nos valores de pH das suspensões coloidais é um indicativo de mudanças na estabilidade das formulações, seja pela degradação da proteína e/ou alterações no balanço de carga na interface das nanopartículas com o meio em que se encontra.

[0065] Exemplo 2.7 – Ensaio de cinética de liberação. O perfil de liberação da atrazina das nanopartículas de zeína foi traçado a partir dos ensaios de cinética de liberação. Esse ensaio se baseia em um sistema com dois compartimentos, doador e acceptor, separados por uma membrana de celulose semipermeável com poro de exclusão molecular de 12 kDa.

[0066] O compartimento acceptor foi preparado respeitando a condição *sink*, para diluição do ativo em até 10% do volume total deste meio. O meio acceptor consistiu de uma solução aquosa de Poloxamer 188 0,5% e o meio doador da formulação de nanopartículas e também de uma suspensão de atrazina em água deionizada. O ensaio consistiu em adicionar 495 µl de suspensão ou formulação (1 mg/ml) em bags de diálise e colocá-los em béqueres contendo 150 ml de meio acceptor sob agitação moderada. Em intervalos de tempo pré-determinados, foram coletadas alíquotas de 1 ml para quantificação por CLAE da atrazina liberada. O volume subtraído dos béqueres era sempre completado com solução de Poloxamer 188 0,5% após cada coleta. Os ensaios de liberação foram realizados em triplicata e

os dados de concentração convertidos em porcentagem em função do tempo.

[0067] Exemplo 2.8 – Medidas de ângulo de contato. As medidas de ângulo de contato de formulações em superfícies foliares é uma forma de inferir a respeito da molhabilidade e adesão dos componentes da formulação a essas superfícies. O método mais comum é o da gota sésil, em que a medição é realizada por um goniômetro de ângulo de contato usando um subsistema óptico para capturar o perfil de um líquido sobre uma superfície sólida.

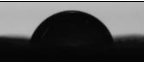
[0068] As medidas de ângulo de contato foram realizadas em um modelo de planta alvo do herbicida atrazina, *Brassica juncea* (mostarda), utilizando um goniômetro *Ramé-Hart* 100-00 (Succasunna, NJ, USA), equipado com uma microponteira para produzir gotas de 0,2 µl. As medidas foram realizadas para a suspensão de nanopartículas contendo atrazina e a formulação comercial (Gesaprim) em concentrações de 1 e 0,1 mg/ml, e água deionizada como tratamento controle. As imagens das gotas foram obtidas através de uma câmera CCD conectada a um microcomputador. A imagem digitalizada foi analisada por um programa de processamento de imagens RHI 2001, que traça o perfil da gota e determina o ângulo de contato.

[0069] Os resultados dos testes realizados nos exemplos são listados a seguir. As figuras 1 e 2 apresentam os resultados da caracterização físico-química das nanopartículas de zeína contendo atrazina e de nanopartículas de zeína não carregadas com o ativo. As nanopartículas de zeína foram caracterizadas pelas medidas de polidispersão, diâmetro médio de tamanho (DLS, AFM), potencial zeta, eficiência de encapsulação, estabilidade química frente a variações de pH e perfil de liberação. Os resultados

demonstraram que as nanopartículas de zeína apresentaram boa dispersão e permaneceram estáveis por 120 dias com alta eficiência de encapsulação para o herbicida atrazina (> 90%). As nanopartículas apresentaram forma esférica e tamanho médio na faixa de 130-170 nm. Embora o potencial zeta das nanoformulações tenha apresentado valores de aproximadamente 12 mV (figura 1d), a estabilidade não foi comprometida durante o período analisado, neste caso o tensoativo atuou como um estabilizante para a formulação. As formulações a uma concentração de ativos de 1 mg/ml possuem pH em torno de 4 e mantiveram-se estáveis durante os 120 dias em que foram monitoradas. Frente a possíveis variações de pH da água de diluição, as nanopartículas mantiveram-se estáveis em pH neutro e ácido. Em pH alcalino, ocorre um aumento no tamanho médio das nanopartículas devido à formação de agregados. A formulação apresenta molhabilidade da superfície foliar compatível com um produto comercial. Em comparação com o produto comercial, as medidas de ângulo de contato em folhas de mostarda (tabela 2) indicaram uma molhabilidade em torno de 10% menor para formulação de nanopartículas de zeína contendo atrazina com concentração de 1 mg/ml de ativo, e 25% maior quando diluídas em 10 vezes (0,1 mg/ml). Os ensaios de liberação, realizados *in vitro*, demonstraram perfil de liberação semelhante ao produto técnico, embora as nanopartículas de zeína tenham promovido uma redução na velocidade de liberação, alcançando em 45 h um valor total 13% menor quando comparado à atrazina técnica.

Tabela 2. Medidas de ângulo de contato em folhas de mostarda.

| <b>Material</b> | <b>Ângulo de contato (°)</b> | <b>Gotícula na folha de mostarda</b> |
|-----------------|------------------------------|--------------------------------------|
|-----------------|------------------------------|--------------------------------------|

|                     |              |                                                                                     |
|---------------------|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Água                | 95,29 ± 4,89 |  |
| ATZ* (1 mg/ml)      | 56,66 ± 0,07 |  |
| ATZ (0,1 mg/ml)     | 93,42 ± 0,05 |  |
| NPZ ATZ# (1 mg/ml)  | 62,88 ± 0,93 |  |
| NPZ ATZ (0,1 mg/ml) | 70,53 ± 0,07 |  |

\* refere-se à formulação comercial

# refere-se à formulação de nanopartículas de zeína com atrazina.

[0070] As figuras 1a e 1b apresentam os gráficos da distribuição do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de zeína com e sem atrazina em função do tempo (0, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 dias). Os valores representam a média de três análises (n=3) realizadas a 25 °C.

[0071] A figura 1c apresenta o tamanho hidrodinâmico médio e o índice de polidispersão das nanopartículas de zeína com e sem atrazina em função do tempo (0, 15, 30 45, 60, 90 e 120 dias). Os valores representam a média de três análises (n=3) realizadas a 25 °C.

[0072] A figura 1d apresenta o potencial zeta das nanopartículas de zeína com e sem atrazina em função do tempo (0, 15, 30 45, 60, 90 e 120 dias). Os valores representam a média de três análises (n=3) realizadas a 25 °C.

[0073] A figura 1e apresenta as medidas de tamanho hidrodinâmico médio e potencial zeta das nanopartículas de zeína com e sem atrazina em função da variação de pH do meio (pH 2 – 11). Os valores representam a média de três análises (n=3) realizadas a 25 °C.

[0074] A figura 1f apresenta a eficiência de encapsulação das nanopartículas de zeína contendo atrazina em função do tempo (0, 15, 30

45, 60, 90 e 120 dias). Os valores representam a média de três análises (n=3) realizadas a 25 °C.

[0075] A figura 2 apresenta a micrografia obtida por microscopia de força atômica (AFM) das nanopartículas de zeína contendo atrazina e sua distribuição de tamanho (n = 52).

[0076] A figura 3 apresenta as curvas de liberação da atrazina a partir da suspensão de nanopartículas e do produto técnico. As curvas apresentam as quantidades de atrazina liberada em função do tempo, acompanhada durante 4080 min (68 h). As medidas foram obtidas dos ensaios de liberação realizados em triplicata (n = 3) a uma temperatura de 25 °C.

[0077] Exemplo 3 – Avaliação da atividade herbicida em um bioindicador vegetal alvo. Para o ensaio de atividade herbicida, foi selecionado um bioindicador vegetal alvo do herbicida atrazina, sendo este a mostarda lisa (*Brassica juncea*) da marca ISLA. As plantas foram cultivadas em vasos de 1 dm<sup>3</sup> contendo solo argiloso. A aplicação dos tratamentos foi feita utilizando borrifadores completando o volume com água destilada até 5 ml.

[0078] Exemplo 3.1 Ensaio de atividade herbicida em tratamento pré-emergente. Nos ensaios de pré-emergência, foram semeadas trinta sementes de mostarda lisa por vaso e não foi utilizada solução nutritiva. A rega de água foi feita conforme a demanda das plantas. Durante todo o estudo, os vasos foram mantidos em casa de vegetação. As aplicações foram realizadas diretamente sobre o solo logo após a semeadura.

[0079] Para o estudo da atividade herbicida em pré-emergência foram avaliados sete tratamentos com cinco repetições cada (n=5). Foi adotada a dose recomendada comercialmente, que é de 2000 g/ha (equivalente a 3,08

ml de formulação contendo atrazina 1 mg/ml em cada vaso) e também doses menores obtidas pela diluição em água destilada. Os tratamentos foram:

Controle - Água;

NC - Nanopartículas de zeína sem atrazina;

NC 1/80 - Nanopartículas de zeína sem atrazina a uma diluição de 80 vezes;

NA - Nanopartículas de zeína com atrazina;

NA 1/80 - Nanopartículas de zeína com atrazina a uma diluição de 80 vezes;

ATZ - Formulação comercial de atrazina;

ATZ 1/80 - Formulação comercial de atrazina a uma diluição de 80 vezes.

[0080] Nos tratamentos de pré-emergência, foi feito um levantamento diário de quantas plantas de mostarda lisa emergiam e quantas morriam, para calcular a porcentagem de emergência e de mortalidade das plantas de cada vaso. Os dados evidenciam que a formulação de nanopartículas de zeína contendo atrazina promoveu 100% de mortalidade mesmo a uma dose 80 vezes menor que a recomendada comercialmente (25 g/ha). Na dose recomendada pelo fabricante, a formulação comercial mantém sua atividade herbicida em 100%, mas quando diluída em 80 vezes, já não é significativamente diferente ao tratamento controle (água) e às nanopartículas sem o herbicida.

[0081] A figura 4 apresenta as médias  $\pm$  EP (n=5) das porcentagens de mortalidade no experimento de pré-emergência testando a formulação com nanopartículas de zeína em mostarda submetida aos seguintes tratamentos: controle, nanopartículas sem atrazina (NC), atrazina comercial (ATZ) e nanopartículas com atrazina (NA) nas doses de 2000 g/ha e 25 g/ha (indicação de 1/80). Letras diferentes sobre as barras indicam que os

valores foram significativamente diferentes de acordo com a ANOVA de um fator, seguida do *Teste de Tukey* ( $p < 0,05$ ).

[0082] A figura 5 apresenta os sintomas visuais nas plantas de mostarda do experimento de pré-emergência, as quais foram submetidas aos seguintes tratamentos: controle, nanocápsula sem atrazina diluída em 80x (NC 1/80), nanocápsula sem atrazina concentrada (NC), atrazina comercial diluída em 80x (ATZ 1/80), atrazina comercial (ATZ), nanocápsula com atrazina diluída em 80x (NA 1/80) e nanocápsula com atrazina (NA). A formulação concentrada é referente a 2000 g/ha.

[0083] Exemplo 3.2 Ensaio de atividade herbicida em tratamento pós-emergente. Em pós-emergência, foram semeadas quinze sementes de mostarda lisa por vaso, os quais eram regados com 50 ml de solução nutritiva (tabela 3) uma vez por semana após as plantas apresentarem as primeiras folhas. Conforme as plantas foram crescendo, foi realizado o desbaste, deixando então quatro plantas em cada vaso para fazer a aplicação. A rega de água foi feita conforme a demanda das plantas. As aplicações dos tratamentos foram foliares, quando as quatro plantas de mostarda de cada vaso desenvolveram quatro folhas.

Tabela 3. Concentração de cada sal presente na solução nutritiva utilizada nos tratamentos de pós-emergência.

| Sal                                                  | Concentração |
|------------------------------------------------------|--------------|
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                             | 1 mM         |
| $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 4 mM         |
| $\text{K}_2\text{SO}_4$                              | 2 mM         |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$                         | 4 mM         |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$            | 2 mM         |



|                                                     |                    |
|-----------------------------------------------------|--------------------|
| $\text{H}_3\text{BO}_3$                             | 92,5 $\mu\text{M}$ |
| $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$           | 18 $\mu\text{M}$   |
| $\text{ZnCl}_2$                                     | 1,5 $\mu\text{M}$  |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0,56 $\mu\text{M}$ |
| $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$           | 0,66 $\mu\text{M}$ |
| $\text{FeSO}_4$                                     | 100 $\mu\text{M}$  |

---

[0084] Para o estudo da atividade herbicida em pós-emergência foram realizados sete tratamentos com cinco repetições cada ( $n=5$ ). Foi adotada a dose recomendada comercialmente, que é de 2000 g/ha (equivalente a 3,08 ml de formulação contendo atrazina 1 mg/ml em cada vaso) e também doses menores obtidas pela diluição em água destilada. Os tratamentos foram:

Controle - Água;

NC - Nanopartículas de zeína sem atrazina;

NC 1/10 - Nanopartículas de zeína sem atrazina a uma diluição de 10 vezes;

NA - Nanopartículas de zeína com atrazina;

NA 1/10 - Nanopartículas de zeína com atrazina a uma diluição de 10 vezes;

ATZ - Formulação comercial de atrazina;

ATZ 1/10 - Formulação comercial de atrazina a uma diluição de 10 vezes.

[0085] Nestes ensaios, foram realizadas análises fisiológicas com ajuda de aparelho 24, 48 e 96 h após os tratamentos. O fluorômetro da OS1p (Opti Sciences) foi utilizado após as aplicações para avaliar a atividade máxima do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) em torno de sete horas da manhã, após submeter as plantas a quinze minutos de escuro. Também foi determinada a atividade

efetiva do fotossistema II (YII), avaliada entre dez horas da manhã e meio dia com a luminosidade natural.

[0086] Após desmontar os experimentos, foram feitas avaliações fitométricas como área foliar, a qual foi medida pelo integrador de área foliar LI-3000C (LI-COR). Depois, as plantas foram mantidas em estufa a 60°C por pelo menos três dias para a determinação da massa seca.

[0087] Os tratamentos NC 1/10 e NC não afetaram a atividade do fotossistema II (figura 6), indicando não haver problemas de fitotoxicidade por parte dos excipientes da formulação. Além disso, com as análises fisiológicas, pode-se observar que a atividade máxima do fotossistema II (Fv/Fm) foi mais inibida pelas soluções com nanoatrazina do que pelos tratamentos com atrazina comercial desde o primeiro dia. Além disso, diferente da nanoatrazina 1/10, a atrazina comercial na dose dez vezes menor não alterou o Fv/Fm, se igualando aos tratamentos Controle, NC 1/10 e NC.

[0088] Observando a atividade efetiva do fotossistema II (YII), o tratamento ATZ 1/10 se mostrou menos efetivo em relação a ATZ, NA 1/10 e NA. Dessa forma, a formulação com as nanopartículas de zeína com atrazina diluídas em dez vezes se destacam, pois, mesmo com menor quantidade de ingrediente ativo, ele se igualou ao comportamento das doses recomendadas da atrazina comercial (figura 7).

[0089] Outros resultados marcantes foram encontrados na avaliação fitométrica, já que somente o tratamento NA reduziu significativamente a área foliar das mostardas. Além disso, apenas os tratamentos NA 1/10 e NA provocaram uma redução da massa seca do caule e da raiz em relação ao tratamento controle (tabela 4).

Tabela 4. Médias  $\pm$  EP (n=9) da área foliar (cm<sup>2</sup>) e das massas secas da folha, caule e raiz das plantas de mostarda do experimento com aplicações da formulação de nanopartículas de zeína em pós-emergência, as quais foram submetidas aos seguintes tratamentos: controle, nanopartículas sem atrazina (NC), atrazina comercial (ATZ) e nanopartículas com atrazina (NA) nas doses de 2000 g/ha e 200 g/ha (indicação de 1/10). Letras diferentes na mesma coluna indicam que os valores foram significativamente diferentes de acordo com a ANOVA de um fator, seguida do *Teste de Tukey* (p<0,05).

| Tratamento      | Área foliar (cm <sup>2</sup> ) | Massa seca – folhas (g) | Massa seca – caule (g) | Massa seca – raiz (g) |
|-----------------|--------------------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------|
| <b>Controle</b> | 76,53 $\pm$ 12,94 a            | 0,297 $\pm$ 0,06 a      | 0,031 $\pm$ 0,004 a    | 0,081 $\pm$ 0,01 a    |
| <b>NC 1/10</b>  | 69,46 $\pm$ 10,33 a            | 0,24 $\pm$ 0,03 ab      | 0,03 $\pm$ 0,004 a     | 0,055 $\pm$ 0,007 ab  |
| <b>NC</b>       | 82,7 $\pm$ 10,42 a             | 0,279 $\pm$ 0,04 a      | 0,038 $\pm$ 0,006 a    | 0,062 $\pm$ 0,004 ab  |
| <b>ATZ 1/10</b> | 70,56 $\pm$ 15,71 a            | 0,19 $\pm$ 0,05 abc     | 0,019 $\pm$ 0,003 ab   | 0,059 $\pm$ 0,011 ab  |
| <b>ATZ</b>      | 56,33 $\pm$ 12,16 a            | 0,139 $\pm$ 0,03 bc     | 0,02 $\pm$ 0,004 ab    | 0,048 $\pm$ 0,008 ab  |
| <b>NA 1/10</b>  | 57,53 $\pm$ 7,28 a             | 0,181 $\pm$ 0,02 abc    | 0,015 $\pm$ 0,002 b    | 0,036 $\pm$ 0,005 b   |
| <b>NA</b>       | 23,35 $\pm$ 3,28 b             | 0,11 $\pm$ 0,02 c       | 0,012 $\pm$ 0,001 b    | 0,036 $\pm$ 0,008 b   |

[0090] Os resultados demonstraram que a nanoencapsulação de atrazina em nanopartículas de zeína aumenta a efetividade herbicida. Além disso, a nanoatrazina produzida a partir de uma matriz de zeína apresenta vantagens por tratar-se de um composto de origem natural e que é altamente biodegradável e biocompatível. Ainda não estão comprovados quais os mecanismos pelos quais as nanopartículas melhoram a eficácia da resposta do produto. Entendeu-se que a sua característica de liberar de forma gradual e controlada as moléculas carregadas reduz a degradação dessas e proporcione uma absorção mais efetiva pela planta. Também há o aumento da adesão de atrazina na folha ocasionado por um menor ângulo de contato da calda com a superfície foliar em baixas concentrações (tabela 1), reduzindo a perda do produto para o meio ambiente. Além disso, a absorção do ingrediente ativo pode ser favorecida pela nanoencapsulação,

pois as nanopartículas podem ser absorvidas por aberturas naturais da folha, como estômatos e hidatódios. É importante reforçar que o sistema produzido melhora consideravelmente a atividade herbicida em relação ao produto comercial.

[0091] A figura 6 apresenta as médias  $\pm$  EP ( $n=6$ ) da atividade máxima do fotossistema II (Fv/Fm) medida 24, 48 e 96 horas após as aplicações da formulação de nanopartículas de zeína em pós-emergência nas plantas de mostarda, as quais foram submetidas aos seguintes tratamentos: controle, nanopartículas sem atrazina (NC), atrazina comercial (ATZ) e nanopartículas com atrazina (NA) nas doses de 2000 g/ha e 200 g/ha (indicação de 1/10). Letras diferentes sobre as barras indicam que os valores foram significativamente diferentes de acordo com a ANOVA de um fator, seguida do *Teste de Tukey* ( $p<0,05$ ).

[0092] A figura 7 apresenta as médias  $\pm$  EP ( $n = 6$ ) da atividade efetiva do fotossistema II (YII) medida 24, 48 e 96 horas após as aplicações da formulação de nanopartículas de zeína em pós-emergência nas plantas de mostarda, as quais foram submetidas aos seguintes tratamentos: controle, nanopartículas sem atrazina (NC), atrazina comercial (ATZ) e nanopartículas com atrazina (NA) nas doses de 2000 g/ha e 200 g/ha (indicação de 1/10). Letras diferentes sobre as barras indicam que os valores foram significativamente diferentes de acordo com a ANOVA de um fator, seguida do *Teste de Tukey* ( $p<0,05$ ).

[0093] A figura 8 apresenta os sintomas visuais nas plantas de mostarda do experimento de pós-emergência, as quais foram submetidas aos seguintes tratamentos: controle, nanocápsula sem atrazina diluída em 10x (NC 1/10), nanocápsula sem atrazina concentrada (NC), atrazina comercial diluída em 10x (ATZ 1/10), atrazina comercial (ATZ), nanocápsula

com atrazina diluída em 10x (NA 1/10) e nanocápsula com atrazina (NA). A formulação concentrada é referente a 2000 g/ha.

[0094] Exemplo 4 – Avaliação da atividade herbicida em um bioindicador vegetal não-alvo. Para avaliar a seletividade das formulações, foi selecionado um bioindicador vegetal não-alvo do herbicida atrazina, sendo este o milho (*Zea mays*) híbrido Balu 761 da marca Sementes Balu. As plantas foram cultivadas em vasos de 1 dm<sup>3</sup> contendo solo argiloso. A aplicação das formulações foi feita utilizando borrifadores completando o volume com água destilada até 5 ml.

[0095] Exemplo 4.1 Ensaio de atividade herbicida em tratamento pré-emergente. Nos ensaios de pré-emergência, foram semeadas cinco sementes por vaso, os quais eram regados com 50 ml de solução nutritiva (tabela 3) uma vez por semana. A rega de água foi feita conforme a demanda das plantas. Durante todo o estudo, os vasos foram mantidos em casa de vegetação. As aplicações foram realizadas diretamente sobre o solo logo após a semeadura.

[0096] Para o estudo da atividade herbicida em pré-emergência, foram realizados sete tratamentos com cinco repetições cada. Foi adotada a dose recomendada comercialmente, que é de 2000 g/ha (equivalente a 3,08 ml de formulação contendo atrazina 1 mg/ml em cada vaso) e também doses menores obtidas pela diluição em água destilada. Os tratamentos foram:

Controle - Água;

NC - Nanopartículas de zeína sem atrazina;

NC 1/10 - Nanopartículas de zeína sem atrazina a uma diluição de 10 vezes;

NA - Nanopartículas de zeína com atrazina;

NA 1/10 - Nanopartículas de zeína com atrazina a uma diluição de 10 vezes;

ATZ - Formulação comercial de atrazina;

ATZ 1/10 - Formulação comercial de atrazina a uma diluição de 10 vezes.

[0097] Nestes ensaios, foram realizadas análises fisiológicas com ajuda de aparelhos 21 dias após a semeadura e tratamento em pré-emergência. O fluorômetro da OS1p (Opti Sciences) foi utilizado para avaliar a atividade máxima do fotossistema II (Fv/Fm) em torno de sete horas da manhã, após submeter as plantas a quinze minutos de escuro. Também foi determinada a atividade efetiva do fotossistema II (YII), avaliada entre dez horas da manhã e meio dia com a luminosidade natural.

[0098] Após desmontar os experimentos, foram feitas avaliações fitométricas, como a área foliar, a qual foi medida pelo integrador de área foliar LI-3000C (LI-COR). Depois, as plantas foram mantidas em estufa a 60°C por pelo menos três dias e determinada a massa seca.

[0099] De uma forma geral, as formulações não afetaram a atividade do fotossistema II de plantas de milho em pré-emergência (figura 9). O único efeito significativo em relação ao controle foi uma redução de 19% na atividade efetiva do fotossistema II (YII) pelo tratamento NC 1/10. As formulações não tiveram efeitos significativos sobre os parâmetros fitométricos de plantas de milho em relação ao controle (tabela 5). Nos tratamentos de pré-emergência, nenhuma das formulações levou à mortalidade de plantas de milho. Dessa forma, não foram observados efeitos fitotóxicos relevantes das formulações sobre as plantas de milho quando aplicadas em pré-emergência.

Tabela 5. Médias  $\pm$  EP (n=15) da área foliar (cm<sup>2</sup>) e das massas secas da folha, caule e raiz das plantas de milho do experimento com aplicações da formulação de nanopartículas de zeína em pré-emergência, as quais foram submetidas aos seguintes tratamentos: controle, nanopartículas sem

atrazina (NC), atrazina comercial (ATZ) e nanopartículas com atrazina (NA) nas doses de 2000 g/ha e 200 g/ha (indicação de 1/10). Letras diferentes na mesma coluna indicam que os valores foram significativamente diferentes de acordo com a ANOVA de um fator, seguida do *Teste de Tukey* ( $p < 0,05$ ).

|                 | Área foliar<br>(cm <sup>2</sup> ) | Massa seca –<br>folhas (g) | Massa seca –<br>caule (g) | Massa seca –<br>raiz (g) |
|-----------------|-----------------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|
| <b>Controle</b> | 281,84 ± 8,08 bc                  | 0,585 ± 0,01 a             | 0,505 ± 0,02 a            | 0,627 ± 0,05 a           |
| <b>NC 1/10</b>  | 271,26 ± 10,03 c                  | 0,536 ± 0,02 a             | 0,668 ± 0,05 a            | 0,645 ± 0,07 a           |
| <b>NC</b>       | 265,28 ± 12,58 c                  | 0,537 ± 0,02 a             | 0,686 ± 0,05 a            | 0,630 ± 0,06 a           |
| <b>ATZ 1/10</b> | 351,08 ± 15,76 a                  | 0,656 ± 0,04 a             | 0,559 ± 0,04 a            | 0,523 ± 0,04 a           |
| <b>ATZ</b>      | 326,74 ± 14,96 ab                 | 0,636 ± 0,02 a             | 0,531 ± 0,04 a            | 0,575 ± 0,05 a           |
| <b>NA 1/10</b>  | 299,75 ± 14,16 abc                | 0,590 ± 0,03 a             | 0,590 ± 0,05 a            | 0,640 ± 0,07 a           |
| <b>NA</b>       | 305,56 ± 15,37 abc                | 0,558 ± 0,04 a             | 0,532 ± 0,06 a            | 0,612 ± 0,05 a           |

[00100] A figura 9 apresenta as médias ± EP (n=10) da atividade máxima do fotossistema II (Fv/Fm) e atividade efetiva do fotossistema II (YII) medidas 22 dias após as aplicações da formulação de nanopartículas de zeína em pré-emergência nas plantas de milho. Foram realizados os seguintes tratamentos: controle, nanopartículas sem atrazina (NC), atrazina comercial (ATZ) e nanopartículas com atrazina (NA) nas doses de 2000 g/ha e 200 g/ha (indicação de 1/10). Letras diferentes sobre as barras indicam que os valores foram significativamente diferentes de acordo com a ANOVA de um fator, seguida do *Teste de Tukey* ( $p < 0,05$ ).

[00101] A figura 10 apresenta os sintomas visuais nas plantas de milho do experimento de pré-emergência, as quais foram submetidas aos seguintes tratamentos: controle, nanocápsula sem atrazina diluída em 10x (NC 1/10), nanocápsula sem atrazina concentrada (NC), atrazina comercial diluída em 10x (ATZ 1/10), atrazina comercial (ATZ), nanocápsula com atrazina diluída em 10x (NA 1/10) e nanocápsula com atrazina (NA). A formulação concentrada é referente a 2000 g/ha.

[00102] Exemplo 4.2 Ensaio de atividade herbicida em tratamento pós-emergente. Em pós-emergência, foram semeadas cinco sementes de milho por vaso, os quais eram regados com 50 ml de solução nutritiva (tabela 3) uma vez por semana, com a primeira rega feita a partir da terceira semana. Após a emergência foi realizado o desbaste, deixando então três plantas em cada vaso para fazer a aplicação. A rega de água foi feita conforme a demanda das plantas. As aplicações dos tratamentos foram foliares, quando as plantas de milho estavam com três folhas.

[00103] Para o estudo da atividade herbicida em pós-emergência, foram realizados sete tratamentos com cinco repetições cada. Foi adotada a dose recomendada comercialmente, que é de 2000 g/ha (equivalente a 3,08 ml de formulação contendo atrazina 1 mg/ml em cada vaso) e também doses menores obtidas pela diluição em água destilada. Os tratamentos foram:

Controle - Água;

NC - Nanopartículas de zeína sem atrazina;

NC 1/10 - Nanopartículas de zeína sem atrazina a uma diluição de 10 vezes;

NA - Nanopartículas de zeína com atrazina;

NA 1/10 - Nanopartículas de zeína com atrazina a uma diluição de 10 vezes;

ATZ - Formulação comercial de atrazina;

ATZ 1/10 - Formulação comercial de atrazina a uma diluição de 10 vezes.

[00104] Nestes ensaios, foram realizadas análises fisiológicas com ajuda de aparelhos. O fluorômetro da OS1p (Opti Sciences) foi utilizado 1, 4, 9 e 20 dias após as aplicações para avaliar a atividade máxima do fotossistema II (Fv/Fm) em torno de sete horas da manhã, após submeter as plantas a quinze minutos de escuro. Também foi determinada a atividade efetiva do fotossistema II (YII), avaliada entre dez horas da manhã e meio dia com a luminosidade natural.



[00105] Após desmontar os experimentos, foram feitas avaliações fitométricas como área foliar, a qual foi medida pelo integrador de área foliar LI-3000C (LI-COR). Depois, as plantas foram mantidas em estufa a 60°C por pelo menos três dias e determinada a massa seca.

[00106] Apenas os tratamentos NA e NA 1/10 levaram a uma pequena inibição (cerca de 3%) da atividade máxima do fotossistema II (Fv/Fm), mas que ocorreu apenas 24 horas após aplicação (figura 11). Nos demais tempos avaliados, essa inibição foi revertida. No caso da atividade efetiva do fotossistema II (YII), houve uma inibição de cerca de 11% induzida 24 horas após aplicação dos tratamentos ATZ, NA e NA 1/10 (figura 12). A inibição do YII induzida por NA 1/10 foi revertida no quarto dia após a aplicação, enquanto a induzida por ATZ e NA foi revertida nove dias após a aplicação.

[00107] Na avaliação morfológica das plantas, realizada 23 dias após a aplicação, os tratamentos NC e NA reduziram significativamente a massa seca das folhas das plantas de milho em relação ao tratamento controle, apesar de o efeito sobre a área foliar não ter sido significativo (tabela 6). A massa seca do caule não foi afetada pelas formulações, mas a massa seca da raiz foi reduzida pelo tratamento NA. Embora tenha havido essas reduções de massas em relação ao controle, os dados indicam que, em dosagens efetivas para o controle da espécie alvo mostarda lisa (NA 1/10), a nanoformulação não se diferiu significativamente da atrazina comercial.

Tabela 6. Médias  $\pm$  EP (n=15) da área foliar (cm<sup>2</sup>) e das massas secas da folha, caule e raiz das plantas de milho 23 dias após a aplicação da formulação de nanopartículas de zeína em pós-emergência, as quais foram submetidas aos seguintes tratamentos: controle, nanopartículas sem

atrazina (NC), atrazina comercial (ATZ) e nanopartículas com atrazina (NA) nas doses de 2000 g/ha e 200 g/ha (indicação de 1/10). Letras diferentes na mesma coluna indicam que os valores foram significativamente diferentes de acordo com a ANOVA de um fator, seguida do *Teste de Tukey* ( $p < 0,05$ ).

|                 | Área foliar<br>(cm <sup>2</sup> ) | Massa seca –<br>folhas (g) | Massa seca –<br>caule (g) | Massa seca –<br>raiz (g) |
|-----------------|-----------------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|
| <b>Controle</b> | 190,19 ± 14,22 ab                 | 0,398 ± 0,03 a             | 0,208 ± 0,01 a            | 0,262 ± 0,02 a           |
| <b>NC 1/10</b>  | 178,78 ± 10,42 ab                 | 0,377 ± 0,02 ab            | 0,170 ± 0,01 a            | 0,233 ± 0,01 ab          |
| <b>NC</b>       | 149,46 ± 7,82 b                   | 0,281 ± 0,02 c             | 0,193 ± 0,02 a            | 0,214 ± 0,02 ab          |
| <b>ATZ 1/10</b> | 191,10 ± 8,44 a                   | 0,361 ± 0,02 abc           | 0,206 ± 0,02 a            | 0,215 ± 0,02 ab          |
| <b>ATZ</b>      | 213,02 ± 9,65 a                   | 0,434 ± 0,03 a             | 0,205 ± 0,01 a            | 0,207 ± 0,02 ab          |
| <b>NA 1/10</b>  | 177,11 ± 8,11 ab                  | 0,360 ± 0,02 abc           | 0,180 ± 0,02 a            | 0,221 ± 0,01 ab          |
| <b>NA</b>       | 148,85 ± 10,34 b                  | 0,294 ± 0,02 bc            | 0,184 ± 0,02 a            | 0,191 ± 0,01 b           |

[00108] Esses dados indicam que as formulações com atrazina levaram a uma inibição reversível da atividade do fotossistema II das plantas de milho, o que é coerente com a indução de mecanismos de detoxificação da atrazina por essa espécie tolerante. Todavia, a aplicação das nanopartículas de zeína em pós-emergência levou a efeitos fitotóxicos no milho, independente da presença de atrazina, com menor acúmulo de biomassa. Esses efeitos fitotóxicos não foram induzidos por NA 1/10, o qual se mostrou eficiente em controlar a espécie alvo (mostarda). Dessa forma, a utilização das nanopartículas com zeína em dose 10 vezes abaixo da recomendada permitiria um controle eficiente de plantas daninhas sensíveis sem comprometer o desenvolvimento do milho, indicando a boa seletividade do produto.

[00109] A figura 11 apresenta as médias ± EP (n=10) da atividade máxima do fotossistema II (Fv/Fm) medida 1, 4, 9 e 20 dias após as aplicações (DAA) da formulação de nanopartículas de zeína em pós-emergência nas plantas de milho, as quais foram submetidas aos seguintes tratamentos: controle, nanopartículas sem atrazina (NC), atrazina comercial

(ATZ) e nanopartículas com atrazina (NA) nas doses de 2000 g/ha e 200 g/ha (indicação de 1/10). Letras diferentes sobre as barras indicam que os valores foram significativamente diferentes de acordo com a ANOVA de um fator, seguida do *Teste de Tukey* ( $p < 0,05$ ).

[00110] A figura 12 apresenta as médias  $\pm$  EP ( $n = 10$ ) da atividade efetiva do fotossistema II (YII) medida 1, 4, 9 e 20 dias após as aplicações (DAA) da formulação de nanopartículas de zeína em pós-emergência nas plantas de mostarda, as quais foram submetidas aos seguintes tratamentos: controle, nanopartículas sem atrazina (NC), atrazina comercial (ATZ) e nanopartículas com atrazina (NA) nas doses de 2000 g/ha e 200 g/ha (indicação de 1/10). Letras diferentes sobre as barras indicam que os valores foram significativamente diferentes de acordo com a ANOVA de um fator, seguida do *Teste de Tukey* ( $p < 0,05$ ).

[00111] A figura 13 apresenta os sintomas visuais nas plantas de milho do experimento de pós-emergência, as quais foram submetidas aos seguintes tratamentos: controle, nanocápsula sem atrazina diluída em 10x (NC 1/10), nanocápsula sem atrazina concentrada (NC), atrazina comercial diluída em 10x (ATZ 1/10), atrazina comercial (ATZ), nanocápsula com atrazina diluída em 10x (NA 1/10) e nanocápsula com atrazina (NA). A formulação concentrada é referente a 2000 g/ha.

[00112] Em suma, as aplicações descritas acima detalham o herbicida triazínico desenvolvido através do encapsulamento de nanopartículas. Também é apresentado todo o processo de fabricação dos herbicidas com seus exemplos na sua forma preferencial e em outras formas alternativas.

## REIVINDICAÇÕES

1. FORMULAÇÃO HERBICIDA **caracterizada por** conter herbicida encapsulado em nanopartículas carreadoras, baseadas em proteína vegetal e tensoativos, preferencialmente nanopartículas de zeína.
2. FORMULAÇÃO HERBICIDA, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** as nanopartículas possuírem o diâmetro entre 50 e 380 nm e conter uma quantidade de herbicida (0,1 a 500 mg de ingrediente ativo/ml), e preferencialmente, a quantidade agronomicamente ativa para aplicação do herbicida em culturas é compreendida entre 0,01 a 4 kg/ha, em relação à quantidade de ingrediente ativo.
3. FORMULAÇÃO HERBICIDA, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** a solução proteica ser constituída de entre 1:1 a 60:1 mg/ml de zeína dissolvida em solução aquosa contendo um primeiro solvente polar do tipo álcool, como etanol, metanol; propanol ou metilpropanol.
4. FORMULAÇÃO HERBICIDA, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** a solução herbicida ser constituída de entre 0,1:1 a 1200:1 mg/ml de um herbicida pertencente ao grupo das triazinas, sendo preferencialmente atrazina, ametrina, simazina ou uma mistura destes, dispersas em um tensoativo.
5. PROCESSO DE OBTENÇÃO DA FORMULAÇÃO HERBICIDA, definida na reivindicação 1, **caracterizado por:**
  - a. formação de uma fase orgânica;

- b. formação de uma fase aquosa;
- c. precipitação antissolvente; e,
- d. remoção dos solventes.

6. PROCESSO DE OBTENÇÃO DA FORMULAÇÃO HERBICIDA, de acordo com a reivindicação 5 **caracterizado por** a etapa (a) ser constituída por uma solução proteica de entre 1:1 a 60:1 mg/ml dissolvida em uma primeira solução aquosa contendo solvente polar da classe dos álcoois (1:3 a 1:9,5, v/v); e a solução herbicida é constituída de entre 0,1:1 a 1200:1 mg/ml de uma triazina dispersa em um tensoativo.

7. PROCESSO DE OBTENÇÃO DA FORMULAÇÃO HERBICIDA, de acordo com a reivindicação 5 **caracterizado por** a etapa (b) ser formada pela diluição em água de um surfactante ou polímero hidrossolúvel em proporções de 1:1 a 60:1 mg/ml e preferencialmente, a fase aquosa é constituída de entre 1:10 a 40:1 mg/ml de uma solução de surfactante não-iônico.

9. PROCESSO DE OBTENÇÃO DA FORMULAÇÃO HERBICIDA, de acordo com a reivindicação 5 **caracterizado por** na etapa (c) a precipitação com antissolvente ocorrer pela adição da fase orgânica na fase aquosa em proporções de 1:0,5 a 1:20 v/v, e preferencialmente, a fase orgânica é adicionada rapidamente na fase aquosa sob agitação, que é mantida, preferencialmente, por 5 a 30 minutos.

10. PROCESSO DE OBTENÇÃO DA FORMULAÇÃO HERBICIDA, de acordo com a reivindicação 5 **caracterizado por** a etapa (d) corresponder a remoção do solvente da mistura da fase orgânica com a aquosa, sendo

que a remoção de solvente é feita em condições de vácuo por um período de 5 a 60 min.

11. PROCESSO DE OBTENÇÃO DA FORMULAÇÃO HERBICIDA, de acordo com a reivindicação 5 **caracterizado por** alternativamente na etapa (d) a remoção de solvente ser feita em condições de pressão reduzida.

12. USO DA FORMULAÇÃO HERBICIDA, definida na reivindicação1, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado por ser para o tratamento de um campo agrícola contendo lavouras de milho, sorgo, cana-de-açúcar, soja, trigo, abacaxi, sisal, seringueira; e ser usado para controlar ou impedir o crescimento de plantas daninhas pertencentes aos gêneros Acanthospermum, Ageratum, Alternanthera, Amaranthus, Bidens, Brachiaria, Cenchrus, Cyperus, Commelina, Digitaria, Desmodium, Eleusine, Emilia, Euphorbia, Galinsoga, Hyptis, Indigofera, Ipomoea, Melampodium, Nicandra, Portulaca, Raphanus, Richardia e Sida.

## DESENHOS

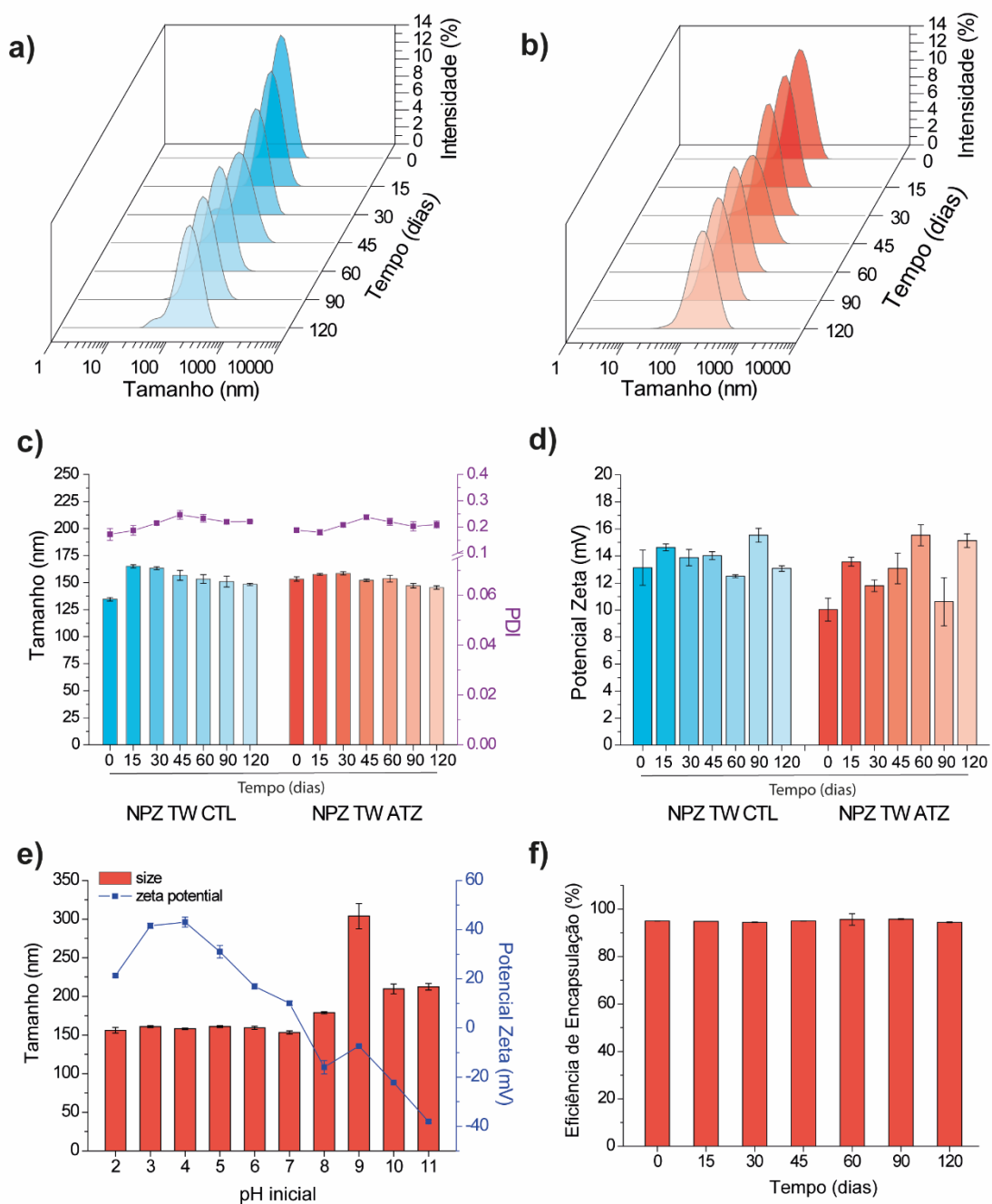


Figura 1

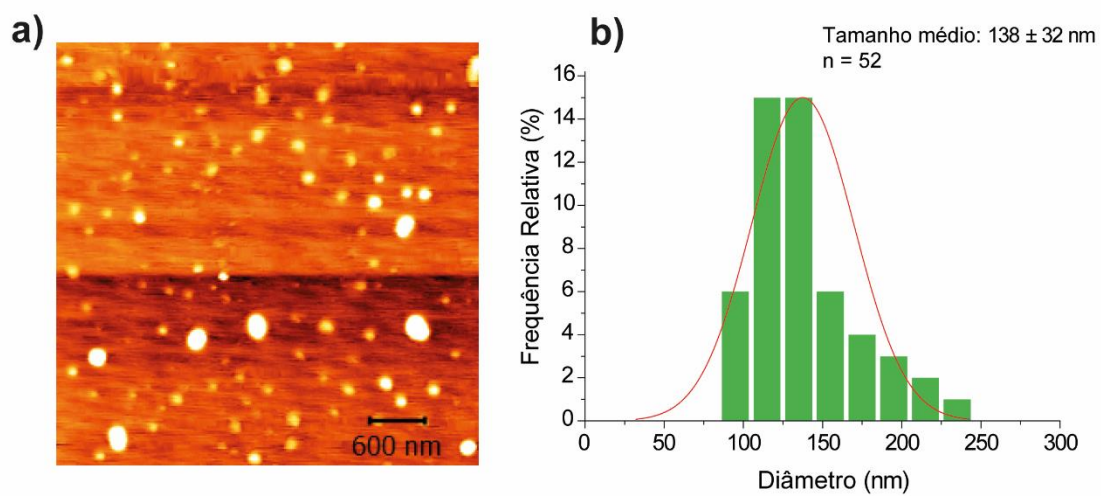


Figura 2

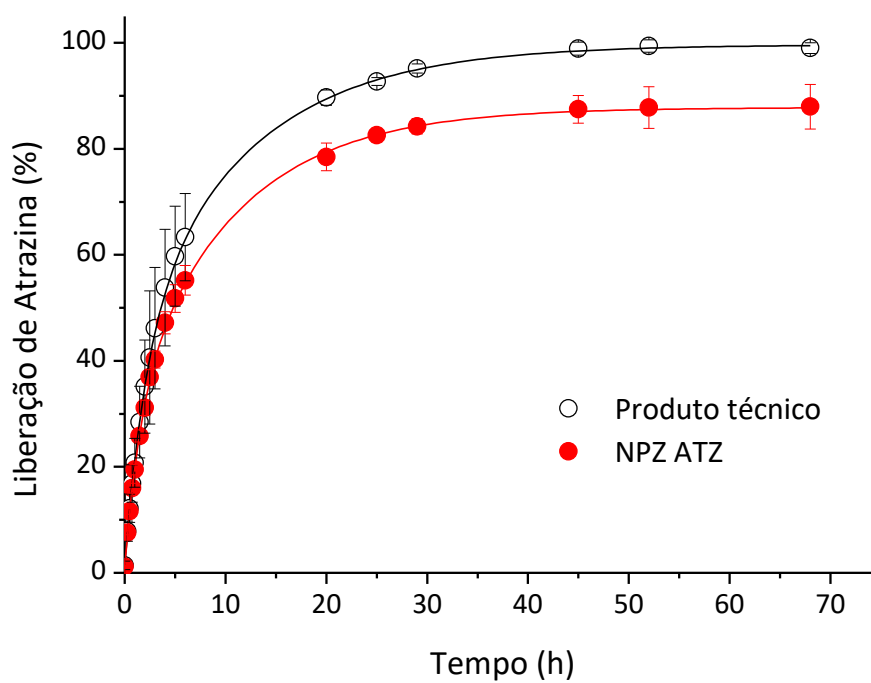


Figura 3



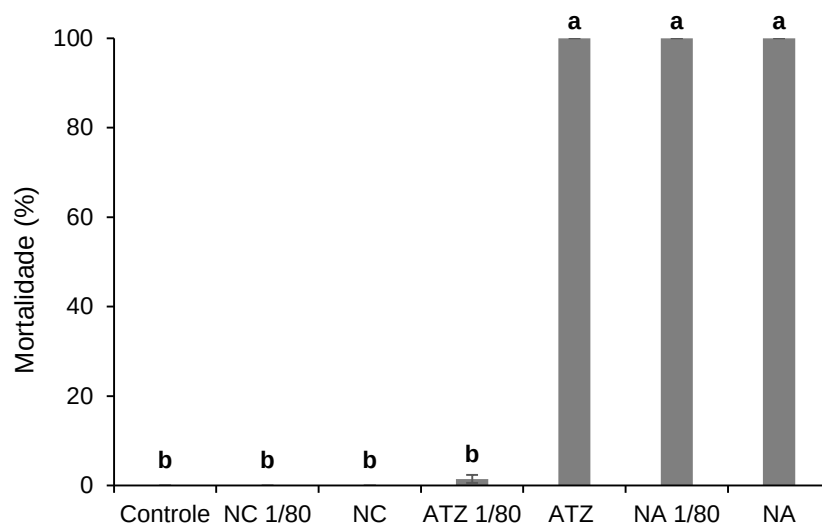


Figura 4

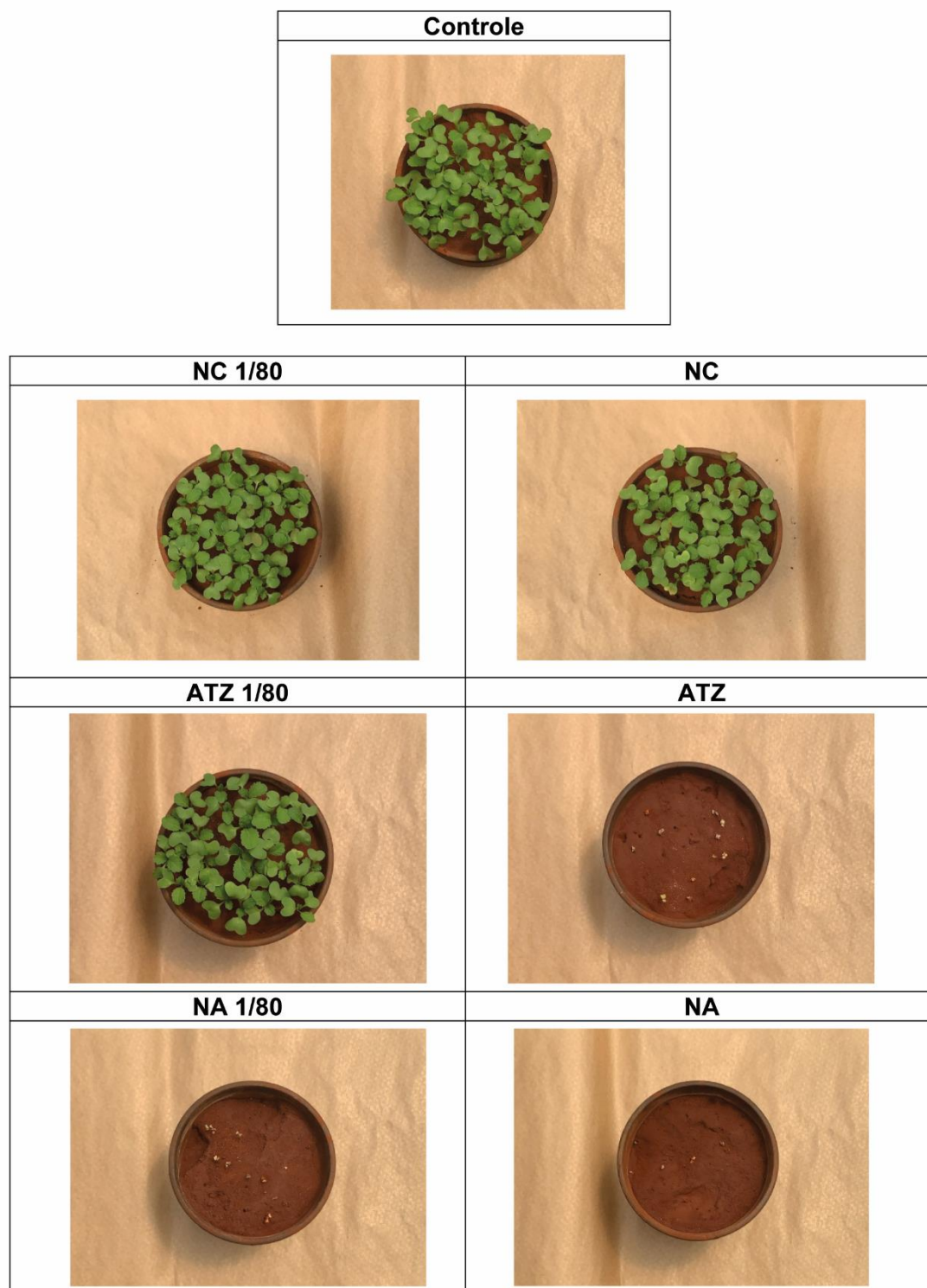


Figura 5

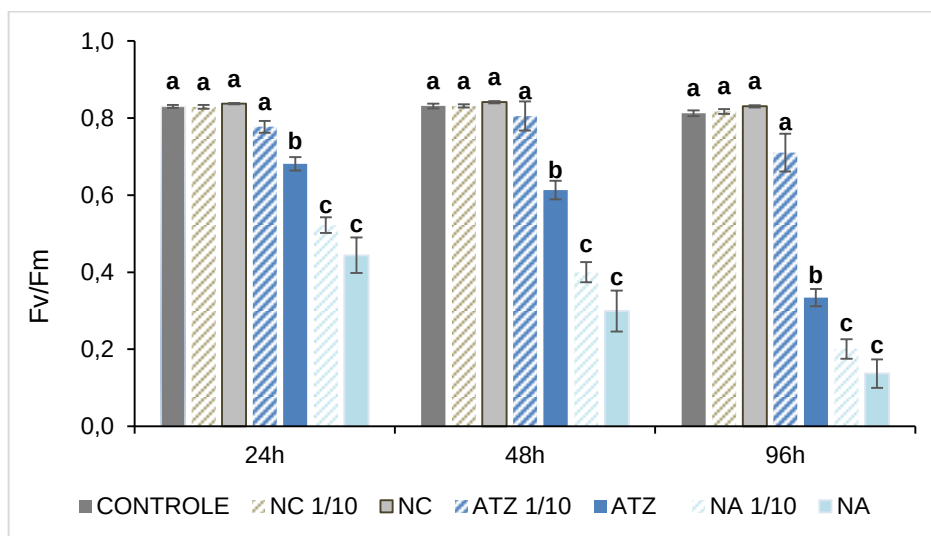


Figura 6

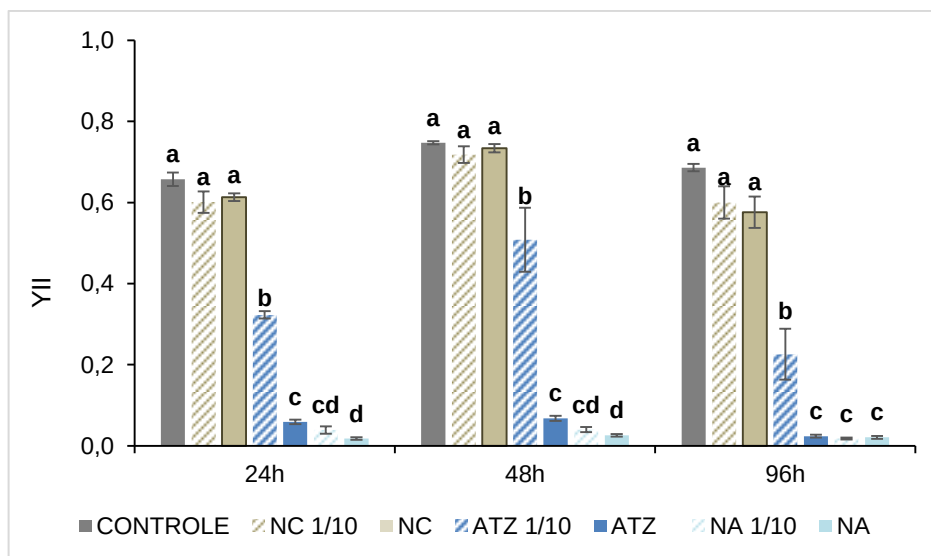


Figura 7

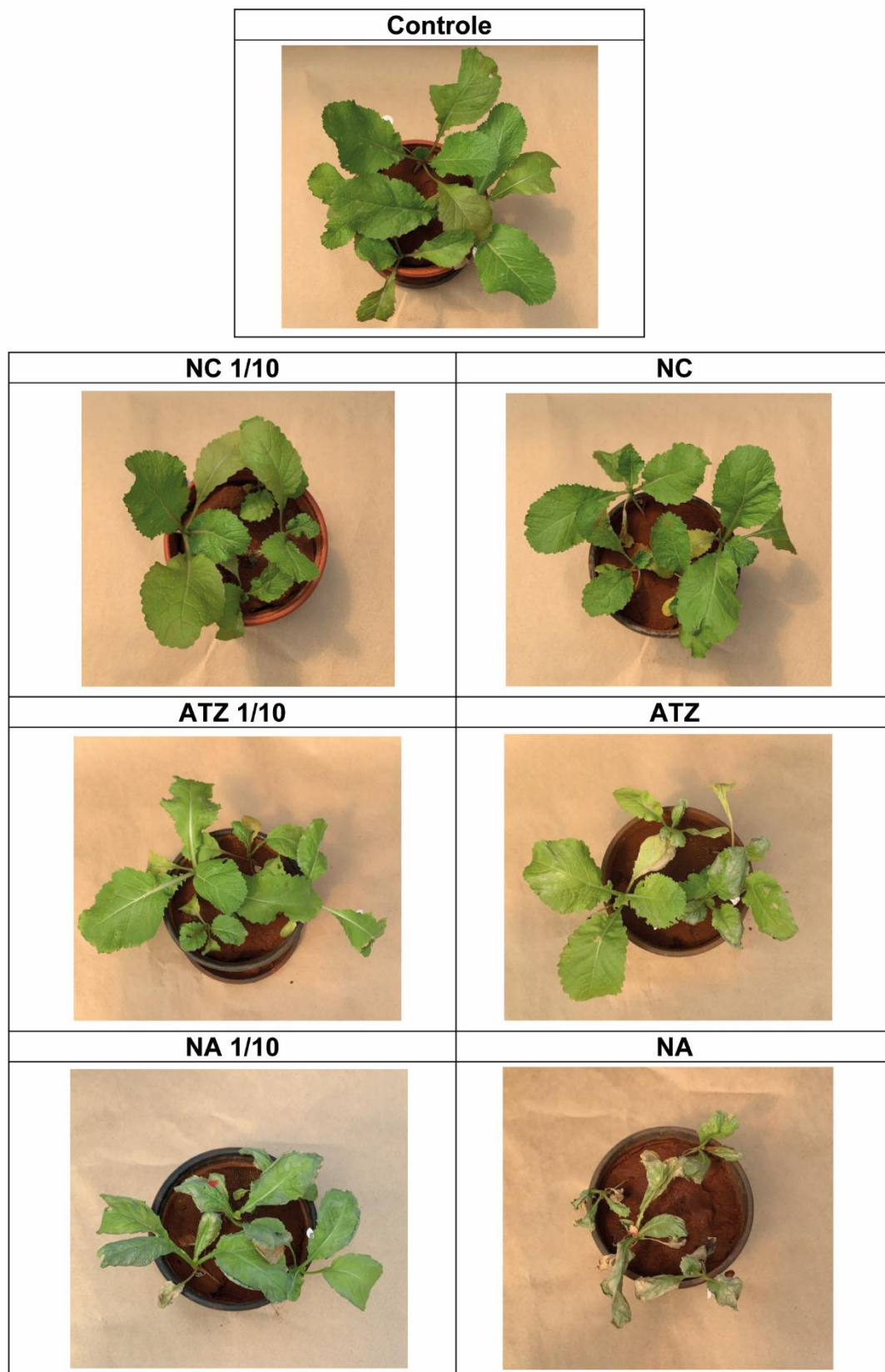


Figura 8

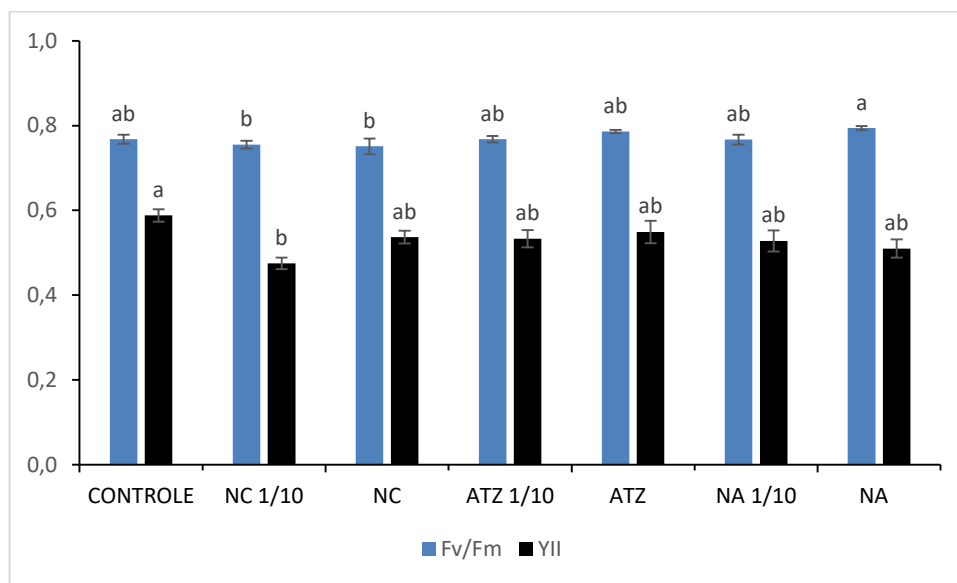


Figura 9

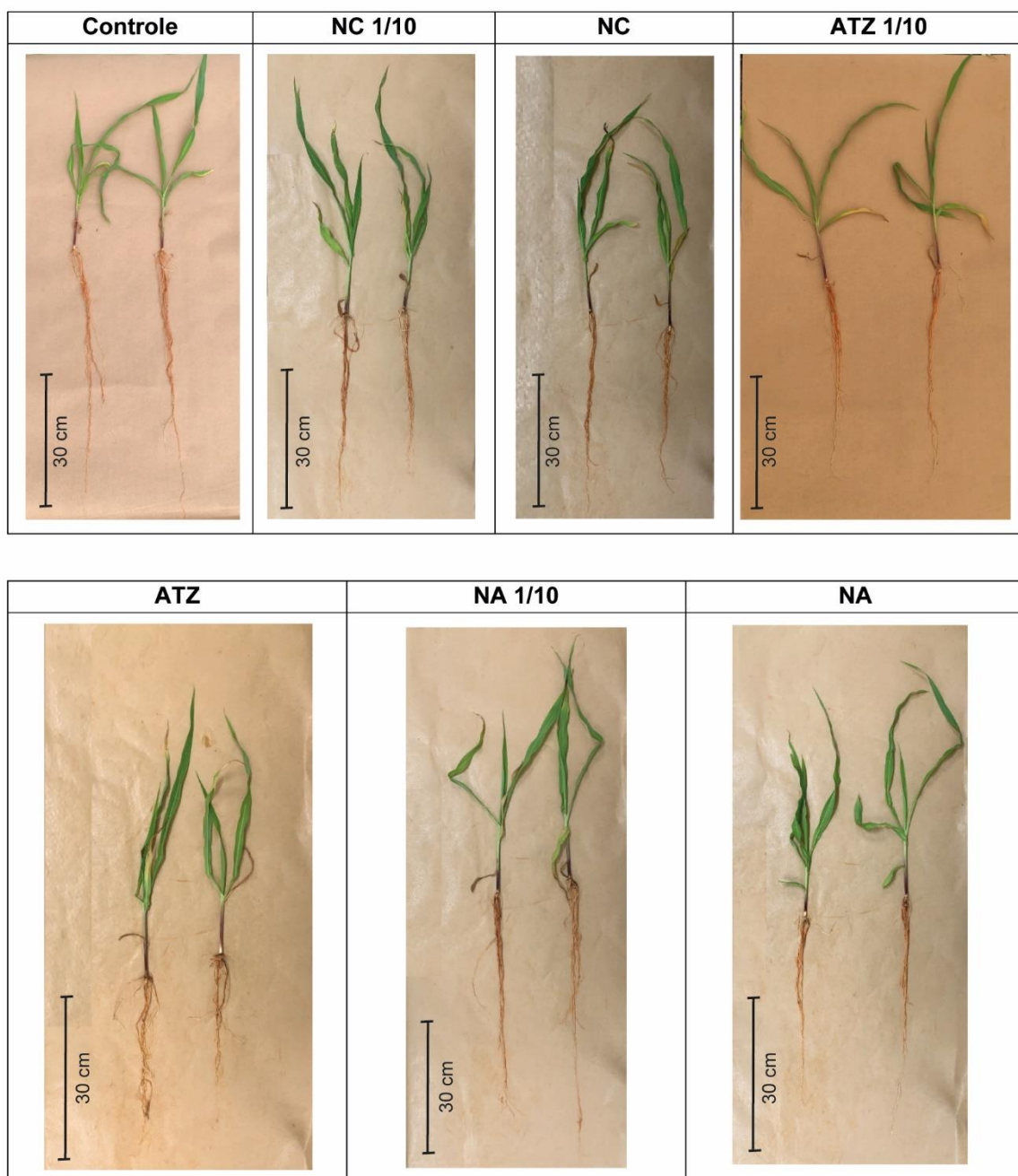


Figura 10

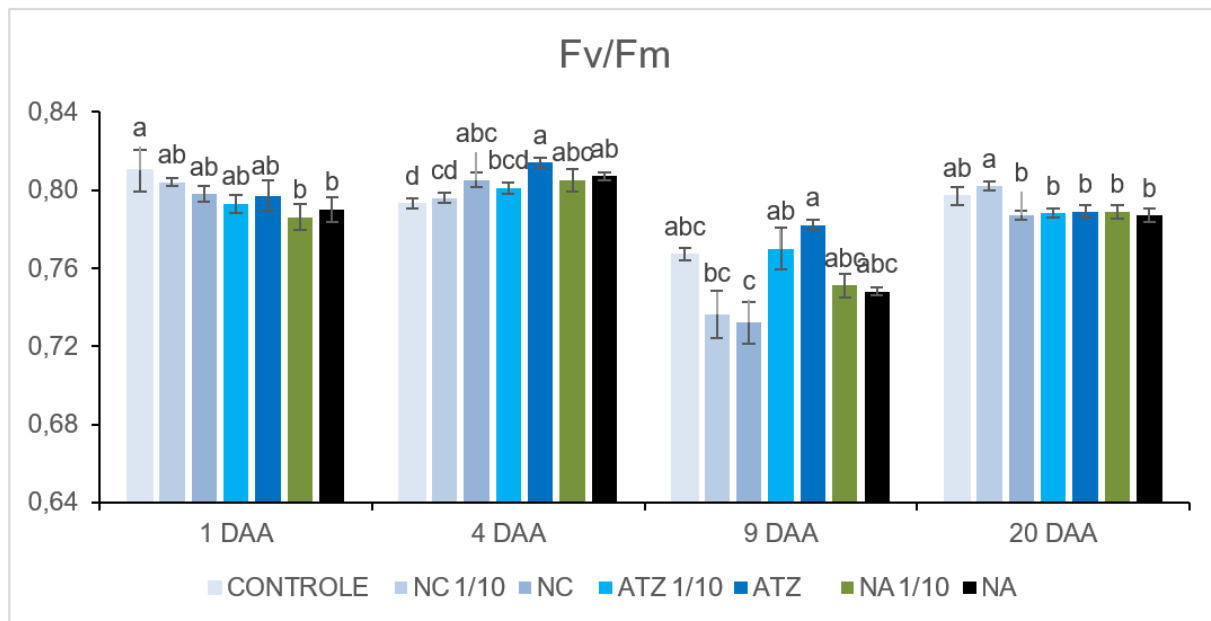


Figura 11

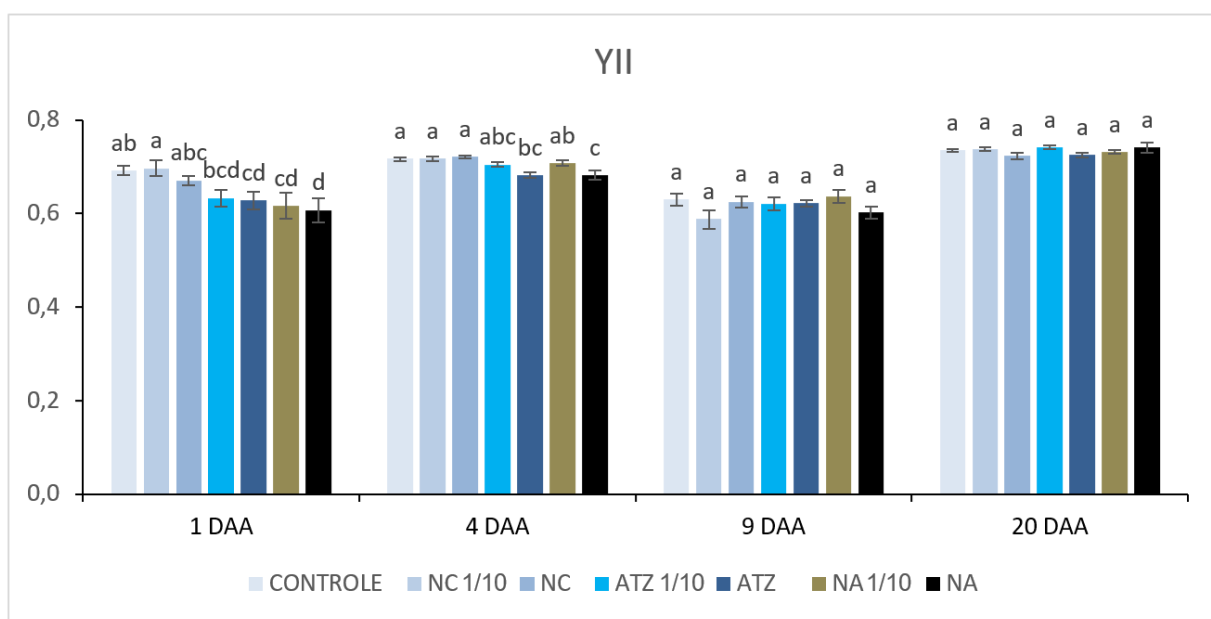


Figura 12



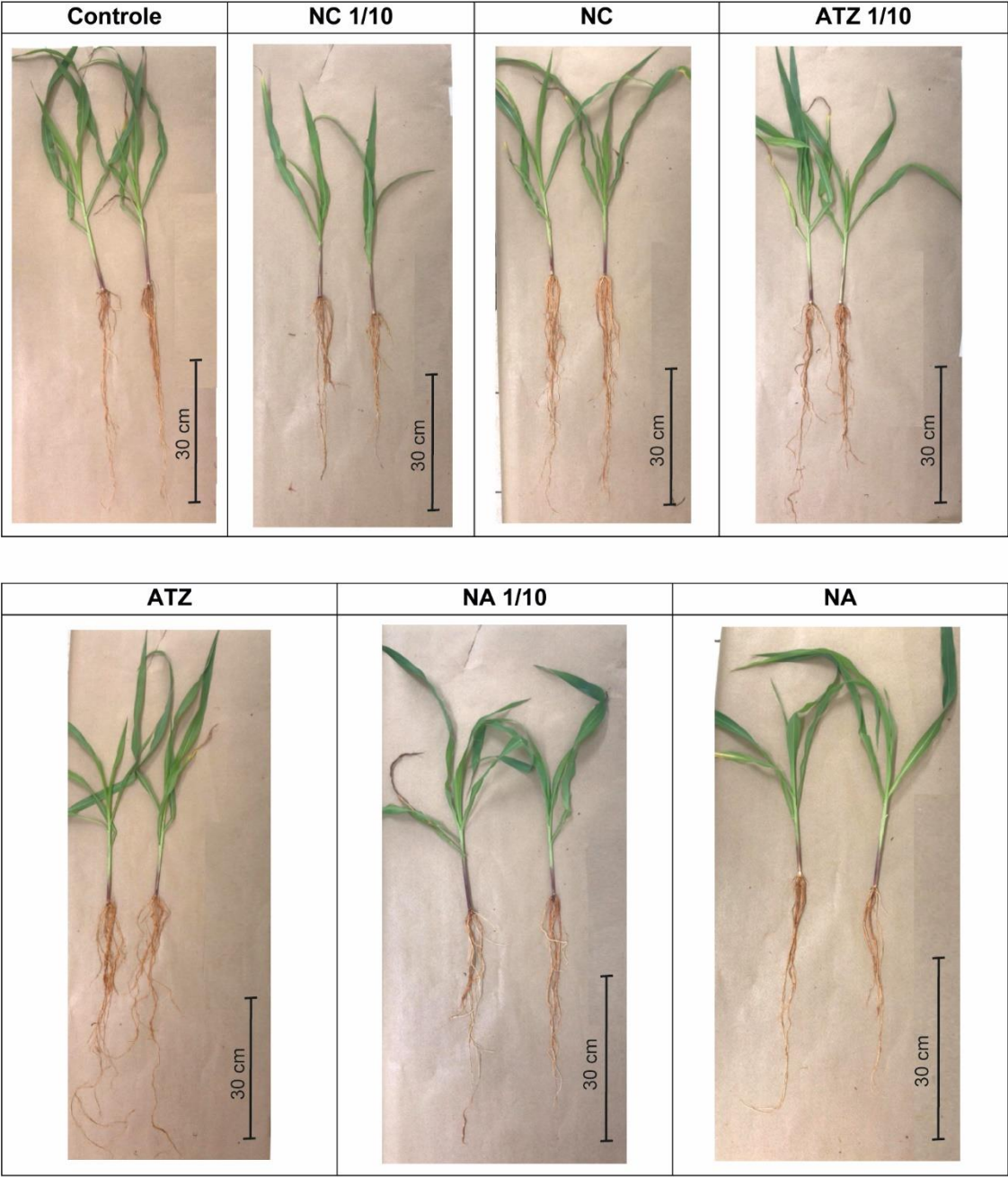


Figura 13



## RESUMO

### **FORMULAÇÃO HERBICIDA, PROCESSO DE OBTENÇÃO DA FORMULAÇÃO HERBICIDA E USO DA FORMULAÇÃO HERBICIDA.**

A presente inovação contempla o campo de invenção da Agricultura, mais especificamente no desenvolvimento de novos compostos químicos, tais como herbicidas. O presente documento propõe o desenvolvimento de uma nova formulação de herbicida, pertencente preferencialmente a classe dos herbicidas triazínicos, a partir do uso de nanopartículas baseadas em proteínas vegetais. Elas são capazes de liberar gradualmente os compostos envolvidos e de promover um aumento de absorção do herbicida, permitindo uma melhoria na efetividade do herbicida, além de reduzir as dosagens aplicadas. A inovação proposta permitiu a redução da toxicidade e da degradação deste novo herbicida. O herbicida proposto pode ser usado tanto em pré quanto em pós-emergência e os ensaios de atividade herbicida foram realizados, nas duas condições (pré e pós) com a utilização de modelos biológicos de plantas alvo e não-alvo. Nos ensaios foram avaliados a mortalidade das plantas, as atividades máxima e efetiva do fotossistema II, e parâmetros fitométricos. Os resultados alcançados demonstraram que o sistema carreador, desenvolvido com nanopartículas de zeína, proporcionou maior efetividade herbicida, mesmo em dosagens reduzidas, sem aumentar a toxicidade para as plantas não-alvo avaliadas. O desenvolvimento objetivou a resolver o problema técnico de uso excessivo de herbicidas e toda sua cadeia de consequências, seja por contaminação do solo, dos leitos de rios próximos a área de cultivo, dentre outros danos, promovendo a produção agrícola de modo mais limpo e sustentável, além de possibilitar a redução do custo no processo produtivo.