

JHONES LUIZ DE OLIVEIRA

**PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
LIPÍDICAS SÓLIDAS COMO SISTEMA CARREADOR
CONJUNTO PARA OS HERBICIDAS ATRAZINA E SIMAZINA
VISANDO FUTURAS APLICAÇÕES EM AGRICULTURA**

Sorocaba
2015

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO em

*ciências
ambientais*



unesp
Sorocaba

JHONES LUIZ DE OLIVEIRA

**PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
LIPÍDICAS SÓLIDAS COMO SISTEMA CARREADOR
CONJUNTO PARA OS HERBICIDAS ATRAZINA E SIMAZINA
VISANDO FUTURAS APLICAÇÕES EM AGRICULTURA**

Dissertação apresentada como
requisito para a obtenção do título
de Mestre em Ciências Ambientais
da Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho" na Área
de Concentração Diagnóstico,
Tratamento e Recuperação
Ambiental

Orientador: Prof. Dr. Leonardo
Fernandes Fraceto

Sorocaba

2015

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO em

*ciências
ambientais*

unesp
Sorocaba

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Unesp
Campus Experimental de Sorocaba

Oliveira, Jhones Luiz de.

Preparo e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas como sistema carreador conjunto para os herbicidas atrazina e simazina visando futuras aplicações em agricultura / Jhones Luiz de Oliveira, 2015.

106 f. : il.

Orientador: Leonardo Fernandes Fraceto

Dissertação (Mestrado)- Universidade Estadual Paulista. Campus Experimental de Sorocaba, Sorocaba, 2015.

1. Nanotecnologia - aspectos ambientais. 2. Nanopartículas. 3. Herbicidas. 4. Atrazina. I. Universidade Estadual Paulista. Campus Experimental de Sorocaba. II. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS COMO SISTEMA CARREADOR CONJUNTO PARA OS HERBICIDAS ATRAZINA E SIMAZINA VISANDO FUTURAS APLICAÇÕES EM AGRICULTURA

AUTOR: JHONES LUIZ DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: Prof. Dr. LEONARDO FERNANDES FRACETO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências Ambientais ,
Área: DIAGNÓSTICO, TRATAMENTO E RECUPERAÇÃO AMBIENTAL, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. LEONARDO FERNANDES FRACETO

Coordenação de Curso de Engenharia Ambiental/ Unidade de Sorocaba



Prof. Dr. GERSON ARAUJO DE MEDEIROS

Coordenação de Curso de Engenharia Ambiental / Unidade de Sorocaba



Prof. Dr. HALLEY CAIXETA DE OLIVEIRA

Departamento de Biologia Animal e Vegetal - Universidade Estadual de Londrina

Data da realização: 03 de fevereiro de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Profº Drº Leonardo Fernandes Fraceto (Orientador)

Departamento de Química Ambiental

UNESP – Univ Estadual Paulista

Campus de Sorocaba

Profº Drº Gerson Araújo de Medeiros (Titular)

Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais

UNESP – Univ Estadual Paulista

Campus de Sorocaba

Profº Drº Haley Caixeta de Oliveira (Titular)

Departamento de Biologia Animal e Vegetal

UEL – Univ Estadual de Londrina

Profº Drº Marco Vinícius Chaud (Suplente)

Departamento de Biomateriais e Nanotecnologia

UNISO – Univ de Sorocaba

Profº Drº Marcelo Bispo de Jesus (Suplente)

Departamento de Bioquímica

UNICAMP – Univ Estadual de Campinas

DEDICATÓRIA

Aos meu pais, **Rosa Maria Domingues** e **Luiz Antonio de Oliveira**,
que com todo amor e dedicação sempre me apoiaram. Não consigo
descrever a gratidão que tenho por tudo que fizeram e fazem por mim.

Aos meus tios, **José Dias Borborema** e **Rosa Cristina**, pelo cuidado
e carinho que dispensaram a mim em todos esses anos que
convivemos juntos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus e aos meus santos protetores por todas as bênçãos e pelo refúgio espiritual. *Tudo posso naquele que me fortalece (Filipenses 4:13).*

Ao Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto por toda a orientação concedida a mim, pelas oportunidades e pela amizade. “Léo”, tudo isto reflete no meu crescimento profissional e pessoal e só tenho que agradecer a você por tudo. O meu muito obrigado de coração e que Deus te abençoe sempre.

A Prof. Dr. Renata de Lima por todo apoio desde a época de graduação e por me encaminhar para o Mestrado.

Aos meus pais, por toda educação, amor e carinho. São os alicerces de toda a minha formação.

A toda minha família pelo apoio e torcida para o meu sucesso.

Um agradecimento especial, a minha amiga e companheira de laboratório Estefânia Vangelie Campos, por toda amizade e ajuda dispensada a mim. Estefânia, desde os estudos para o processo de seleção do mestrado até o dia-a-dia do laboratório, só tenho que agradecer por tudo. Sei que essa “braveza” toda é só por fora, o seu coração é gigante.

Aos meus companheiros de grupo de pesquisa, Nathalie, Grillo e Anderson por toda ajuda e experiência passada no dia-a-dia. Muito obrigado pela amizade, convívio e aprendizado.

Aos demais companheiros (as) de laboratório e aos colegas da pós-graduação em Ciências Ambientais pelo convívio e boas conversas.

Aos meus amigos da igreja, pela amizade, conversas e dedicação à música, a qual me traz tanta paz e calma.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e a Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) pelo espaço, oportunidade e experiência.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de mestrado concedida e pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

A todos aqueles que de alguma forma torceram e torcem para o meu sucesso.

*“ Ainda que a minha mente e o meu corpo
enfraqueçam, Deus é a minha força, Ele é tudo o que
eu sempre preciso.”*

Salmo 73:26

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	16
ABSTRACT	18
1. INTRODUÇÃO	19
1.1 DEFENSIVOS AGRÍCOLAS	19
1.2 HERBICIDAS	20
1.2.1 HERBICIDAS E RISCOS À SAÚDE HUMANA	22
1.2.2 HERBICIDAS TRIAZÍNICOS	23
1.3 NANOTECNOLOGIA NA AGRICULTURA – SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA	28
1.4 NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS (SLN)	30
1.4.1 MATÉRIA-PRIMA UTILIZADOS PARA O PREPARO DAS SLN	31
1.5 CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS	33
1.5.1 ESPECTROSCOPIA DE CORRELAÇÃO DE FÓTONS	33
1.5.2 POTENCIAL ZETA	34
1.5.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO	35
1.5.4 CALORIMETRIA DIFERENCIAL EXPLORATÓRIA (CDE)	36
1.5.5 RASTREAMENTO DE NANOPARTÍCULAS	36
1.5.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	37
2. OBJETIVOS	38
2.1 GERAIS	38
2.2 ESPECÍFICOS	38
3. MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 MATERIAIS	39
3.2 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA ANALÍTICA DE QUANTIFICAÇÃO DOS HERBICIDAS 40	
3.2.1 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	40
3.2.2 OBTENÇÃO DE CONDIÇÕES ANALÍTICAS PARA QUANTIFICAÇÃO DOS HERBICIDAS	41
3.3 PREPARO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CONTENDO OS HERBICIDAS ATZ E SMZ	45
3.4 ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA	45
3.4.1 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DE ATZ E SMZ NAS SLN	46
3.4.2 DIÂMETRO HIDRODINÂMICO E POLIDISPERSÃO	46
3.4.3 POTENCIAL ZETA	47

3.4.4 ANÁLISE DO PH E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES	47
3.5 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO.....	48
3.6 CALORIMETRIA DIFERENCIAL EXPLORATÓRIA (CDE)	48
3.7 RASTREAMENTO DE NANOPARTÍCULAS	49
3.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	49
3.9 CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DA ATZ E SMZ DAS SLN.....	50
3.10 MODELAGEM MATEMÁTICA	51
3.11 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE ATRAVÉS DO ENSAIO DE MTT	52
3.12 ENSAIOS DE ATIVIDADE HERBICIDA.....	52
3.12.1 TRATAMENTO PRÉ-EMERGÊNCIA	53
3.12.2 TRATAMENTO PÓS-EMERGÊNCIA.....	54
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4.1 OBTENÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DOS HERBICIDAS.....	55
4.1.1 AQUISIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS PARA OS HERBICIDAS	55
4.1.2 CONSTRUÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO E ADQUAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA	56
4.2 CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DA ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS	
LIPÍDICAS SÓLIDAS	60
4.2.1 DIÂMETRO HIDRODINÂMICO E POLIDISPERSÃO	60
4.2.2 POTENCIAL ZETA.....	63
4.2.3 AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS (PH) E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS	
GRAXOS LIVRES	65
4.2.4 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO	68
4.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	69
4.4 RASTREAMENTO DE NANOPARTÍCULAS.....	71
4.5 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO	73
4.6 CALORIMETRIA DIFERENCIAL EXPLORATÓRIA	75
4.7 CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DOS HERBICIDAS DAS SLN.....	77
4.8 MODELAGEM MATEMÁTICA PARA AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE LIBERAÇÃO	82
4.9 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE ATRAVÉS DO ENSAIO DE MTT	85
4.10 ENSAIO DE ATIVIDADE HERBICIDA.....	86
5. CONCLUSÕES	92
6. REFERÊNCIAS	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação do transporte de elétrons no fotossistema II, e interferência dos herbicidas na transferências de elétrons (adaptado de HESS, 2000).	24
Figura 2 : Estrutura química do herbicida atrazina. Em destaque (quadro) encontra-se representado o anel triazínico.	25
Figura 3: Estrutura química do herbicida simazina. Em destaque (quadro) encontra-se representado o anel triazínico.	26
Figura 4: Representação esquemática de nanopartícula lipídica sólida. O composto bioativo está representado em verde, sendo que em ambos sistemas o mesmo pode estar disperso no core lipídico, interagindo com o estabilizante, ou adsorvida na superfície da nanopartícula. Os componentes da representação esquemática não estão representado em escala de tamanho.(Adaptado de Muller et al., 2000).	30
Figura 5: Estrutura química do lipídio Tripalmitina. Em destaque encontra-se representado o grupamento glicerol ao qual encontram-se ligados os ácidos graxos saturados.....	32
Figura 6: Representação esquemática da estrutura monomérica do álcool polivinílico. O índice n representa o número de unidades monoméricas que forma o polímero, podendo variar de acordo com o tamanho da cadeia polimérica.	33
Figura 7: Representação esquemática do sistema utilizado para realização do ensaio de liberação. O sistema utilizado consiste em um sistema doador, onde é adicionada a formulação contendo herbicidas e um sistema acceptor que encontra-se em condição de diluição sink. Os dois sistemas são separados por uma membrana de celulose regenerada (Spectrapore) com um poro de exclusão molecular de 1 kDa. Durante o ensaio, alíquotas são retiradas do compartimento acceptor e quantificadas por CLAE.....	50
Figura 8: Cromatograma dos herbicidas ATZ e SMZ obtido sob condições cromatográficas descritas na tabela 1. O cromatograma apresenta dois picos sendo o da ATZ em 9 min e o da SMZ em 6,8 min.....	55
Figura 9: Curva analítica obtida para os herbicidas. A) atrazina e B) simazina. Valores representam a média de três experimentos realizados em triplicata (n=9).	56

Figura 10: Diâmetro hidrodinâmico (tamanho) das SLN com e sem os herbicidas em função do tempo (120 dias). As medidas foram realizadas em triplicata (n=3). Foi considerada uma significância de $p < 0,05$ para as diferenças estatísticas observadas entre os grupos, onde a* representa variações significativas entre os grupos em função do tempo em relação ao controle no tempo zero; b* comparação com o tempo 15 dias; c* comparação com o tempo 30 dias; d* comparação com o tempo 60 dias.....	61
Figura 11: Curvas de distribuição de tamanho das SLN em diferentes tempos de estabilidade: A) SLN no tempo inicial e final (0 e 120 dias) ; B) SLN+ATZ no tempo inicial e final (0 e 120 dias C) SLN+SMZ no tempo inicial e final (0 e 120 dias) e D) SLN+ATZ+SMZ no tempo inicial e final (0 e 120 dias), temperatura 25°C, as análises foram feitas em triplicatas.	62
Figura 12: Valores de polidispersão avaliados em função do tempo para SLN com e sem herbicidas, determinação em triplicata (n=3).	63
Figura 13: Valores de potencial zeta (mV) para as formulações de SLN carregadas e não carregadas com os herbicidas em função do tempo (0, 15, 30, 60, 90 dias e 120 dias), determinação em triplicata (n=3).	65
Figura 14: Perfil do pH das formulações de SLN sem e contendo os herbicidas em função do tempo.....	66
Figura 15: Eficiência de encapsulação (%) dos herbicidas nas SLN em função do tempo (zero, 15, 30, 60, 90 e 120 dias), determinação em triplicata (n=3).	68
Figura 16: Micrografias das SLN com e sem os herbicidas ATZ e/ou SMZ no tempo inicial de armazenamento (0 dias). A) SLN, aumento de 27800 vezes; B) SLN+ATZ, aumento de 27800 vezes; C) SLN+SMZ, aumento de 27800 vezes e D) SLN+ATZ+SMZ, aumento 21560 vezes.....	70
Figura 17: Micrografia e gráficos de distribuição de tamanho das SLN contendo os herbicidas ATZ e SMZ no tempo final de armazenamento (120 dias). A) SLN+ATZ+SMZ, aumento 21560 vezes; B) Distribuição de tamanho por intensidade no tempo 120 dias; C) Distribuição de tamanho por volume no tempo 120 dias. Seta: Deformações na morfologia das SLN.....	71
Figura 18: “Frame” do vídeo gravado para as análises das SLN. A) SLN; B) SLN+ATZ; C) SLN+SMZ e D) SLN+ATZ+SMZ.	72
Figura 19: Distribuição de tamanho das partículas em função da concentração. A) SLN; B) SLN+ATZ; C) SLN+SMZ e D) SLN+ATZ+SMZ, as análises foram	

realizadas a 25°C, totalizando um n=15. A linha vermelha é correspondente ao desvio padrão das análises.	73
Figura 20: Espectros de infravermelho para A) ATZ, B) SMZ, C) Tripalmitina, D) Mistura física dos componentes, E) SLN, F) SLN+ATZ+SMZ. Os espectros foram adquiridos utilizando acessório de reflectância total atenuada (ATR), com um total de 32 acumulações na faixa de frequência de 4000 a 400 cm ⁻¹ . As setas indicam em cada espectro as principais bandas de absorção características.....	74
Figura 21: Termogramas de Calorimetria Diferencial Exploratória para: a) atrazina; b) simazina; c) tripalmitina; d) mistura física; e) SLN sem herbicidas; f) SLN com atrazina e simazina.	77
Figura 22: Perfil de cinética de liberação in vitro para os herbicidas atrazina e simazina livres e associados às SLN, 25°C, determinação em triplicata (n=3). Os ensaios foram realizados em sistema de dois compartimentos em triplicata.	78
Figura 23: Perfil de cinética de liberação in vitro para o herbicida atrazina livre e associado às SLN, 25°C, determinação em triplicata (n=3).	79
Figura 24: Perfil de cinética de liberação in vitro para o herbicida simazina livre e associado às SLN, 25°C, determinação em triplicata (n=3).	80
Figura 25: Representação esquemática das SLN contendo os herbicidas atrazina e simazina dispersas no núcleo das SLN.....	82
Figura 26: Resultados obtidos usando o modelo matemático de Korsmeyer-Peppas: A) SLN+ATZ, B) SLN+SMZ, C) SLN+ATZ+SMZ: ATZ e D) SLN+ATZ+SMZ: SMZ.	83
Figura 27: Avaliação da citotoxicidade dos herbicidas e das formulações. . Efeitos citotóxicos das SLN (com e sem fungicidas) e formulação comercial nas concentrações entre 15,625 - 31,25 e 62,5 µg/mL em células de fibroblastos de camundongos Balb-c 3T3, determinadas por redução de MTT.....	85
Figura 28: Imagem das plantas (<i>Raphanus raphanistrum</i>) após tratamento pré-emergência com as formulações de nanopartículas lipídicas sólidas (SLN), formulação comercial (FC) e formulação de nanopartículas lipídicas sólidas contendo os herbicidas atrazina e simazina. Foram investigadas diferentes concentrações sendo: A) dosagem recomendada 3 kg/há (1:1); B) dosagem diluída 10 vezes (0,3 kg/ha).	87
Figura 29: Tratamento Pré-emergência para espécie alvo <i>Raphanus raphanistrum</i> (Nabo). A) Massa fresca (g) para a parte aérea; B) Massa fresca (g) para a raiz. Foi	

considerada uma significância de $p < 0,05$ para as diferenças estatísticas observadas entre os grupos da mesma concentração, onde a* representa variações significativas entre os grupos em relação ao controle; b* comparação a formulação comercial; c* comparação com as SLN carregas com os herbicidas. 88

Figura 30: Tratamento Pós-emergência para espécie alvo *Raphanus raphanistrum* (Nabo). A) Massa fresca (g) para a parte aérea; B) Massa fresca (g) para a raiz. Foi considerada uma significância de $p < 0,05$ para as diferenças estatísticas observadas entre os grupos da mesma concentração, onde a* representa variações significativas entre os grupos em relação ao controle; b* comparação a formulação comercial; c* comparação com as SLN carregas com os herbicidas. 89

Figura 31: Imagem das plantas (*Zea mays*) após tratamento pré- emergência com as formulações de nanopartículas lipídicas sólidas (SLN), formulação comercial (FC) e formulação de nanopartículas lipídicas sólidas contendo os herbicidas atrazina e simazina. Foram investigadas diferentes concentrações sendo: A) dosagem recomendada 3 kg/há (1:1); B) dosagem diluída 10 vezes (0,3 kg/ha). 90

Figura 32: Tratamentos pré e pós- emergência para espécie não-alvo *Zea mays* (milho). A) Massa fresca (g) para a parte aérea após tratamento pré- emergência; B) Massa fresca (g) para a raiz após tratamento emergência; C) Massa fresca (g) para a parte aérea após tratamento pós- emergência; D) Massa fresca (g) para a raiz após tratamento pós- emergência. 90

Figura 33: Resumo dos principais resultados obtidos para as formulações de nanopartículas lipídicas sólidas contendo os herbicidas atrazina e simazina 93

LISTA DE QUADROS E TABELA

Tabela 1: Características físico-químicas para os principais herbicidas triazínicos.	23
Tabela 2: Condições cromatográficas ajustadas para a quantificação dos herbicidas nas nanopartículas lipídicas sólidas.	40
Tabela 3: Coeficientes de correlação (r) para as curvas de calibração da ATZ realizadas em três dias consecutivos.	57
Tabela 4: Valores do desvio padrão relativo (DPR) das concentrações de atrazina determinados para a avaliação da precisão.	57
Tabela 5: Valores da concentração de atrazina determinadas para avaliação da exatidão.	58
Tabela 6: Valores da concentração de simazina, determinadas para avaliação da exatidão.	58
Tabela 7: Limite de detecção e limite de quantificação dos métodos analíticos para cada herbicida estudado.	59
Tabela 8: Quantificação de ácidos graxos livres (ácido palmítico) no tempo inicial de preparo e após 180 dias de armazenamento.	67
Tabela 9: Valores de Porcentagem de liberação no tempo final e Fluxo Aparente (Fapp) para herbicidas livres, os encapsulados individualmente e os encapsulados conjuntamente nas SLN.	81
Tabela 10: Valores de constantes de liberação (k), expoente de liberação (n) e coeficiente de correlação (r) obtidos das curvas das cinéticas de liberação dos herbicidas associados às nanopartículas lipídicas sólidas.	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	= Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATZ	= Atrazina
CLAE	= Cromatografia líquida de alta eficiência
DLS	= Dynamic Light Scattering
CDE	= Differential scanning calorimetry ou Calorimetria Diferencial Exploratória
F _{app}	= Fluxo Aparente
FTIR	= Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
GH	= Grau de Hidrólise
INMETRO	= Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LD	= Limite de Detecção
LQ	= Limite de Quantificação
NTA	= Nanoparticle tracking analysis ou Rastreamento de Nanopartículas
MTT	= 3(4-5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio
PCL	= Poli(ε-caprolactone)
PNDA	= Programa Nacional de Defensivos Agrícolas
PND	= Plano Nacional de Desenvolvimento
SLN	= Nanopartículas Lipídicas Sólidas
SLN+ATZ	= Nanopartículas Lipídicas Sólidas contendo atrazina
SLN+SMZ	= Nanopartículas Lipídicas Sólidas contendo simazina
SLN+ATZ+SMZ	= Nanopartículas Lipídicas Sólidas contendo atrazina e simazina
SMZ	= Simazina

Oliveira L. J. Preparo e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas como sistema carreador conjunto para os herbicidas atrazina e simazina visando futuras aplicações em agricultura [dissertação]. Sorocaba (SP): Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2014.

RESUMO

Atrazina e simazina são herbicidas triazínicos amplamente utilizados em plantações de cana-de-açúcar e milho. Devido aos problemas ambientais e à saúde humana causados pelo uso excessivo destes herbicidas, torna-se importante o desenvolvimento de novas formulações como alternativas menos impactantes. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver um sistema de liberação modificada, baseado em nanopartículas lipídicas sólidas, para encapsulação conjunta dos herbicidas atrazina e simazina. Na primeira etapa do trabalho, as nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) a base de tripalmitina, contendo os herbicidas atrazina e simazina, foram preparadas através do método de evaporação-difusão do solvente. As SLN foram caracterizadas quanto a suas propriedades físico-químicas (diâmetro, polidispersão, potencial zeta e pH), eficiência de encapsulação, interação dos herbicidas a partícula e seus componentes, concentração, morfologia e perfil de cinética de liberação. As SLN mostraram-se eficazes para a encapsulação dos herbicidas, atingindo uma eficiência de encapsulação de 90% para atrazina e 98% para simazina. As SLN apresentaram diâmetro hidrodinâmico compreendido entre 255 nm e 300 nm, índice de polidispersão abaixo de 0,2 e potencial zeta de aproximadamente -17 mV. Em função do tempo (120 dias), todas as formulações mantiveram-se praticamente estáveis, sendo que a SLN contendo apenas simazina apresentou melhor estabilidade físico-química. Os ensaios de cinética de liberação mostraram que as nanopartículas lipídicas sólidas modificaram o perfil de liberação dos herbicidas, retardando a sua liberação. Através dos dados de fluxo aparente, constatou-se que a organização dos herbicidas dentro das partículas ocorre de forma diferente para a encapsulação conjunta e separada. Através da aplicação do modelo matemático de Korsmeyer-Peppas, observou-se que o processo de liberação é governado pelo transporte anômalo. Na segunda parte do trabalho, avaliou-se a citotoxicidade e atividade biológica destas formulações. Para os ensaios com organismo não-alvo *Zea mays* (milho), todas as formulações não apresentaram efeitos fitotóxicos em tratamentos pré e pós emergência quando comparadas ao controle. Nos ensaios com organismo alvo *Raphanus raphanistrum* (nabo), em concentrações diluídas, as SLN contendo ambos herbicidas mostraram-se mais eficazes que a formulação comercial para o tratamento pré-emergência. Já no tratamento pós-emergência foi observada a mesma efetividade para ambas formulações. A citotoxicidade dos herbicidas foi reduzida quando estes foram encapsulados nas SLN. Portanto, estes resultados abrem novas perspectivas para o uso de sistemas de liberação modificada de herbicidas, os quais apresentam um meio mais sustentável para o controle de ervas daninhas na agricultura, pois reduzem a quantidade de herbicida diminuindo os riscos ao meio ambiente e consequente à saúde humana.

Palavras-chave: Herbicidas. Nanotecnologia ambiental. Nanopartículas lipídicas sólidas. Liberação modificada.

ABSTRACT

Atrazine and simazine are triazine herbicides widely used in sugarcane and corn crops. Due to environmental and human health problems caused by excessive use of these herbicides, it is important to develop new formulations as less aggressive alternative. The aim of this study was to develop a system of modified release, based on solid lipid nanoparticles for encapsulation of both herbicides atrazine and simazine. In the first stage of the work the solid lipid nanoparticles (SLN) based in tripalmitin containing the herbicides atrazine and simazine were prepared by the method of diffusion evaporation of the solvent. The SLN were characterized for their physico-chemical properties (diameter, polydispersion, zeta potential and pH), encapsulation efficiency, particle interaction of herbicides and its components, concentration, morphology and release kinetic profile. The SLN were effective for encapsulation the herbicide, showing encapsulation efficiency of 90% to atrazine and 98% for simazine. The SLN showed hydrodynamic diameter between 255 nm and 300 nm, polydispersity index below 0.2 and the zeta potential about -17 mV. In function of time (120 days), all formulations remained stable, the SLN containing only simazine showed better physicochemical stability. The release kinetics assays showed that solid lipid nanoparticles modified the release profile of herbicides, delaying the release. The apparent flow data, showed that the organization of the herbicides within the particles occurs differently for together and separate encapsulation. The application of Korsmeyer-Peppas's mathematical model, showed that the release process is governed by anomalous transport. In the second part, evaluated the cytotoxicity and biological activity of these formulations. For tests with non-target organism *Zea mays* (maize), all formulations showed no phytotoxic effects when compared to control. In tests with target organism *Raphanus raphanistrum* (turnip), in diluted concentrations, the SLN containing both herbicides, showed more effective than the commercial formulation for pre-emergent treatment. For the post-emergent treatment was observed equally effectiveness for both formulations. Cytotoxicity was reduced when these herbicides were encapsulated in SLN. Therefore, these results open new perspectives for the use of modified release systems of herbicides, a environmentally friendly method of controlling weeds in agriculture because use smaller quantities of herbicide and decrease the environment health human risks.

Keywords: Herbicides. Environmental nanotechnology. Solid lipid nanoparticles. Modified release.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Defensivos Agrícolas

A demanda mundial por alimento decorrente do aumento da população mundial tem incentivado o aumento da produção agrícola. Neste contexto, tem se buscado o desenvolvimento de culturas de alto rendimento, as quais demandam a utilização de defensivos agrícolas, fertilizantes e equipamentos com tecnologia elevada (ANDREI, 2009).

Na literatura, existem diversas terminologias para os defensivos agrícolas, o que evidencia a multiplicidade de visões que se tem sobre essas substâncias utilizadas na agricultura. Dentre as principais terminologias, tem-se os pesticidas e praguicidas, termos limitados devido a muitos destes compostos agirem em organismos que não são considerados pragas ou pestes. Outro termo comumente utilizado pela sociedade e meio agrícola é agrotóxico, que apresenta um sentido amplo e evidencia a toxicidade destes compostos. O termo biocida também tem sido utilizado para compostos que são capazes de controlar o crescimento/proliferação de organismos nocivos (LIMA-E-SILVA, 2002).

Os defensivos agrícolas são definidos como produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas. São utilizados nas culturas agrícolas, pastagens, proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas, e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos. Também se incluem na abrangência dos defensivos agrícolas as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (ANDREI, 2009). Existem vários critérios que podem ser utilizados para a classificação dos defensivos agrícolas, sendo alguns dos mais comuns: (i) classificar de acordo com os tipos de organismos alvos sobre os quais atuam

(inseticidas, herbicidas, fungicidas, rodenticidas, entre outros); (ii) classificar segundo a classe química que pertencem (organoclorados, organofosforados, carbamatos, entre outros); (iii) classificar conforme a sua maior ou menor toxicidade aguda sobre os seres vivos, conforme recomendação da Organização Mundial da Saúde e que se baseia na determinação da dose letal 50% aguda (DL₅₀) (ALVES, 2002).

Os defensivos agrícolas trazem grande preocupação na questão ambiental, pois muitos destes compostos podem afetar a vida, a saúde do homem, a qualidade dos solos e das águas, entre outros problemas, pois muitos destes compostos são persistentes e/ou recalcitrantes no ambiente, sendo que esta contaminação ambiental é derivada principalmente do uso intensivo e inadequado dos mesmos (SILVA e FAY, 2004). O papel de destaque do Brasil no uso de defensivos agrícolas levou à criação pelo Ministério da Fazenda, no ano de 1975, do Programa Nacional de Defensivos Agrícolas (PNDA), o qual estava vinculado ao Plano Nacional de Desenvolvimento (PND). Esse programa promoveu uma grande expansão das indústrias de defensivos agrícolas no país, sendo que o principal objetivo do PNDA era tornar o país autossuficiente na produção de defensivos agrícolas, tendo em vista que grande parte destes produtos eram importados (MORAGAS;SCHNEIDER, 2003). Dados recentes mostram que, entre 2007 e 2012, o volume de defensivos aplicados nas lavouras (considerando apenas o princípio ativo) cresceu 14%, atingindo 346,6 mil toneladas, sendo que no mesmo período, a área total plantada no país cresceu 14,4%, atingindo 70,3 milhões de hectares (SINDAG, 2013).

1.2 Herbicida

Os herbicidas são uma classe de substâncias pertencentes aos defensivos agrícolas, sendo especificamente utilizados para o controle de ervas daninhas (RODRIGUES;ALMEIDA, 2011). As ervas daninhas, também conhecidas como plantas invasoras, competem diretamente com a cultura por luz, umidade e nutrientes, e apresentam rusticidade, efeitos alelopáticos, resistência a pragas e

doenças, habilidade de produzir grande número de sementes, aumentando a sua multiplicação. Devido a estas características apresentam maior resistência e habilidade para se reproduzir que a cultura desejada, sendo necessário o seu controle (BRIGHENT; OLIVEIRA, 2011). Todavia, as ervas daninhas também apresentam funções ecológicas como: o recobrimento de solos, evitando fenômenos como a erosão; funções apícolas; adicionam matéria orgânica e algumas espécies podem extrair metais pesados do solo (ANDREI, 2009).

Os herbicidas são amplamente utilizados devido às suas inúmeras vantagens, como a rapidez de ação, a flexibilidade quanto à época de aplicação e principalmente, a utilização em áreas de grande extensão. A aplicação de herbicidas também reduz o tráfego de máquinas e de cultivos mecânicos proporcionando vantagem no caso de solos susceptíveis à erosão, assim como em locais onde é importante a preservação da integridade do sistema radicular. Acrescenta-se a redução dos custos, pois além de demandar pequena quantidade de mão-de-obra, quando comparado a outros métodos de controle, o uso de herbicidas também proporciona economia de trabalho e energia, pela redução dos custos de colheita e de secagem de grãos, em função da eliminação das plantas daninhas (SENSEMAN, 2007; OLIVEIRA JR., 2011). No entanto, como qualquer outra técnica, a utilização de herbicidas para o controle de plantas daninhas apresenta também limitações, muitas vezes por falta de informação, ou até mesmo por descaso, como o seu uso excessivo e/ou em períodos inadequados, levando à contaminação não somente dos trabalhadores que os aplicam, mas de animais, rios, lençóis freáticos e a população em geral, através do consumo de alimentos, água e do contato com o ambiente contaminado (INOUE et al., 2003; OLIVEIRA JR., 2011).

Existem diversas formas de classificar os herbicidas, embora nenhuma delas seja totalmente completa ou definitiva, sendo que maioria das classificações abordam apenas certos aspectos relacionados ao comportamento dos produtos ou às suas características. As principais formas de classificação dos herbicidas são: i) *seletividade*, os herbicidas seletivos são utilizados para matar apenas as ervas daninhas sem prejudicar a cultura, já os não seletivos são aqueles de amplo espectro de ação, capazes de matar ou injuriar severamente a maior parte das plantas tendo o propósito de limpar o campo para outro cultivo; ii) *estrutura química*,

os herbicidas são divididos em triazínicos, piridina, os tiocarbamatos, entre outros; iii) *mecanismo de ação*, os herbicidas podem agir como inibidores da fotossíntese, inibidores da divisão celular, inibidores de lipídios, entre outros; iv) *modo de aplicação*, os herbicidas podem ser aplicados de forma pré ou pós-emergência. Na forma pré-emergência estes são aplicados após a semeadura ou plantio, mas antes da emergência da cultura e das plantas daninhas. Já na aplicação de pós-emergência, as plantas daninhas encontram-se emergidas, mas a cultura nem sempre (SELSEMAN, 2007; MARCHI et al., 2008; OLIVEIRA JR., 2011).

1.2.1 Herbicidas e riscos à saúde humana

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2014), os defensivos agrícolas, entres eles os herbicidas, estão entre os principais fatores de riscos para a saúde humana, em especial para agricultores e o ecossistema próximo a áreas agrícolas. Estes riscos dependem fundamentalmente do perfil toxicológico do produto, do tipo e da intensidade da exposição experimentada pelos indivíduos e da susceptibilidade da população exposta (DELGADO & PAUMGARTTEN, 2004). Inúmeras agências de controle ambiental e de saúde vêm demonstrando o potencial destes compostos como agentes poluidores do ambiente e consequentemente nocivos à saúde humana, restringindo o seu uso e definindo concentrações seguras (CARNEIRO, 2012).

A exposição ocupacional de trabalhadores agrícolas, geralmente ocorre devido à falta de informação ou recursos técnicos qualificados, desta forma, os equipamentos de proteção individual (EPIs) tendem a não ser utilizados no momento do preparo e aplicação dos herbicidas, aumentando os riscos de intoxicação (PERES; MOREIRA, 2007). As intoxicações decorrentes do contato direto (inalação, ingestão e contato com a pele) com os herbicidas podem acarretar consequências imediatas (aguda e subaguda) ou problemas crônicos (CARNEIRO, 2012). Entre os principais problemas crônicos causados pelos herbicidas, a exemplo da atrazina e do glifosato, esta na sua ação de desregulador do sistema

endócrino. Estas substâncias interferem na produção e regulação dos hormônios, afetando funções metabólicas e reprodutivas (DO CARMO et al., 2013).

A dinâmica dos herbicidas no ambiente também influencia na toxicidade destes compostos para os seres vivos, uma vez que processos como a degradação podem produzir metabólitos mais tóxicos (VAN DEN WYNGAERT et al., 2013). Os herbicidas e seus metabólitos podem ainda apresentar toxicidade ao longo da cadeia alimentar, devido aos processos de bioacumulação e biomagnificação (BICALHO; LANGENBACH, 2012).

1.2.2 Herbicidas Triazínicos

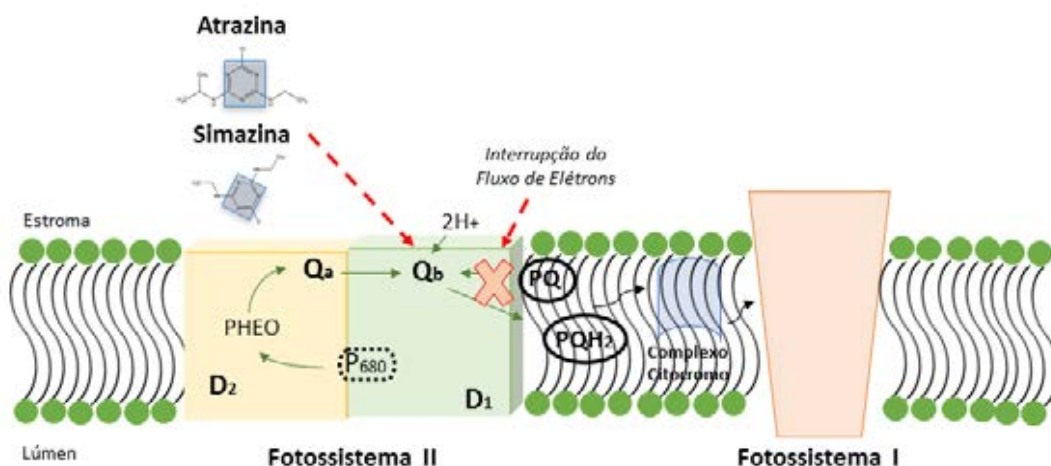
Os herbicidas triazínicos são derivados das s-triazinas, as quais são fabricadas a partir da reação do cloreto cianúrico com aminas apropriadas. Existem diversos compostos em uso comercial, derivados destas reações, sendo a atrazina, simazina, ametrina e propazina (Tabela 1) os principais compostos utilizados (LEBARON et al., 2008; BRECKENRIDGE et al., 2010).

Tabela 1: Características físico-químicas para os principais herbicidas triazínicos.

	Atrazina	Simazina	Ametrina	Propazina
Massa Molar (g mol ⁻¹)	215,68	201,66	227,3	229,71
Densidade (g cm ⁻¹)	1,2	1,3	0,521	1,16
Pressão de Vapor (mPa a 20°C)	4 x 10 ⁻²	8,1 x 10 ⁻⁴	3,6 x 10 ⁻²	3,9 x 10 ⁻³
Solubilidade em Água (mg L ⁻¹ a 20°C)	30	5	185	5
pKa	1,68	1,62	4,10	1,85
Coefficiente de Partição	2,34	1,96	2,63	---

O mecanismo de ação destes herbicidas ocorre pela inibição da fotossíntese, agindo no fotossistema II (Figura 1) (PETERSON et al., 2013). A fotossíntese ocorre nos cloroplastos, os quais possuem complexos (fotossistemas) capazes de capturar a energia luminosa (EL) e utiliza-la para a síntese de compostos ricos em energia (ATP e NADPH). O centro de reação (P680), tem seus elétrons excitados a partir da EL. Estes elétrons passam por uma série de transportadores, onde primeiramente são transferidos para a feofitina (Feo), e depois para uma molécula de plastoquinona (Qa) a qual esta presa na membrana do cloroplasto e ligada a uma proteína (D1). Então, a molécula de Qa, transfere os elétrons para outra molécula de plastoquinona (Qb), a qual recebe íons de hidrogênio, proveniente do estroma, passando a ser uma plastohidroquinona (PQH₂). A função da PQH₂ é de transferir elétrons entre fotossistema II e o citocromo, o qual irá transferir elétrons para o fotossistema I e deste então para o NADPH. Os herbicidas triazínicos, que agem na inibição do fotossistema II, competem pelo sítio de ligação da Qb na proteína D1, acarretando a saída da plastoquinona, interrompendo a transferência de elétrons entre os fotossistemas. Quando ocorre o bloqueio no fluxo de elétrons entre os fotossistemas, os elétrons não são convertidos em energia química (ATP e NADPH), ocasionando uma grande carga energética nas moléculas de clorofila, as quais produzem radicais livres levando à peroxidação de lipídeos nas membranas, e a clorose que conduz à necrose dos tecidos e morte da planta (MARCH et al., 2008; PETERSON et al., 2013).

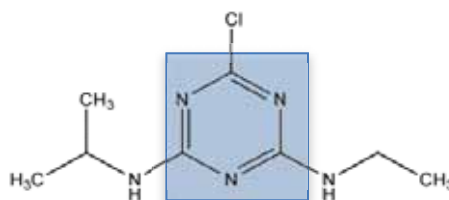
Figura 1: Representação do transporte de elétrons no fotossistema II, e interferência dos herbicidas na transferências de elétrons (adaptado de HESS, 2000).



1.2.2.1 Atrazina (ATZ)

A atrazina (Figura 2) é um herbicida triazínico cujo nome oficial é 2-cloro-4-etilamina-6-isopropilamina-s-triazina ($C_8H_{14}ClN_5$) com massa molecular de 215,68 g/mol. É um herbicida seletivo pertencente à família das s-triazinas, que agrupa os compostos que apresentam em sua estrutura química um anel aromático hexamérico, simétrico, constituído de três átomos de carbono e três de nitrogênio em posições alternadas (PAN, 2013).

Figura 2 : Estrutura química do herbicida atrazina. Em destaque (quadro) encontra-se representado o anel triazínico.



A atrazina pode ser aplicada de modo em pré e pós-emergência no controle de plantas daninhas. Na aplicação em pré-emergência, ela é absorvida pela planta através da raiz (sistema radicular) e transloca-se via xilema até as folhas (cloroplastos). Na aplicação em pós-emergência, ela é absorvida diretamente pelas folhas, onde penetra rapidamente nos cloroplastos. Geralmente a aplicação pós-emergência é a mais utilizada, devido à flexibilidade de tempo para sua pulverização e a maior eficiência de controle (ANDREI, 2009; RODRIGUES;ALMEIDA, 2011). A ATZ é mundialmente utilizada para o controle das plantas invasoras de diversas culturas. No Brasil, um dos maiores produtores de milho e cana-de-açúcar, a utilização deste herbicida é de grande expressividade (RODRIGUES; ALMEIDA, 2011).

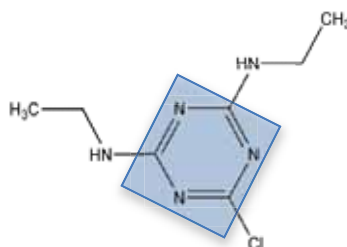
A ampla utilização, assim como a elevada persistência da atrazina e seus metabólitos em condições de frio, seca e ambientes com pH estável, faz com que este herbicida seja encontrado frequentemente em águas superficiais e subterrâneas, em solos e sedimentos de diversas partes do mundo (GRAYMORE et al., 2011). Os mecanismos de degradação da atrazina em águas superficiais são:

a fotólise, a microbiológica, sendo esta última realizada através da ação de microrganismos que promovem a N-desalquilação e hidrólise do cloro. A meia-vida da atrazina é de aproximadamente 100 dias a 20°C, porém em águas subterrâneas este valor é aumentado. A hidrólise do cloro presente no anel triazínico e a degradação microbiológica da atrazina também acontecem no solo, porém dependem principalmente da temperatura e umidade (GHOSH; PHILIP, 2006).

1.2.2.2 Simazina (SMZ)

A simazina (Figura 3) tem como nome químico 2-cloro-4,6-bis-s-etilamino-triazina ($C_7H_{12}ClN_5$), é um herbicida triazínico seletivo sistêmico, absorvido pelas raízes. A SIM é disponível em pó, grânulos dispersíveis em água, líquidos e formulações granulares (PAN, 2013).

Figura 3: Estrutura química do herbicida simazina. Em destaque (quadro) encontra-se representado o anel triazínico.



Sua aplicação pode ser pré e pós-emergência nas plantas infestantes nas culturas de abacaxi, banana, cacau, café, cana-de-açúcar, citros, maçã, milho, pinus, seringueira, sisal, sorgo, plantas ornamentais, aspargo, alfafa, palmeira e uva (HOLLAND et al., 1995). A simazina também já foi utilizada para o controle de ervas daninhas submersas e de algas, em grandes aquários, piscinas, lagos ornamentais e tanques de cultivo. Em altas dosagens, a simazina extermina as ervas daninhas de modo persistente e não seletivo, sendo utilizada em áreas industriais, nas margens de rodovias e ferrovias (KODAMA et al., 2001; PAN, 2013). A simazina tem se acumulado no ambiente devido ao seu extensivo uso, a sua alta

hidrofobicidade e também por causa da sua estrutura química que é de difícil biodegradação, possuindo um tempo de persistência de aproximadamente sete meses (RICHARDSON; GANGOLLI, 1994). A SIM é o herbicida que apresenta o menor potencial tóxico contra os animais e seres humanos dentre os triazínicos (WHO, 2004).

1.2.2.3 Associação conjunta de Atrazina e Simazina

A associação de dois ou mais herbicidas é uma técnica amplamente utilizada para o controle de plantas daninhas, consistindo em uma moderna estratégia de manejo da vegetação. Entre as principais vantagens apresentadas pela associação de herbicidas estão o aumento do espectro de controle das ervas daninhas, a redução de custos e a prevenção do surgimento de plantas resistentes aos herbicidas (GRESSEL, 1990; DAMALAS; ELEFTHEROHORINOS, 2001).

A associação dos herbicidas atrazina e simazina pode ser encontrada no mercado agrícola sob diversos nomes comerciais (Controller 500 SC, Extrazin SC, Herbimix SC, Primatop SC, Triamex 500 SC) sendo estes produtos registrados especificamente para a cultura do milho. Os produtos são indicados para uso em pré-emergência da cultura comercial e/ou das plantas daninhas e em pós-emergência, com as plantas daninhas em estágio de duas a quatro folhas em doses que variam de 1,75 a 3,5 kg.ha⁻¹, que equivale a 3,5 a 7,0 L.ha⁻¹ do produto comercial. A dose depende do fabricante e do tipo de solo, devendo-se usar a menor em solos leves e a maior em solos argilosos e com elevado nível de matéria orgânica (RODRIGUES; ALMEIDA, 2011).

1.3 Nanotecnologia na Agricultura – Sistemas de Liberação Modificada

A ampla utilização dos defensivos agrícolas, muitas vezes de maneira indiscriminada, nas áreas rurais e até mesmo urbanas, faz com que eles sejam um dos principais contaminantes de recursos hídricos superficiais e subterrâneos. Por se tratarem de produtos com uma variedade de moléculas e de propriedades diferentes, eles assumem características distintas, seja em relação a sua persistência no ambiente, mobilidade como até mesmo o seu potencial tóxico, podendo atingir organismos não-alvo, como o homem. Porém os agrotóxicos são de suma importância para a produtividade agrícola, e uma alternativa que tem se mostrado eficiente é a utilização de carreadores para liberação sustentada destes agrotóxicos, reduzindo assim o impacto ambiental e garantindo a alta produtividade (ARMAS et al., 2007; NAIR et al., 2010; CHEN;YADA, 2011).

De forma geral os defensivos agrícolas são aplicados excedendo a dose necessária para atingir o organismo alvo, isto para garantir a eficiência do produto. Muitas vezes o mecanismo natural de adsorção pela matriz do solo contribui para a retenção dos compostos ativos, porém aplicações próximas a períodos chuvosos aliada à característica das formulações convencionais em liberar o produto mais rapidamente ao ambiente, podem ocasionar a mobilidade desses defensivos agrícolas pela matriz do solo, sem ao menos terem contato com os sítios de adsorção, e através de processos como o escoamento superficial e a lixiviação, estes podem contaminar águas superficiais e subterrâneas (MORGAN et al., 2009; DURAN; MARCATO, 2013).

Portanto uma tecnologia que tem recebido crescente atenção é a nanotecnologia, pois através dela tem se desenvolvido novas formulações com compostos ativos (c.a) de interesse na agricultura (DURAN; MARCATO, 2013; PERLATTI et al., 2013). Basicamente estas formulações tem por objetivo: i) aumentar a solubilidade dos compostos ativos; ii) liberá-los de uma forma lenta e/ou iii) protegê-los contra a degradação prematura (KAH; HOFMANN, 2013). As formulações baseadas em nanotecnologia abrangem uma grande variedade de produtos para sua produção, e também uma vasta gama de compostos ativos

(herbicidas, inseticidas, acaricidas entre outros) (KAH; HOFMANN, 2013; PERLATTI et al., 2013).

Na agricultura, esses tipos de formulações podem diminuir a contaminação do meio ambiente, pois elas utilizam uma menor quantidade de ativo necessário para atingir o alvo. Apenas uma parte do princípio ativo está imediatamente disponível, sendo que sua maior quantidade está encapsulada em uma matriz inerte, com isso o defensivo agrícola é liberado lentamente, de acordo com o mecanismo específico de liberação. Portanto, além de causar perdas menores no ambiente, a formulação faz com que o princípio ativo consiga uma maior permanência no solo em níveis desejáveis, aumentando a eficiência e diminuindo a toxicidade. Esta formulações também diminuem a exposição dos trabalhadores a estes ativos e minimizam os efeitos indesejáveis a organismos não alvos (SHAVIV, 2000; MOUSAVI;REZAEI, 2011; RAI;INGLE, 2012; PERLATTI et al., 2013).

Porém o rápido desenvolvimento na investigação destes novos tipos de formulações (nanopesticidas) têm levantado questões relacionadas ao uso da nanotecnologia para a proteção de culturas agrícolas (KAH et al., 2014). Atualmente o conhecimento adquirido com as pesquisas não é suficiente para uma avaliação real sobre os benefícios e os riscos associados ao uso dos nanopesticidas. Portanto inúmeras são as pesquisas que devem ser realizadas para minimizar essa lacuna de conhecimento, como por exemplo: i) o desenvolvimento de métodos analíticos mais robustos para a quantificação e caracterização dos nanopesticidas; ii) investigações da biodisponibilidade e durabilidade; iii) aprofundamento na investigação do comportamento destas formulações no meio ambiente e iv) experimentação sob condições agrônomicas realistas (KAH; HOFMANN, 2013; KAH et al., 2014).

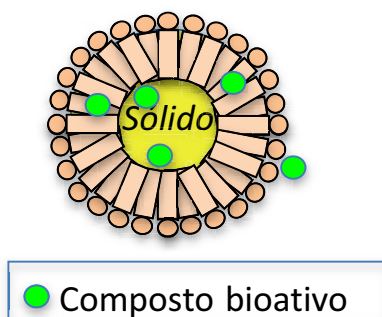
Pode-se observar na literatura, que vários tipos de carreadores têm sido desenvolvidos para a liberação modificada de defensivos agrícolas, como por exemplo, as ciclodextrinas (VILLAYERDE et al., 2006; PACIONI;VEGLIA, 2007), as argilas (MAQUEDA et al. 2008; CORNEJO et al., 2008), a sílica (BARIK et al. 2008), a lignina (GARRIDO-HERRERA et al. 2009), as micropartículas poliméricas (ELBAHRI; TAVERDET, 2007; SOPEÑA et at., 2009; SUAVE et al. 2010; GRILLO et al. 2010, WEN et al., 2010; GRILLO et al., 2011) e as nanopartículas (SILVA et al. 2010; SILVA et al., 2011, GRILLO et al. 2012), assim como revisões mostram pesquisas relacionadas a sistemas de liberação modificada utilizando ativos de

interesse agrícola (MULQUEEN, 2003; GHORMADE et al., 2011; CAMPOS; OLIVEIRA e FRACETO, 2014).

1.4 Nanopartículas lipídicas sólidas (SLN)

As nanopartículas lipídicas sólidas (Figura 4) são partículas de tamanho nanométrico, cuja matriz é composta por lipídios sólidos a temperatura ambiente (MEHNERT;MADER, 2001; MÜLLER et al., 2000), sendo suas primeiras patentes desenvolvidas por GASCO (1993) e MÜLLER & LUCKS (1996).

Figura 4: Representação esquemática de nanopartícula lipídica sólida. O composto bioativo está representado em verde, sendo que em ambos sistemas o mesmo pode estar disperso no core lipídico, interagindo com o estabilizante, ou adsorvida na superfície da nanopartícula. Os componentes da representação esquemática não estão representado em escala de tamanho.(Adaptado de Muller et al., 2000).



As SLN constituem um sistema particulado alternativo, que combina as vantagens de outros sistemas carreadores, como das nanopartículas poliméricas, a permeabilidade dos lipossomas, a biodisponibilidade das emulsões e também diminui os problemas associados a eles (MÜLLER et al., 2008; JOSHI;MÜLLER, 2009; WISSING et al., 2004). As matérias-primas das SLN são basicamente lipídio (s) sólido (s), tensoativo (s) e água. O termo lipídeo utilizado aqui inclui triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos e ceras (MEHNERT;MADER, 2001).

A boa estabilidade física, química e biológica, a excelente tolerabilidade, a boa biodegradação, a alta disponibilidade, a liberação sustentada devido a sua matriz sólida, a capacidade de prevenir a degradação química ou oxidativa do elemento encapsulado são algumas das vantagens das SLN, além de sua matriz lipídica poder ser metabolizada por diversos organismos (MÜLLER et al., 2000; MANDAWGADE et al., 2008; JOSHI e MÜLLER, 2009; SOUTO et al., 2011). As SLN tem sido utilizada extensivamente como sistemas carreadores de compostos bioativos, como fármacos (YUAN et al., 2007; NEMEM; LEMOS-SENNA, 2011; DAS; NQ; TAN, 2012; CIRRI et al., 2012; PANDEY; SHARMA; KHULLER, 2005; ZHANG et al., 2008). Porém tais vantagens não restringem as SLN apenas à área farmacêutica, mas também a aplicação em outras áreas como a agricultura, para o controle de pragas e insetos (WISSING et al., 2004; GOSWAMI et al., 2010). Para Wissing e colaboradores (2004), as principais vantagens das SLN são a fácil produção, a melhor estabilidade física e uma menor citotoxicidade comparada a outras formulações de lipossomas, o que permite a sua aplicação parentérica. Para Goswami e colaboradores (2010) essas vantagens indicam as SLN como um novo agente de defesa para antigos problemas como as pragas, sendo um excelente agente protetor para as sementes.

1.4.1 Matéria-prima utilizada para o preparo das SLN

Há descrito na literatura diversos métodos de preparo de SLN, sendo os principais métodos: homogeneização de alta pressão a quente e a frio, microemulsão, emulsificação-evaporação do solvente, nanoprecipitação, emulsificação-difusão do solvente e coacervação. Quando se pretende a encapsulação de princípios ativos, a seleção do método mais adequado depende das propriedades do ativo, como a estabilidade em temperaturas elevadas, volatilidade e principalmente a solubilidade (SOUTO et al., 2011, MÜLLER et al., 2000).

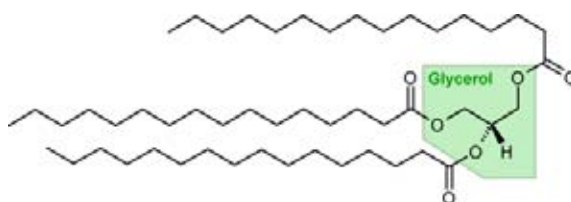
Diversos são os tipos de lipídios que podem constituir a matriz das SLN, incluem-se os acilgliceróis, ceramidas, ácidos e álcoois graxos, que são

fisiologicamente compatíveis e participam no metabolismo natural dos lipídeos no organismo, sendo que mesmo com concentrações de 5 a 30 % apresentam baixa toxicidade (SEVERINO et al., 2012, SOUTO;MÜLLER, 2005). Contudo, além dos lipídios também é necessário o uso de agentes tensoativos para reduzir a tensão interfacial e evitar a deposição e agregação das nanopartículas dispersas na fase aquosa, sendo que geralmente as SLN são compostas por 0.1 a 30% (m/m) de lipídeo sólido e estabilizadas por 0.5 a 5% (m/m) (PARDEIKE et al., 2009).

1.4.1.1 Tripalmitato de glicerol

O tripalmitato de glicerol (1,2,3-trihexadecanoil-sn-glicerol) é pertencente à classe dos triacilgliceróis simples, os quais são produtos resultantes da esterificação entre o glicerol e ácidos graxos, sendo essas substâncias hidrofóbicas, ou seja, insolúveis em água, porém solúveis em solventes orgânicos. Os triacilgliceróis possuem diferentes ácidos graxos em sua estrutura, representando por R, R' e R'', sendo que estes também podem ser iguais, porém dependendo da posição destes ácidos graxos na unidade de glicerol eles recebem nomes diferentes. A tripalmitina (Figura 5) assim como a triestearina é sólida em temperatura ambiente (MORETTO et al., 1998; PAQUES;MACEDO, 2006).

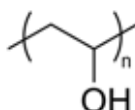
Figura 5: Estrutura química do lipídio Tripalmitina. Em destaque encontra-se representado o grupamento glicerol ao qual encontram-se ligados os ácidos graxos saturados.



1.4.1.2 Poli (Álcool Vinílico)

O Poli (álcool vinílico) ou PVA (Figura 6) é um polímero produzido pela polimerização do acetato de vinila seguido de reação de hidrólise do poli (acetato de vinila) em poli (álcool vinílico), sendo que após a reação de hidrólise o copolímero final exibe um percentual de hidroxilas em comparação ao número total de radicais de ácidos acéticos representando o grau de hidrólise (GH) do polímero. O GH é um parâmetro importante, pois um aumento dele resulta na redução da solubilidade em água juntamente com o aumento na adesão em superfícies hidrofílicas e na viscosidade (ARANHA;LUCAS, 2001; COSTA;MANSUR, 2008).O PVA é um dos poucos polímeros semicristalinos que é solúvel em água, sendo que possui inúmeras aplicações como: em fibras, adesivos e emulsificantes, como carregador de medicamentos, em aplicações na indústria têxtil, possuindo ótima propriedade como protetor de colóides e na obtenção de membranas anfifílicas para imobilização de enzimas e na engenharia de tecidos, principalmente como plastificante (MARTINELLI et al., 2006).

Figura 6: Representação esquemática da estrutura monomérica do álcool polivinílico. O índice n representa o número de unidades monoméricas que forma o polímero, podendo variar de acordo com o tamanho da cadeia polimérica.



1.5 Caracterização de Nanopartículas

1.5.1 Espectroscopia de correlação de fótons

Inúmeras são as técnicas disponíveis para medir a distribuição de tamanho bem como o índice de polidispersão de nanopartículas. Dentre as técnicas mais

utilizadas, destaca-se a espectroscopia de correlação de fótons (ECF), também conhecida como Dynamic Light Scattering (Dispersão de luz dinâmica). Esta técnica baseia-se na interação das partículas com um feixe de luz, este feixe é incidido na amostra causando então um movimento aleatório das partículas (movimento Browniano), as quais dispersam luz em todas as direções, isto ocorre devido ao tamanho pequeno das partículas em comparação com o feixe de luz, sendo que quanto menor a partícula mais rápido será o seu movimento browniano. Como geralmente as suspensões coloidais estão em solução, através da equação (equação 1) de Stokes-Einstein consegue-se correlacionar o coeficiente de difusão com o raio hidrodinâmico das partículas.

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H} \quad (1)$$

onde η é a viscosidade da amostra, k_B é a constante de Boltzmann, T é temperatura absoluta, R_H o raio hidrodinâmico e D o coeficiente de difusão (GUTERRES et al., 2010; LI et al., 2014).

1.5.2 Potencial Zeta

Todo material particulado quando em contato com um líquido adquire uma carga elétrica em sua superfície, sendo que esta carga pode ser pela adsorção de íons da solução na superfície da partícula (GREENWOOD, 2003). O potencial zeta é um parâmetro que indica a carga de superfície, sendo um importante indicador para prever e controlar a estabilidade de suspensões ou emulsões coloidais sendo que quanto maior for o potencial zeta, mais provável que a suspensão seja estável, pois as partículas carregadas se repelem e esta força é maior do que a tendência natural à agregação. Geralmente, partículas com potencial zeta ($\pm$) 30 mV são consideradas estáveis (SCHAFFAZICK et al., 2003). A técnica de espalhamento de luz de eletroforese é amplamente empregada para a determinação do potencial zeta de formulações de nanopartículas, sendo que essa suspensão coloidal é diluída em uma célula contendo eletrodos onde é aplicado um potencial elétrico,

ocasionando a migração das partículas com carga elétrica líquida para o eletrodo de carga contrária, e esta velocidade de migração é proporcional à carga elétrica e também do campo elétrico aplicado (XU, 2008).

1.5.3 Espectroscopia de Infravermelho

A espectroscopia de absorção no infravermelho utiliza a região do infravermelho do espectro eletromagnético, onde podemos observar bandas vibracionais e rotacionais. A técnica baseia-se na capacidade das ligações químicas das substâncias, as quais possuem frequências de vibrações específicas devido à geometria molecular e o arranjo das moléculas, em absorver energia em um determinado comprimento de onda, portanto quando uma radiação com energia correspondente a essas vibrações é absorvida, as moléculas podem alterar os seus estados de vibração, e a diferença de energia entre o estado inicial e o estado excitado é detectada pelo espectrômetro. Assim, através de comparação dos valores de energia da radiação, é possível identificar as moléculas ou tipos de moléculas presentes nas amostras (SOLOMONS;FRYHLE, 2001; SKOOG et al., 2002). Com o avanço da espectroscopia de infravermelho e dos espectrômetros, variações foram surgindo, como é o caso da espectroscopia de absorção do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR). Essa técnica consegue colher o espectro infravermelho mais rapidamente. A principal diferença está na utilização de um interferômetro Michelson, ao invés de um monocromador, após passar pela amostra o sinal medido é o interferograma. A informação do interferograma é decodificada pelo cálculo matemático da Transformada de Fourier, através de um microprocessador acoplado ao espectrofotômetro, permitindo obter a distribuição da energia absorvida pela amostra ou pelo espectro da amostra por cada comprimento de onda (ATKINS; JONES, 2012).

1.5.4 Calorimetria Diferencial exploratória (CDE)

Dentro dos métodos térmicos, a calorimetria diferencial exploratória (CDE) é uma importante técnica de caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas, pois fornece informações sobre a cristalinidade das mesmas. O grau de cristalinidade de uma partícula é de extrema importância, pois influencia diretamente na eficiência de encapsulação, na velocidade de liberação do ativo e também na expulsão do ativo durante a estocagem. A técnica analisa a variação de energia (entalpia) de uma substância ou composto em relação a um material de referência, dentre os eventos analisados temos processos endotérmicos, exotérmicos, transição vítrea, polimorfismo entre outros (BERNAL et al., 2002; READING e CRAIG, 2006; MARCATO, 2009). Existem dois tipos principais de CDE, a de compensação de potência, onde o material analisado e o de referência são aquecidos em compartimentos separados e em iguais condições, apresentando uma curva exotérmica descendente, e a de fluxo de calor, onde a substância e o material de referência são colocados sobre o disco termoelétrico e são aquecidos pela mesma fonte de calor, onde temos uma curva exotérmica ascendente (READING e CRAIG, 2006).

1.5.5 Rastreamento de Nanopartículas

A técnica de rastreamento de nanopartículas, também conhecida como Nanoparticle tracking analysis (NTA), é utilizada para medir a distribuição de tamanho de nanopartículas em suspensões. Ela é muito semelhante à técnica de espectroscopia de correlação de fótons. NTA pode determinar o diâmetro hidrodinâmico das partículas de forma individual, através da equação de Stokes - Einstein (Equação 1) medindo diretamente os seus coeficientes de difusão quando elas estão em movimento Browniano. As nanopartículas são visualizadas através de um microscópio ligado a um software que possui uma fonte de luz de laser que

incide em um célula contendo as suspensões de nanopartículas, causando o espalhamento de luz. O software consegue rastrear simultaneamente inúmeras partículas, quando esta saem e entram no plano de foco. A grande vantagem da técnica de NTA em relação a DLS está na capacidade de detectar partículas individuais, não sofrendo interferência da intensidade de luz de partículas maiores e com isso consegue mensurar a concentração de partículas em uma suspensão (BOYD et al., 2011; FILIPE et al., 2010; GILLESPIE et al., 2011).

1.5.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão

A técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET) é comumente utilizada para a análise da morfologia dos carreadores, assim como avaliar o seu tamanho e a distribuição de tamanho das partículas (SCHAFFAZICK et al., 2003). Basicamente o princípio da técnica consiste na emissão de um feixe de elétrons por um filamento de tungstênio, concentrado, controlado e reduzido por sistemas de lentes eletromagnéticas, diafragmas e bobinas, este feixe de elétrons incide sobre a amostra que esta reticulada com cobre, ouro ou carbono, provocando uma série de emissões de sinais, que se forma pela interação dos elétrons com a amostra, estes sinais emitidos geralmente são elétrons e fótons, os quais são direcionados a detectores específicos para cada tipo de sinal (ATKINS; JONES, 2012).

2. OBJETIVOS

2.1 Gerais

Este trabalho teve como principal objetivo preparar e caracterizar nanopartículas lipídicas sólidas para veiculação conjunta dos herbicidas atrazina e simazina, a fim de obter uma alternativa para as formulações convencionais, diminuindo os impactos causados por esses herbicidas à saúde humana e ao meio-ambiente.

2.2 Específicos

- Obtenção de condições analíticas para quantificação dos herbicidas atrazina e simazina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Preparação das nanopartículas lipídicas sólidas através do método de emulsificação-evaporação do solvente;
- Caracterização por medidas de tamanho e potencial zeta (espectroscopia de correlação de fótons e microeletroforese), eficiência de encapsulação (cromatografia líquida de alta eficiência), interação entre herbicida/nanopartícula (espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier – FTIR, calorimetria diferencial exploratória - CDE), tamanho e morfologia das partículas (microscopia eletrônica de transmissão – MET e rastreamento de nanopartículas - NTA).
- Avaliação da estabilidade físico-química das formulações em função do tempo;
- Determinação da cinética de liberação dos herbicidas na presença e na ausência das nanopartículas e aplicação de modelos matemáticos para elucidar o mecanismo de liberação.
- Avaliação da citotoxicidade através do teste de redução do MTT.
- Avaliar a atividade herbicida das formulações e o efeito da presença das nanopartículas lipídicas sólidas através de ensaios com organismos alvo (*Raphanus raphanistrum*) e não-alvo (*Zea Mays*).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais

- Atrazina (grau de pureza 95%) - Pestanal®
- Simazina (grau de pureza 95%) - Pestanal®
- Gliceril Tripalmitato (grau de pureza 85%) - Sigma®
- Poli (vinil álcool) – (PVA) - Sigma®
- Clorofórmio (grau espectroscópico analítico) - Merck®
- Acetonitrila (grau HPLC) – JT Baker®
- Dispositivos de ultrafiltração de celulose regenerada de 30 kDa- Millipore®
- Agitador magnético - Tecnal®
- Microcentrífuga - MiniStar®
- Evaporador rotativo AL 390 - American Lab®
- Bomba à vácuo A12 - Symbol®
- Substrato - Hortaliças Mix®
- Analisador de partículas Zetasizer Nano ZS 90 – Malvern®
- Microscopia de Transmissão - Zeiss LEO® 906
- DSC Q20 - TA Instruments®
- Espectrofotômetro de FI-IR 660, Varian® Inc.
- Analisador de partículas NanoSight LM10 - Malvern®
- Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - Varian® Pro Star
 - Bomba PS 210 solvent delivery module - Varian®
 - Detector UV-Vis PS 210 - Varian®
 - Coluna cromatográfica Varian® C18 fase reversa, 5µ 110A, 250x4,60mm
 - Injetor manual
 - Software Galaxie Workstation

3.2 Desenvolvimento da metodologia analítica de quantificação dos herbicidas

A quantificação dos herbicidas atrazina e simazina foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando-se um equipamento da Varian® Pro Star.

3.2.1 Condições cromatográficas

As condições cromatográficas foram ajustadas, para a obtenção de um pico simétrico e um tempo menor de corrida. Os parâmetros foram ajustados a partir de trabalho prévio (GRILO et al., 2012), e estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Condições cromatográficas ajustadas para a quantificação dos herbicidas nas nanopartículas lipídicas sólidas.

Amostra	Atrazina e Simazina
Fase Móvel	Acetonitrila/água (50/50) (v/v)
Volume de Injeção	100 µL
Fluxo	0,8 mL/min
Temperatura	Ambiente (25°C)
Detector	Ultravioleta (UV), $\lambda = 225$ nm
Coluna Cromatográfica	Phenomenex, Gemini 5µ C ₁₈ 110A, 250 x 4,60mm

3.2.2 *Obtenção de condições analíticas para quantificação dos herbicidas*

A obtenção de condições analíticas, por meio de estudos experimentais, garante que o método atenda as exigências das aplicações analíticas, assegurando confiabilidade dos resultados. Desta forma, a metodologia analítica deve satisfazer critérios instituídos por entidades reguladoras, permitindo que os resultados analíticos sejam interpretados corretamente (BRITO et al., 2003). Entre os requisitos exigidos temos: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, o limite de quantificação (LQ) e o limite de detecção (LD) (BRASIL, 2003).

A metodologia analítica para quantificação dos herbicidas foi obtida segundo os documentos do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO, 2011) e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003).

3.2.2.1 *Construção da curva analítica*

Soluções estoques dos herbicidas (ATZ e SMZ) nas concentrações de 1 µg/mL a 5 µg/mL foram preparadas em triplicatas para cada concentração e analisadas por CLAE de acordo com as condições cromatográficas citadas na tabela 1. Após a determinação da área do pico de cada herbicida, foi construído um gráfico de área do pico cromatográfico em função da concentração do herbicida. A partir da regressão linear destes dados, foi construída a curva analítica para os herbicidas. As curvas analíticas foram realizadas em três dias consecutivos em triplicata para cada ponto, e a média entre os pontos foi utilizada como padrão para a análise quantitativa dos herbicidas (n=9). O software Origen 7.0® foi utilizado para produção dos gráficos.

3.2.3.2 Seletividade

Sabe-se que a amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição como impurezas, produtos de degradação, excipientes, metabólitos, ou outros componentes da amostra. Estes interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, que também é dependente da concentração. A seletividade e/ou especificidade é um parâmetro que avalia a capacidade de um método analítico em determinar e discriminar o analito na presença desses interferentes (BRASIL, 2003; INMETRO,2011).

A especificidade do método analítico para quantificação dos herbicidas foi avaliada a partir de injeções do composto utilizado para o preparo das SLN sem adição dos herbicidas.

3.2.3.3 Linearidade

A linearidade é um parâmetro que indica se o resultado do ensaio obtido é diretamente proporcional a concentração do analito na amostra. Estas análises são realizadas em um intervalo de no mínimo cinco diferentes concentrações. O coeficiente de correlação (r) é um parâmetro que indica a qualidade da curva, e ele é dado pela equação matemática, que avalia a razão entre a área dos picos dos padrões com as concentrações dos padrões. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser $= 0,99$ (BRITO et al., 2003; BRASIL, 2003; INMETRO,2011).

A linearidade do método foi determinada a partir de das curvas analíticas realizadas em três dias consecutivos, sendo um total de três curvas com seis concentrações compreendidas entre 1 e 5 $\mu\text{g/mL}$ de atrazina e simazina diluída em água.

3.2.3.4 Precisão

A precisão é um parâmetro que reflete a variação dos resultados quando as análises repetidas são realizadas na mesma amostra, indicando a dispersão dos resultados obtidos em torno do valor real, numa série de medições. A precisão pode ser avaliada segundo a repetibilidade (precisão intra-corrida) que expressa a precisão de uma sequência analítica em um curto período de tempo, com o mesmo analista e a mesma instrumentação. A reprodutividade (precisão inter-corridas) reflete a precisão em dias diferentes, podendo ser realizada por diferentes analistas, instrumentação e reagentes (BRITO et al., 2003; BRASIL, 2003; INMETRO, 2011).

A precisão de um método analítico pode ser expresso como desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas. A precisão foi avaliada a partir do cálculo de desvio padrão e desvio padrão relativo (DPR) (Equação 2).

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (2)$$

onde DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada. O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5% (BRASIL, 2003).

3.2.3.5 Limite de Detecção e Quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) são essenciais para estabelecer a capacidade analítica na determinação qualitativa e quantitativa de substâncias químicas em uma determinada matriz, o LD é definido como a menor quantidade de substância que pode ser detectada numa amostra, mas não necessariamente quantificada como valor exato, já o LQ é definido como a menor

concentração do analito que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis.

A estimativa do limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram realizadas a partir de dados obtidos com as regressões lineares das curvas analíticas aplicados às Equações 3 e 4, respectivamente (BRITO et al., 2003; BRASIL,2003;INMETRO,2011).

$$LD = \frac{DP \times 3}{IC} \quad (3)$$

$$LQ = \frac{DP \times 10}{IC} \quad (4)$$

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

3.2.3.6 Exatidão

A exatidão é um parâmetro que avalia a concordância entre o valor real do analito na amostra e o valor estimado pelo processo analítico. Na análise de pesticidas, por exemplo, a exatidão é estudada através de ensaios de recuperação (BRITO et al., 2003). A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de três concentrações (baixa, média e alta) com três réplicas cada, as quais se encontram dentro do intervalo linear da curva analítica. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, segundo a Equação 5 (BRASIL, 2003).

$$Exatidão = \frac{CMD}{CT} \times 100 \quad (5)$$

onde, CT é a concentração teórica e a CMD é a concentração média determinada.

3.3 Preparo de nanopartículas lipídicas sólidas contendo os herbicidas ATZ e SMZ

As nanopartículas lipídicas sólidas contendo os herbicidas ATZ e SMZ foram preparadas segundo o método de emulsificação evaporação do solvente (VITORINO et al., 2011).

Foram preparadas formulações de nanopartículas lipídicas sólidas contendo os herbicidas (ATZ e SMZ) separadamente e conjuntamente na concentração de (0,5 mg/mL). Inicialmente, uma solução aquosa de PVA (1,25%) foi preparada e mantida sob agitação (100 rpm). A solução de tripalmitina (250 mg) contendo ATZ (2,5 mg) e SMZ (2,5 mg) foi preparada por dissolução em clorofórmio (5 mL). A solução de clorofórmio foi então vertida na solução de aquosa de PVA. A solução resultante foi submetida à sonicação (40 W de potência) durante 5 minutos formando uma pré-emulsão. A pré-emulsão foi agitada vigorosamente (14.000 rpm) em ultraturrax por 7 minutos. O solvente orgânico foi eliminado com o auxílio de um evaporador rotativo. A concentração final de cada herbicida na formulação foi de 0,5 mg/mL.

3.4 Estabilidade Físico-Química

Para avaliar a estabilidade das formulações de nanopartículas lipídicas sólidas, foram determinados o tamanho (diâmetro hidrodinâmico), polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulação em função do tempo (zero, 15, 30, 60, 90 e 120 dias), realizando comparações entre as SLN na ausência e presença dos herbicidas.

3.4.1 Eficiência de Encapsulação de ATZ e SMZ nas SLN

Para a determinação da quantidade de herbicida encapsulado nas nanopartículas, foi utilizado o método de ultrafiltração-centrifugação. A suspensão coloidal de nanopartículas lipídicas sólidas foi centrifugada em dispositivos de ultrafiltração contendo membrana de celulose com 10 kDa (Microcon – Millipore®). A quantificação dos herbicidas presentes no ultrafiltrado foi realizada por CLAE. O princípio da técnica consiste em que apenas o ativo livre consegue atravessar a membrana de celulose. Portanto, pela diferença entre a quantidade de herbicida utilizada (100%) e a quantidade não associada às nanopartículas consegue-se determinar a quantidade de herbicida encapsulado nas nanopartículas.

Foi utilizado para os cálculos de eficiência de encapsulação, o total (100%) teórico de herbicidas presentes nas nanopartículas lipídicas sólidas, ou seja, a concentração final de herbicida nas partículas (0,5 mg/mL).

3.4.2 Diâmetro hidrodinâmico e polidispersão

A técnica de espectroscopia de correlação de fótons foi utilizada para determinar o diâmetro médio das partículas, e a sua distribuição de tamanho (polidispersão). Para determinação do diâmetro hidrodinâmico e da polidispersão, foi realizada diluição de 100 vezes em água deionizada das SLN, e através de um analisador de partículas Malvern ZS90 (Malvern®) a um ângulo fixo de 90° e temperatura de 25°C, foram feitas as medidas. Os resultados foram expressos como média da triplicata de medidas de uma mesma formulação.

3.4.3 Potencial Zeta

Para a determinação do potencial zeta das SLN, foi utilizado um analisador de potencial zeta, ZetaSizer Nano ZS 90 (Malvern®), sendo que para ser realizada as análises diluíram-se em cem vezes as suspensões com água deionizada, e os resultados foram expressos em mV como a média de três determinações.

3.4.4 Análise do pH e quantificação de ácidos graxos livres

Monitorar o pH de suspensões coloidais em função do tempo traz informações relevantes para indicar a estabilidade química dos componentes da formulação. Variações no pH das formulações podem indicar alterações nestes componentes que podem ser devido à hidrólise química de grupos funcionais presentes nos componentes da formulação. Desta forma, a quantificação da concentração de ácidos graxos livres foi realizada a fim de determinar a hidrólise do lipídio (tripalmitina) (SCHAFFAZICK et al., 2003).

O pH das suspensões das nanopartículas lipídicas sólidas foi medido no decorrer de 120 dias e utilizou-se um pHmetro (Tecnal®) previamente calibrado com soluções tampão em pH 7,0 e 4,0. A quantificação de ácidos graxos livres foi realizada a partir do kit de determinação calorimétrica EnzyChrom™ (BioAssay Systems®) no tempo inicial de preparo e após 180 dias de armazenamento.

As amostras foram previamente homogeneizadas com 5 % de isopropanol e 5 % de Triton X-100 em água e filtradas (filtros de 0,45 µm). As amostras (10 µL) foram transferidas para placas de 96 poços e posteriormente adicionou-se 90µL da mistura de reagentes enzimáticos. A placa foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente para que ocorresse a reação colorimétrica. Através desta reação, os ácidos graxos livres são convertidos enzimaticamente à Acetil-CoA e subsequentemente a H₂O₂. O peróxido de hidrogênio resultante reage com o corante específico, colorindo as amostras as quais foram analisadas em densidade

ótica de 570 nm. Para as análises os parâmetros analíticos obtidos foram:

Absorbância = $0,0006101 \times [\text{ácidos graxos livres}] + 0,06346$, $r^2 = 0,9940$.

3.5 Espectroscopia de Infravermelho

As análises de infravermelho foram realizadas com a finalidade de investigar a presença dos herbicidas triazínicos nas nanopartículas lipídicas sólidas, bem como identificar os principais grupos funcionais presente nos componentes das formulações. Os experimentos foram realizados em um espectrofotômetro de FI-IR 660 Varian® em uma faixa de número de onda de 400 a 4000 cm^{-1} , utilizando 32 varreduras por amostra com resolução de 8 cm^{-1} . As amostras dos herbicidas (ATZ, SMZ), da tripalmitina, e as SLN sem e contendo os herbicidas, assim como a mistura física entre os componentes foram analisadas utilizando o acessório de reflectância total atenuada (ATR), o qual permite a análise de compostos em pó, em pastas e aqueles que não podem ser analisados em forma de pastilhas ou filmes.

3.6 Calorimetria Diferencial Exploratória (CDE)

As análises das matérias-primas, da mistura física e da nanopartículas foram realizadas utilizando o DSC Q20 TA Instruments®. As amostras continham massa entre 2-10mg, as quais foram pesadas em balança analítica e colocadas em cadinhos de alumínio selados com tampa. Como referência utilizou-se um cadinho com tampa, porém vazio. Os termogramas foram obtidos em atmosfera de nitrogênio (50mL/minuto). O programa térmico contemplou uma rampa de aquecimento dos 5 aos 250°C, com uma taxa de 10°C por minuto.

3.7 Rastreamento de Nanopartículas

Para as análises de rastreamento de nanopartículas, os dados foram coletados por meio de uma célula NanoSight LM 10 (laser verde, 532 nm) e uma câmera sCMOS usando software NanoSight (versão 2.3). Para garantir a não contaminação das amostras, medições da água deionizada foram realizadas. As suspensões de SLN foram diluídas 11000 vezes, sendo feitas análises em triplicata para cada amostra. Para garantir que diferentes partículas fossem analisadas, para cada réplica, 1 mL de suspensão da amostra foi injetada na célula volumétrica, com o intuito de deslocar o conteúdo medido anteriormente. Cada repetição foi constituída de cinco medições com aproximadamente 2000 partículas contadas em cada análise. Foram obtidos com resultado final, a distribuição de tamanho das partículas em função da concentração, as quais foram expressas com o desvio padrão (ANDERSON et al., 2013).

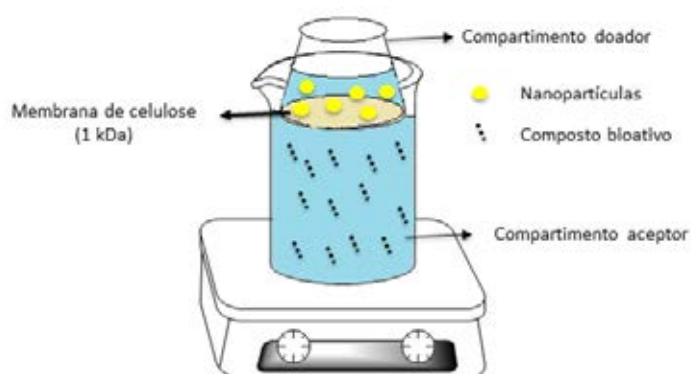
3.8 Microscopia Eletrônica de Transmissão

A morfologia das SLN foi verificada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (Zeiss-LEO 906) de acordo com o método previamente descrito (JOREZ et al., 2004). Uma pequena alíquota da suspensão de nanopartículas foi colocado em grades de cobre de 200 malhas por 15 min. Uma solução de acetato de uranila à 2% foi utilizada como contraste, sendo esta gotejada sobre a grades e posterior remoção do excesso utilizando um papel. Após o preparo das amostras, as mesmas foram analisadas no microscópio a uma voltagem de 80 kV.

3.9 Cinética de Liberação da ATZ e SMZ das SLN

Com o intuito de avaliar o perfil de liberação dos herbicidas através das SLN, foram realizados experimentos de cinética de liberação sendo utilizado para isso um sistema de dois compartimentos (Figura 7).

Figura 7: Representação esquemática do sistema utilizado para realização do ensaio de liberação. O sistema utilizado consiste em um sistema doador, onde é adicionada a formulação contendo herbicidas e um sistema acceptor que encontra-se em condição de diluição sink. Os dois sistemas são separados por uma membrana de celulose regenerada (Spectrapore) com um poro de exclusão molecular de 1 kDa. Durante o ensaio, alíquotas são retiradas do compartimento acceptor e quantificadas por CLAE.



Nesse sistema, foi utilizada uma membrana de celulose (Spectrapore, com poro para exclusão molecular de 1 kDa.) que separa o compartimento doador do acceptor. Foram adicionados no compartimento doador 2mL da formulação ou do ativo. O compartimento acceptor foi preparado a partir de uma solução aquosa contendo Tween 20® a 5%. Este sistema foi mantido sob agitação (PAAVOLA et al., 1995). Foram coletadas alíquotas de 1 mL em intervalos de 15, 30, 60 minutos durante as sete primeiras horas, e depois duas alíquotas por dia até um tempo máximo de 4 dias. As alíquotas coletadas foram quantificadas por CLAE sendo convertidas em % de herbicida liberado. Os ensaios foram realizados em triplicata.

A partir dos ensaios de liberação, foram calculados os valores de fluxo aparente (J_{app}), o qual foi determinando de acordo com a primeira lei de Fick (Equação 6), a partir do declive da parte linear do gráfico dos valores.

$$M_t = M_0 - SJ \cdot t \quad (6)$$

,onde M_t é a quantidade cumulativa de ativo liberada através da área da membrana S em função de tempo t , considerando a quantidade total de ativo M_0 (FIEL et al., 2014).

3.10 Modelagem Matemática

A modelagem matemática da liberação de princípios ativos permite obter inúmeras informações a respeito dos processos químicos e de transporte envolvidos nestes sistemas de liberação. (COSTA; LOBO, 2001). O mecanismo de liberação de um ativo pode ser influenciado por diversos fatores como o tipo do ativo, solubilidade, tamanho das partículas, polimorfismo do ativo entre outros. Dentre os principais modelos matemáticos empregados em sistema de liberação temos: as equações de ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Hixson-Crowell e Korsmeyer-Peppas (COSTA; LOBO, 2001; CRUZ et al., 2006).

O modelo semi-empírico de Korsmeyer Peppas (Equação 7), chamado também de Lei de Potência, foi aplicado para elucidar o tipo de mecanismo com que os herbicidas são liberados das nanopartículas lipídicas (SOPPIMATH, 2001; COLOMBO et al., 2005).

$$M_t/M_\infty = kt^n \quad (7)$$

,onde M_t é a quantidade de ativo liberado em um determinado tempo t , M_∞ é a quantidade de herbicida liberada num tempo infinito, representando a liberação fracional do ativo, k é a constante cinética de liberação e n é o expoente de liberação. O valor de n é utilizado para caracterizar o tipo do mecanismo de liberação. Para processo de difusão fickiniana, o valor de n é 0,5. Quando o valor de n é 1,0, o mecanismo de liberação corresponde a um modelo não-fickiniano do tipo Caso II. Para valores de n entre 0,5 e 1,0, o modelo de liberação do ativo é classificado como não-fickiniano do tipo transporte anômalo (KORSMEYER et al.,

1983; PEPPAS, 1985; PEPPAS; SAHLIN, 1989; KORSMEYER; PEPPAS, 1991; SIEPMANN;PEPPAS, 2001).

3.11 Avaliação da citotoxicidade através do ensaio de MTT

Os ensaios foram realizados em células da linhagem 3T3 (fibroblastos de camundongos Balb-c 3T3), mantidas em cultura contínua em meio de cultura DMEM suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 100 UI/mL de penicilina e 100 µL de sulfato de estreptomicina, pH 7,4, 37 °C, sob atmosfera úmida com 5 % de CO₂. O plaqueamento foi realizado inoculando-se 1x10⁴ células viáveis em placas de 96 cavidades, incubadas por 48 h, até atingirem a semiconfluência. As células foram então expostas durante 24 h à formulação comercial, a formulação de nanopartículas lipídicas sólidas e as nanopartículas contendo os herbicidas, em concentrações variando na faixa de 0 µg/mL a 62,5 µg/mL. A viabilidade celular foi determinada através do teste de redução do 3(4-5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio (MTT). As células foram incubadas com MTT (0,5 mg/mL) por 3 h a 37 °C. O número de células viáveis foi determinada através da medição da quantidade de MTT reduzido a formazan (composto purpura) pelas desidrogenases mitocondriais. Os cristais de formazan formados foram dissolvidos em etanol, com agitação durante 30 min a temperatura ambiente. A absorbância (A) da solução em cada cavidade foi medida em leitor de placas (Labsystems Multiskan MS) em 570 nm e, calculou-se a porcentagem de células viáveis (DE LIMA et al., 2010; DE LIMA et al., 2012).

3.12 Ensaio de Atividade Herbicida

Os ensaios de atividade herbicida foram realizados com modificações do método descrito por PEREIRA et al., 2014, sendo a espécie-alvo *Raphanus*

raphanistrum (Nabo) e a espécie não-alvo *Zea mays* (milho) submetidas a tratamentos pré e pós emergência.

3.12.1 Tratamento Pré-emergência

Tubetes de 17 cm de altura, com um diâmetro superior de 5,2 cm foram completamente preenchidos com substrato vegetal (Hortaliças Mix®). Foram plantados em cada tubete uma semente da espécie-alvo ou da espécie não alvo (ISLA sementes®), sendo os ensaios realizados em triplicata de duplicata para cada tratamento. Após o plantio das sementes as formulações foram aplicadas no substrato utilizando borrifadores spray de 5mL. Para a formulação comercial (Primatop® - Syngenta) e para as SLN contendo os herbicidas utilizou-se a concentração recomendada de princípio ativo (3 kg/ha). As SLN na ausência dos herbicidas foram aplicadas na mesma quantidade a fim de investigar quaisquer possíveis efeitos sobre as plantas, assim como também foi realizado um controle com apenas água para comparação. Com o intuito de investigar a efetividade das formulações, estas foram diluídas em uma proporção 1:10 (v/v) e aplicadas seguindo as descrições acima. Os tubetes foram acondicionados em viveiro de plantas com sombrite 50 %, sendo irrigados duas vezes ao dia (manhã e a tarde). Após 13 dias de cultivo (em condições ambientes), as plantas foram coletadas, lavadas, e a massa fresca da parte aérea e da raiz mensuradas. Os valores foram expressos em média e desvio padrão da massa (g), sendo aplicada análise estatística de variância (ANOVA) com o teste de Tukey-Kramer através do software GraphPad Prism v.6®.

3.12.2 Tratamento Pós-emergência

Tubetes de 17 cm de altura, com um diâmetro superior de 5,2 cm foram completamente preenchidos com substrato vegetal (Hortaliças Mix®). Foram plantados em cada tubete uma semente da espécie-alvo ou da não-alvo (ISLA sementes®), sendo os ensaios realizados em triplicata de duplicata para cada tratamento.. Após 7 dias de plantio das sementes as formulações foram aplicadas de forma foliar utilizando borrifadores spray de 5 mL. Para a formulação comercial (Primatop® - Syngenta) e para as SLN contendo os herbicidas utilizou-se a concentração recomendada de princípio ativo (3 kg/ha), as SLN na ausência dos herbicidas foram aplicadas na mesma quantidade a fim de investigar quaisquer possíveis efeitos sobre as plantas, assim como também foi realizado um controle com apenas água para comparação. Com o intuito de investigar a efetividade das formulações, estas foram diluídas em uma proporção 1:10 (v/v) e aplicadas seguindo as descrições acima. Os tubetes foram acondicionados em viveiro de plantas com sombrite 50 %, sendo irrigados de manhã e a tarde. Após 7 dias de cultivo (em condições ambiente), as plantas foram coletadas, lavadas, e a massa fresca da parte aérea e da raiz foi mensurada. Os valores foram expressos em média e desvio padrão da massa (g), sendo aplicada análise estatística de variância (ANOVA) com o teste de Tukey-Kramer através do software GraphPad Prism v.6®.

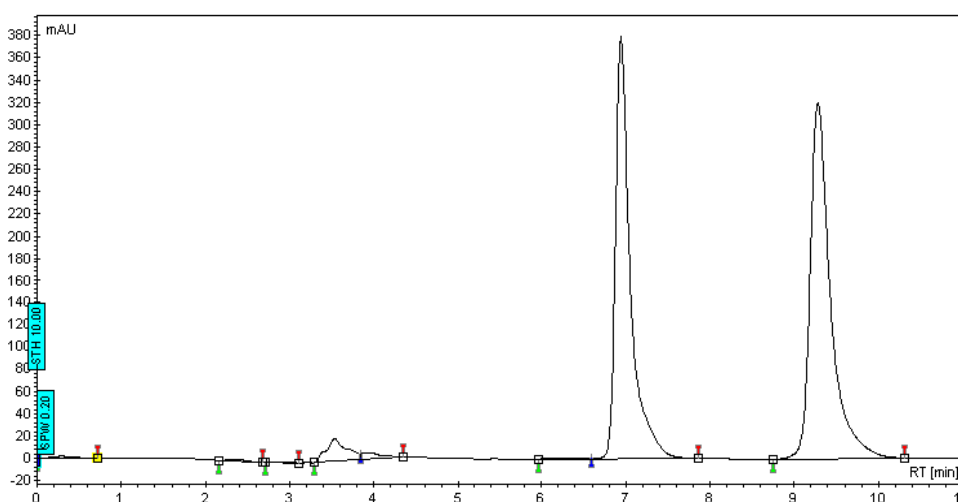
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção da metodologia analítica para quantificação dos herbicidas.

4.1.1 Aquisição dos cromatogramas para os herbicidas

As soluções de herbicidas foram injetadas em CLAE seguindo as condições cromatográficas descritas na tabela 1, com o intuito de obter picos simétricos e baixo tempo de retenção. A Figura 8 mostra o cromatograma dos herbicidas atrazina e simazina. Pode-se observar picos simétricos para os dois herbicidas, e a separação dos mesmos em uma única corrida cromatográfica de 12 minutos, tendo a simazina um tempo de retenção de aproximadamente 7 minutos e a atrazina de 9 minutos. A especificidade do método também é demonstrada, pois picos correspondentes a componentes da fase móvel não co-eluíram com os picos dos herbicidas. Portanto, as condições cromatográficas foram consideradas adequadas para a realização de futuras análises e obtenção de uma metodologia analítica.

Figura 8: Cromatograma dos herbicidas ATZ e SMZ obtido sob condições cromatográficas descritas na tabela 1. O cromatograma apresenta dois picos sendo o da ATZ em 9 min e o da SMZ em 6,8 min.



4.1.2 Construção das curvas de calibração e adequação da metodologia analítica

Todo método analítico precisa atender a normas e condições descritas por órgãos reguladores, para que possa reproduzir dados confiáveis. Dentre as condições necessárias, está a construção de curvas de calibração analítica, as quais mostram a resposta do método analítico frente a concentrações conhecidas de um analito (INMETRO, 2011). A figura 9 exibe a média de três curvas analíticas realizadas com concentrações entre 1 e 5 µg/mL para os herbicidas ATZ e SMZ, juntamente com os parâmetros obtidos com a regressão linear da curva analítica. Na tabela 3 são apresentados os coeficientes de correlação (r) para cada curva analítica preparada para ambos herbicidas. Podemos observar a linearidade do método através do coeficiente de correlação da curva analítica média. Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva, sendo que quanto mais próximo de 1, menor é a dispersão do conjunto de pontos experimentais. A ANVISA e o INMETRO recomendam um coeficiente de correlação maior ou igual a 0,99. O valor obtido para a atrazina foi de 0,99983 e para a simazina de 0,99971, demonstrando a linearidade do método, pois os coeficientes são maiores do que o preconizado pelos órgãos reguladores (BRASIL, 2003; INMETRO, 2011)

Figura 9: Curva analítica obtida para os herbicidas. A) atrazina e B) simazina. Valores representam a média de três experimentos realizados em triplicata (n=9).

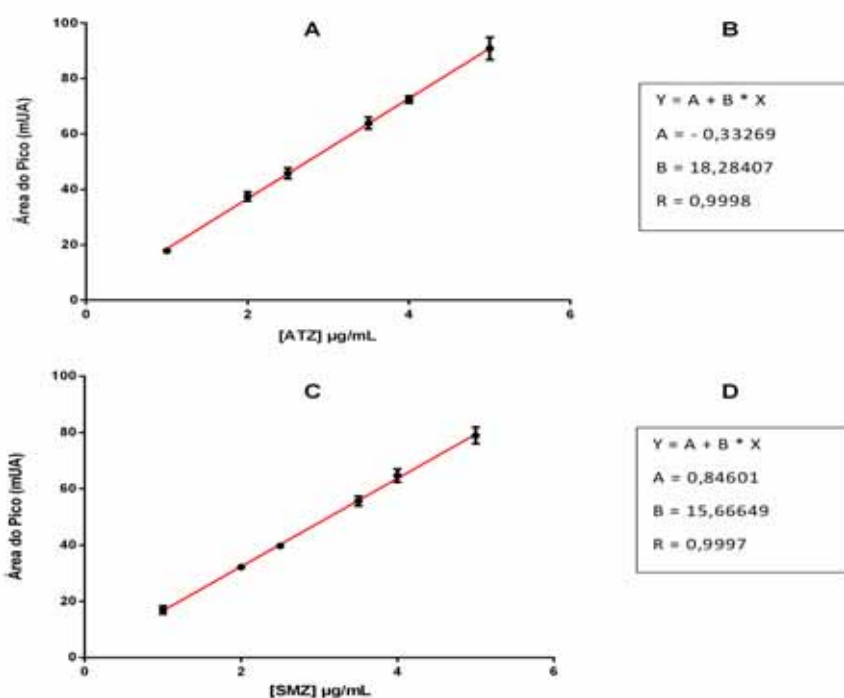


Tabela 3: Coeficientes de correlação (r) para as curvas de calibração da ATZ realizadas em três dias consecutivos.

Herbicida	r^2		
	Dia 1 (n=3)	Dia 2 (n=3)	Dia 3 (n=3)
ATZ	0,99835	0,99654	0,99964
SMZ	0,99822	0,99951	0,99984

Outra condição exigida para a obtenção de um método analítico, é a reprodutibilidade ou precisão intra-dia, a qual foi determinada através dos desvios padrões relativos (DPR) e da precisão intermediária. Os valores de DPR para as concentrações de ambos os herbicidas são expressos na tabela 4.

Tabela 4: Valores do desvio padrão relativo (DPR) das concentrações de atrazina determinados para a avaliação da precisão.

Herbicidas	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	DPR dia 1 (%)	DPR dia 2 (%)	DPR inter-dias (%)
ATZ	1,5	3,66	2,13	2,90
	3,0	1,89	1,16	1,52
	4,5	1,07	0,90	0,99
SMZ	1,5	0	2,44	1,22
	3,0	1,57	2,02	1,80
	4,5	0,57	1,57	1,07

O INMETRO e a ANVISA preconizam valores abaixo de 5% para os DPR intra-dias e inter-dias. Como podemos observar nas tabelas que para ambos os herbicidas, os resultados se encontram abaixo do limite preconizado, portanto o método pode ser considerado preciso (BRASIL, 2003; INMETRO, 2011).

A exatidão de um método analítico é determinada pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente, e a concentração teórica correspondente (BRASIL, 2003; INMETRO, 2011). Os valores correspondentes a esta relação podem ser observados na tabela 5 para a atrazina e na tabela 6 para a simazina.

Tabela 5: Valores da concentração de atrazina determinados para avaliação da exatidão.

[ATZ] teórica (µg/mL)	[ATZ] obtida (µg/mL)	% de Recuperação	[ATZ] obtida (µg/mL)	% de Recuperação
1,5	1,57	104,6	1,52	101,3
1,5	1,46	97,3	1,53	102,0
1,5	1,53	102,0	1,47	98,2
3,0	2,85	95,0	3,02	100,7
3,0	2,95	98,3	2,96	98,7
3,0	2,94	98,0	2,96	98,7
4,5	4,36	96,8	4,37	97,1
4,5	4,43	98,4	4,45	98,8
4,5	4,45	98,8	4,41	98,0
Média	—	98,8%	—	99,28
DP		2,86		1,66
Média(n=18)		99,04		
DPR (n=18)		2,26		

Tabela 6: Valores da concentração de simazina, determinados para avaliação da exatidão.

[SMZ] teórica (µg/mL)	[SMZ] obtida (µg/mL)	% de Recuperação	[SMZ] obtida (µg/mL)	% de Recuperação
1,5	1,50	100,0	1,45	96,6
1,5	1,50	100,0	1,47	98,0
1,5	1,50	100,0	1,52	101,3
3,0	3,06	102,0	3,01	100,3
3,0	2,99	99,7	2,97	99,0

3,0	2,97	99,0	3,09	103,0
4,5	4,41	98,0	4,55	101,1
4,5	4,38	97,3	4,41	98,0
4,5	4,43	98,4	4,42	98,2
Média	—	99,37	—	99,50
DP		1,39		2,05
Média(n=18)		99,44		
DPR (n=18)		1,72		

Todos os resultados obtidos para a avaliação da exatidão do método, encontram-se dentro do intervalo de aceitação estabelecido pelos órgãos reguladores encontra-se entre 95 a 105 %. A porcentagem de recuperação para a atrazina variou de 95 à 104,6 %, e para simazina a variação foi de 96,6 à 104,6 %, estando ambas dentro das especificações estabelecidas, o que torna então o método exato (BRASIL, 2003; INMETRO, 2011).

A tabela 7 mostra a estimativa do limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) para os herbicidas estudados. As estimativas foram realizadas a partir de dados obtidos com as regressões lineares das curvas analíticas aplicados às equações 2 e 3.

Tabela 7: Limite de detecção e limite de quantificação dos métodos analíticos para cada herbicida estudado.

	Atrazina	Simazina
Limite de detecção (µg/mL)	0,21	0,18
Limite de quantificação (µg/mL)	0,71	0,60

Portanto, todos os resultados obtidos para a construção do método analítico foram considerados satisfatórios, pois atenderam especificações de órgãos reguladores como a ANVISA (2003) e o INMETRO (2011). Dessa forma o método pode ser considerado específico, exato, preciso e linear, dentro do intervalo de concentração de 1 a 5 µg/mL, sendo assim possível a sua utilização para a quantificação dos herbicidas atrazina e simazina nas SLN.

4.2 Caracterização e estudo da estabilidade Físico-Química das Nanopartículas Lipídicas Sólidas

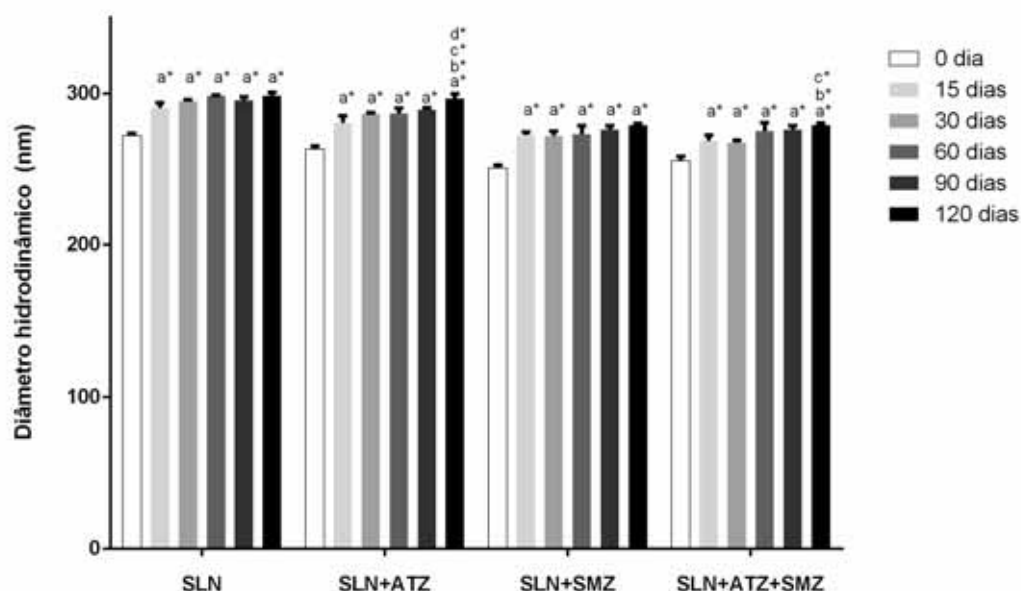
Para a determinação da estabilidade físico-química das nanopartículas lipídicas sólidas, foram analisadas algumas propriedades como: o diâmetro hidrodinâmico (tamanho), a polidispersão, potencial zeta, eficiência de encapsulação dos ativos nas SLNs e o pH em função do tempo (zero, 15, 30, 60, 90 e 120 dias), sendo que as suspensões coloidais foram armazenadas em frascos âmbar e em temperatura ambiente.

4.2.1 Diâmetro hidrodinâmico e polidispersão

O tamanho e a polidispersão de nanopartículas lipídicas sólidas podem ser afetados por inúmeros parâmetros como: a composição da formulação (tipo de lipídio, tipo de ativo, tipo de surfactante entre outros), o método e as condições de preparo (temperatura, agitação, pressão entre outros) e armazenamento (MARCATO, 2009).

A Figura 10 apresenta o diâmetro hidrodinâmico (em nm) das SLN em função de diferentes tempos (0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias). Observa-se que todas as SLN apresentaram no tempo inicial um tamanho médio abaixo de 300 nm, destacando a eficiência do método de preparo das partículas. Todas as formulações mostraram um aumento significativo com 15 dias de armazenamento, sendo que as SLN livres e as contendo apenas o herbicida simazina, mantiveram-se estáveis após este período. A formulação contendo apenas o herbicida atrazina e as contendo ambos os ativos apresentaram um aumento com 120 dias. Portanto observa-se que as formulações mantiveram-se praticamente estáveis durante os 120 dias de armazenamento, apresentando pequenas variações ao longo deste período.

Figura 10: Diâmetro hidrodinâmico (tamanho) das SLN com e sem os herbicidas em função do tempo (120 dias). As medidas foram realizadas em triplicata (n=3). Foi considerada uma significância de $p < 0,05$ para as diferenças estatísticas observadas entre os grupos, onde a* representa variações significativas entre os grupos em função do tempo em relação ao controle no tempo zero; b* comparação com o tempo 15 dias; c* comparação com o tempo 30 dias; d* comparação com o tempo 60 dias.

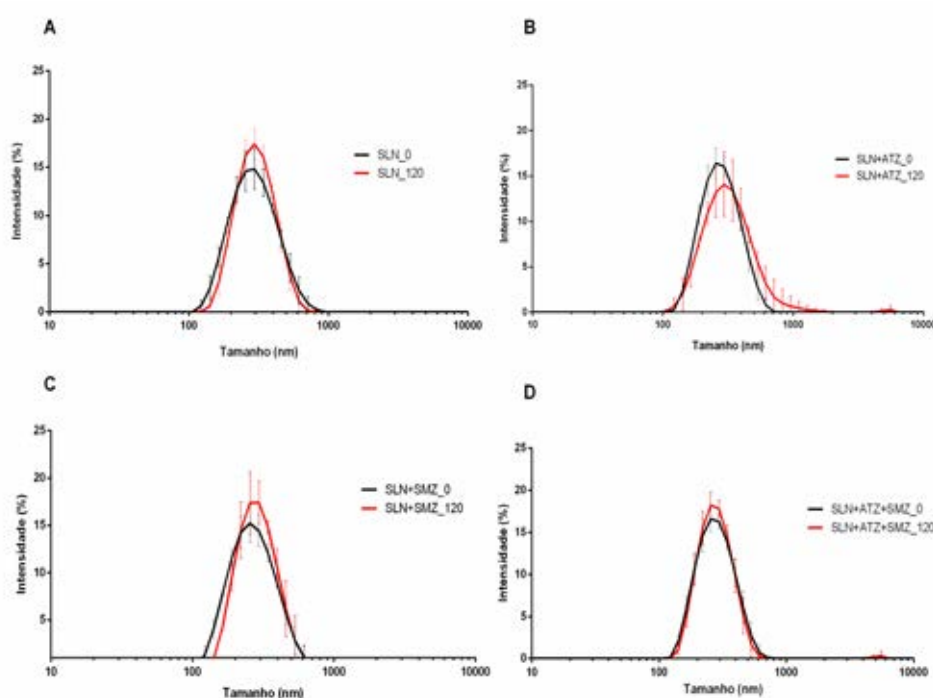


A figura 11 mostra a distribuição de tamanho das SLN no tempo inicial de estabilidade (0 dias) e no tempo final (120 dias). Observa-se que para todas as SLN, ocorreram variações na intensidade e deslocamento nas curvas de distribuição de tamanho em função do tempo, evidenciando alterações na polidispersão das partículas, como será descrito no próximo item. Observa-se também que mesmo com estas variações o diâmetro médio das partículas manteve-se estável durante este período. Para as SLN carregadas com apenas o herbicida atrazina, e aquelas carregadas com ambos os herbicidas observa-se o aparecimento de uma nova população de partículas com tamanho maiores, evidenciando os resultados mostrados na Figura 10, onde um aumento significativo foi observado nesta partículas com o tempo de 120 dias.

As análises de distribuição de tamanho para as nanopartículas lipídicas sólidas mostraram o perfil monomodal das mesmas, ou seja, a existência de apenas uma população de SLN, exceto para as nanopartículas contendo apenas o herbicida atrazina e aquelas contendo ambos os herbicidas. Estes são dados importantes, pois se busca em formulações para liberação modificada, uma maior

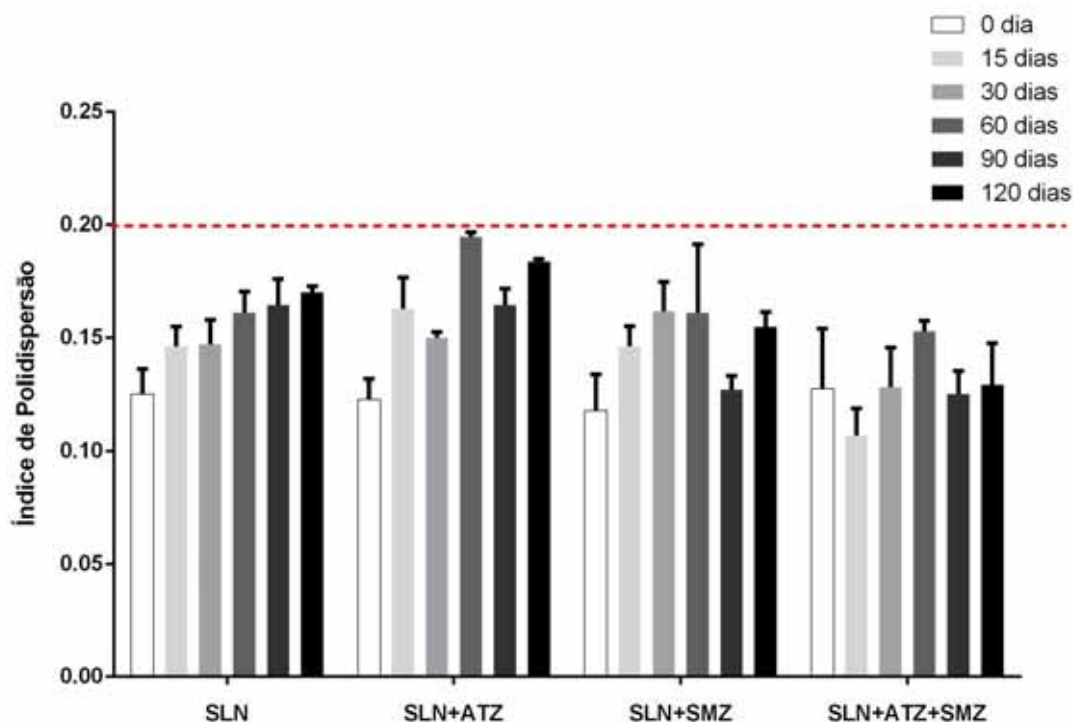
homogeneidade do sistema, pois assim haverá menores interferências no processo de liberação dos ativos (SCHAFFAZICK et al., 2003; MARCATO, 2009; MEHNERT;MÄDER, 2012).

Figura 11: Curvas de distribuição de tamanho das SLN em diferentes tempos de estabilidade: A) SLN no tempo inicial e final (0 e 120 dias) ; B) SLN+ATZ no tempo inicial e final (0 e 120 dias) C) SLN+SMZ no tempo inicial e final (0 e 120 dias) e D) SLN+ATZ+SMZ no tempo inicial e final (0 e 120 dias), temperatura 25°C, as análises foram feitas em triplicatas.



Outro parâmetro avaliado foi o índice de polidispersão (IP), o qual indica a distribuição de tamanho das nanopartículas em função da distribuição de tamanho média, ou seja, um baixo índice de polidispersão indica que as partículas estão em uma estreita faixa de tamanho. Valores abaixo de 0,2 para o índice de polidispersão são considerados bons indicadores de estabilidade (MOHANRAJ;CHEN, 2006). A figura 12 apresenta os valores de índice de polidispersão para as SLN em função do tempo. Observa-se que ocorreram variações na polidispersão em função do tempo, no entanto, estas variações podem estar relacionadas a erros experimentais ou até mesmo a reorganização na distribuição de tamanho das partículas, porém todas as formulações apresentaram valores abaixo de 0,2 durante 120 dias de armazenamento, evidenciando a boa estabilidade das SLN.

Figura 12: Valores de polidispersão avaliados em função do tempo para SLN com e sem herbicidas, determinação em triplicata (n=3).



4.2.2 Potencial zeta

Outro parâmetro utilizado para acompanhar a estabilidade das SLN foi o potencial zeta. Ele reflete a carga de superfície das nanopartículas, sendo influenciado pela composição da partícula, o meio dispersante, pH e a força iônica do meio (GREENWOOD, 2003). Geralmente, quando maior o valor numérico (em módulo) do potencial zeta, maior será a estabilidade das suspensões coloidais, pois a força de repulsão de cargas entre as partículas é maior, evitando agregação. Nanopartículas com potencial zeta de aproximadamente (+/-) 30 mV são mais estáveis em suspensão (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; MEHNERT; MÄDER, 2012).

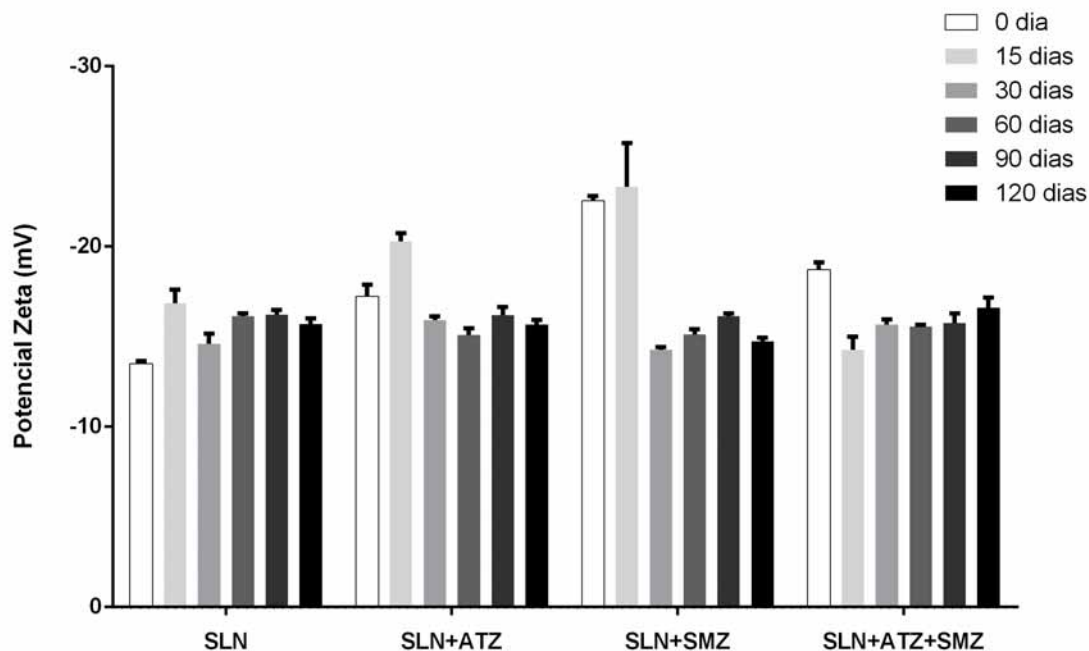
A figura 13 mostra os valores de potencial zeta para as SLN em função do tempo. Pode-se observar que todas as formulações apresentaram um valor médio de aproximadamente -15 mV, considerado um valor de estabilidade limitada para

formulações de nanopartículas (MOHANRAJ;CHEN, 2006). Porém no preparo das formulações, utilizou-se PVA como tensoativo e este por sua vez possui uma ação estabilizante, ou seja, adsorve sobre a superfície das partículas criando uma camada estabilizadora por efeito estérico, a qual leva a uma redução do potencial zeta medido (LOURENCO et al., 1996). Desta forma, o principal fator de estabilização destas partículas é determinado pela presença do tensoativo e não pelo valor do potencial zeta. Portanto os valores de potencial zeta nessas formulações não indicam, necessariamente, uma baixa estabilidade, visto que, como observado na Figura 13, não houve grandes alterações nos valores de potencial zeta para a maioria das formulações em função do tempo. Estes resultados corroboram com os de tamanho e polidispersão, nos quais se observa que as partículas mantiveram-se estáveis durante os 120 dias de armazenamento.

GRILLO e colaboradores. (2012), prepararam por nanoprecipitação e caracterizaram nanocapsulas de poli(ϵ -caprolactone) (PCL) contendo os herbicidas atrazina, simazina e ametrina, sendo o potencial zeta um dos parâmetros utilizados para acompanhar a estabilidade das nanopartículas em função do tempo. O potencial zeta das partículas contendo os herbicidas apresentaram valores de aproximadamente -30 mV, sendo que também foram observadas variações no potencial zeta em função do tempo.

PEREIRA e colaboradores (2014) prepararam e caracterizaram nanopartículas poliméricas de PCL contendo o herbicida atrazina. O potencial zeta das nanopartículas contendo o herbicida apresentou valores entre -23 e -26 mV, sendo observadas alterações nos valores ao longo de 90 dias, porém destaca-se o uso do tensoativo PVA, o qual gera um efeito de estabilidade estérica, sendo a carga não representativa do principal parâmetro de estabilidade destas partículas.

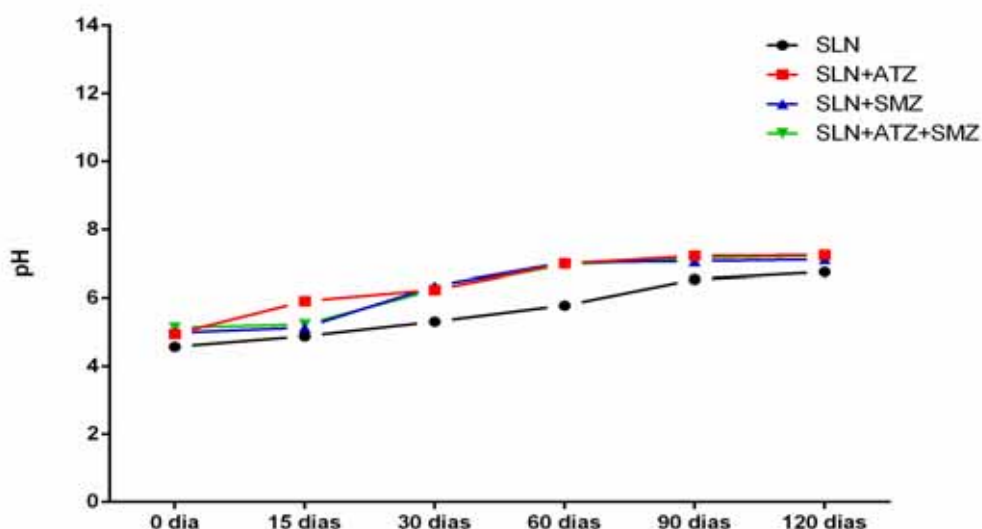
Figura 13: Valores de potencial zeta (mV) para as formulações de SLN carregadas e não carregadas com os herbicidas em função do tempo (0, 15, 30, 60, 90 dias e 120 dias), determinação em triplicata (n=3).



4.2.3 Avaliação de alterações físico-químicas (pH) e quantificação de ácidos graxos livres

O pH foi um dos parâmetros investigados para avaliar a estabilidade das SLN na presença e ausência dos herbicidas. A figura 14 apresenta os valores de pH para as formulações de SLN (contendo ou não herbicidas).

Figura 14: Perfil do pH das formulações de SLN sem e contendo os herbicidas em função do tempo.



Pode-se observar que ocorreram variações no pH das formulações ao longo de 120 dias, apresentando uma tendência de elevação. Alterações nos valores de pH de suspensões de SLN, podem interferir na matriz lipídica das partículas, ocasionando fenômenos como a cristalização ou recristalização, levando a liberação dos ativos (CHOI et al, 2014).

SOUZA e colaboradores (2012) desenvolveram nanocápsulas de poli- ϵ -caprolactona contendo o herbicida atrazina, a análise do pH foi feita para acompanhar a estabilidade das partículas, as quais, apresentaram pH em torno de 5,8 no tempo inicial de preparo, sofrendo pequenas alterações com 30 dias de armazenamento.

SILVA e colaboradores (2011) também observaram alterações no pH, quando prepararam e caracterizaram nanopartículas de alginato/quitosana contendo o herbicida Paraquat. As partículas carregadas apresentaram um aumento no valor do pH (4,85 para 6,11) no decorrer de 60 dias de armazenamento.

PEREIRA e colaboradores (2014) observaram a elevação nos valores de pH das nanopartículas poliméricas de PCL contendo o herbicida atrazina durante 90 dias de armazenamento. Atribui-se este aumento à exposição dos grupos amina presentes no herbicida atrazina.

Portanto de acordo com os dados apresentados, observa-se que ocorrem variações no pH dos sistemas nanoestruturados contendo herbicidas, ao longo do tempo, assim como os resultados observados para as SLN contendo os herbicidas atrazina e simazina. Estes resultados indicam que provavelmente processos de hidrólise podem estar ocorrendo, fazendo com que as espécies presentes possam alterar o equilíbrio de espécies iônicas no meio e por consequência alterações no pH.

A fim de verificar se os lipídios utilizados no preparo das amostras sofreram alterações ao longo do período analisado (120 dias) foram realizadas análises de quantificação de ácidos graxos livres (ácido palmítico) a fim de verificar a estabilidade do lipídio tripalmitina nas nanopartículas. Os resultados são apresentados na tabela 8.

Tabela 8: Quantificação de ácidos graxos livres (ácido palmítico) no tempo inicial de preparo e após 180 dias de armazenamento.

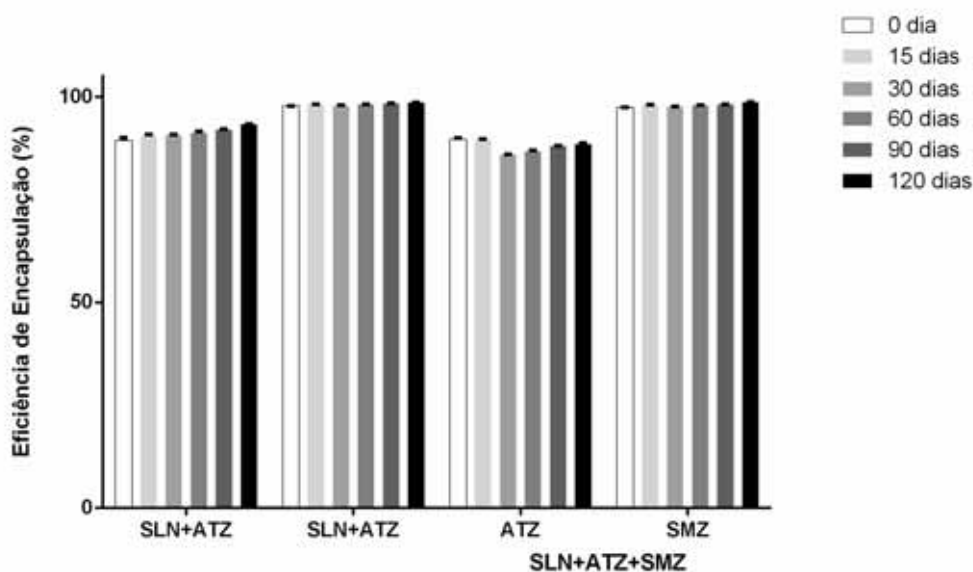
Formulações	[Ácido Palmítico] mM	[Ácido Palmítico] mM
	0 dias	120 dias
SLN	0,37 ± 0,12	1,20 ± 0,21
SLN+ATZ	0,48 ± 0,08	1,14 ± 0,16
SLN+SMZ	0,33 ± 0,10	1,22 ± 0,08
SLN+ATZ+SMZ	0,57 ± 0,034	1,36 ± 0,17

Observa-se que ocorreu para todas formulações um aumento na concentração de ácido palmítico com 120 dias de armazenamento. Este aumento evidencia que o lipídio tripalmitina sofreu hidrólise ao longo do tempo, indicando que a estabilidade das nanopartículas é alterada ao longo do tempo. A hidrólise da tripalmitina pode ter ocasionado alterações no equilíbrio do meio, uma vez que liberação de ácidos graxos causariam uma diminuição no pH, no entanto, pode-se observar que para todas as amostras ao longo do tempo foram observadas aumento de pH (de 4 para 6) no período, indicando assim outros processos de hidrólise possam estar ocorrendo no meio. Para um melhor entendimento deste processo, estudos adicionais, como exemplo, por cromatografia gasosa acoplada espectrometria de massas, seriam necessários para uma melhor compreensão do que está ocorrendo com os componentes da formulação.

4.2.4 Eficiência de Encapsulação

A eficiência de encapsulação das formulações em função do tempo foi estudada para avaliar a estabilidade dos herbicidas nas nanopartículas lipídicas sólidas. Inúmeros são os fatores que podem influenciar na taxa de encapsulação dos ativos em sistemas nanoestruturados, entre os principais temos: as características físico-químicas do ativo (solubilidade), o tipo de tensoativo, características do lipídio, pH do meio e a quantidade de ativo utilizada (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; MEHNERT;MÄDER, 2012). A figura 15 apresenta a taxa de encapsulação (%) dos herbicidas atrazina e simazina em função do tempo.

Figura 15: Eficiência de encapsulação (%) dos herbicidas nas SLN em função do tempo (zero, 15, 30, 60, 90 e 120 dias), determinação em triplicata (n=3).



As SLN contendo apenas o herbicida atrazina e simazina tiveram uma taxa de encapsulação média de 90 % e 98 % respectivamente. Quando estes herbicidas foram encapsulados conjuntamente, observou-se que não ocorreram grandes alterações na eficiência de encapsulação, sendo que a taxa de encapsulação média para a atrazina foi de 89 % e para simazina de 97 %.

Os elevados valores de encapsulação são explicados pela solubilidade dos ativos na matriz lipídica, o que está de acordo com a sua baixa solubilidade em água (30 mg/L para atrazina; 5 mg/L para simazina) (EXTONET, 2013).

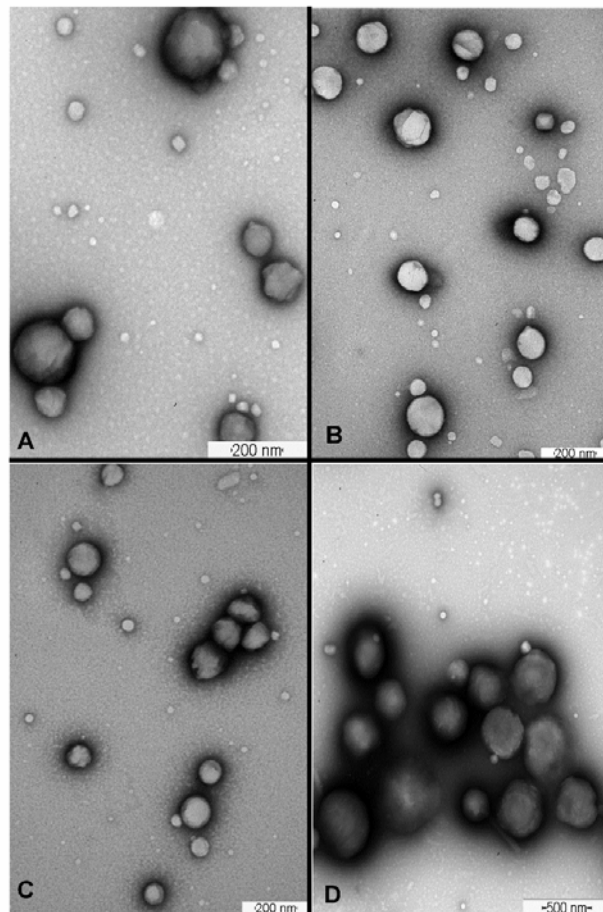
Portanto, observa-se que as SLN mostraram ser eficazes para a encapsulação dos herbicidas, tanto de forma exclusiva como conjuntamente, sustentando a sua encapsulação durante os 120 dias de armazenamento. Constatou-se também que mesmo com a variação do pH ao longo dos 120 dias, a eficiência de encapsulação não sofreu alteração, indicando assim que o núcleo lipídico da partícula encontra-se preservado.

4.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Na literatura encontra-se trabalhos que utilizaram a técnica de microscopia eletrônica de transmissão para caracterizar compostos com atividade para a agricultura. SILVA et al., 2011, utilizaram a técnica para observar a morfologia de nanopartículas de alginato/quitosana contendo o herbicida paraquat. Yi et al., 2011 também utilizaram a técnica para avaliar a morfologia de hidrogéis a base de azidobenzaldeído e carboximetil quitosana contendo o herbicida diuron.

Desta forma, a morfologia das nanopartículas lipídicas sólidas livres e as contendo os herbicidas, foram avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão no tempo inicial de estocagem (figura 16) e no tempo final (figura 17).

Figura 16: Micrografias das SLN com e sem os herbicidas ATZ e/ou SMZ no tempo inicial de armazenamento (0 dias). A) SLN, aumento de 27800 vezes; B) SLN+ATZ, aumento de 27800 vezes; C) SLN+SMZ, aumento de 27800 vezes e D) SLN+ATZ+SMZ, aumento 21560 vezes.

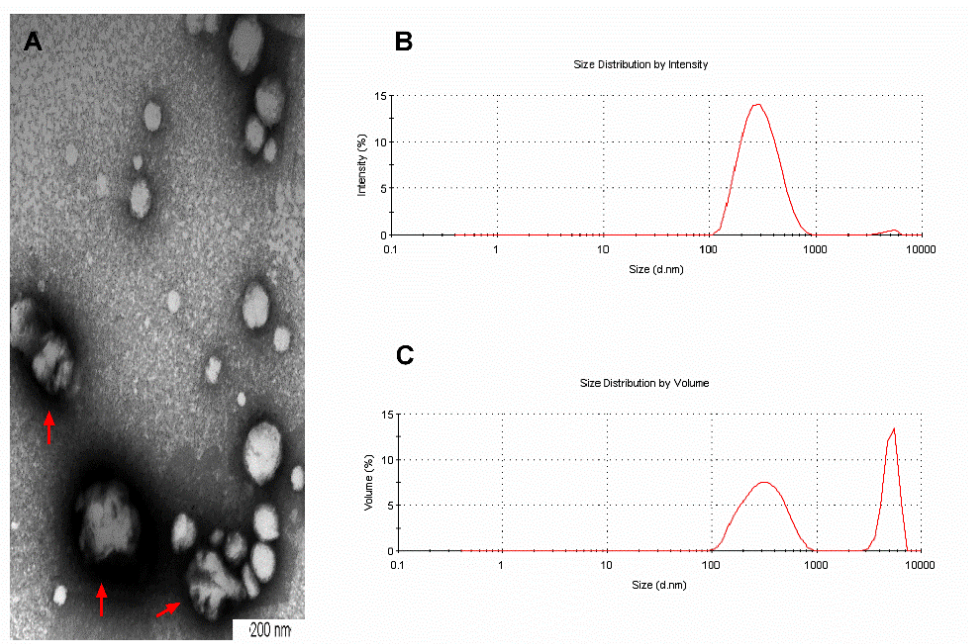


Pode-se observar nas micrografias obtidas para as SLN, que todas possuem formato esférico, e apresentaram tamanhos menores ($111 \pm 2,3$ nm para SLN; $135 \pm 4,8$ nm para SLN+ATZ; $122 \pm 4,3$ nm para SLN+SMZ e $178 \pm 3,1$ nm para SLN+ATZ+SMZ) em relação às análises feitas por espectroscopia de correlação de fótons. Uma justificativa para isso deve-se a espectroscopia de correlação fótons medir o diâmetro hidrodinâmico e para as análises de TEM as amostras foram secas (SILVA *et al.*, 2011).

A Figura 17 traz a micrografia das SLN carregadas com ambos os herbicidas no tempo de 120 dias de armazenamento juntamente com os gráficos de distribuição de tamanho por intensidade e também por volume. Observa-se que no tempo final de armazenamento surgiu uma nova população, com baixa intensidade (Fig.17-B), porém representando grande volume (Fig.17-C), isto devido ao

surgimento de deformações na morfologia das partículas (Fig.17-A, setas). Isso corrobora com os resultados mostrados para diâmetro hidrodinâmico, onde um aumento significativo ocorreu com 120 dias, bem como o processo de hidrólise da tripalmitina, que certamente irá alterar as características morfológicas destas partículas.

Figura 17: Micrografia e gráficos de distribuição de tamanho das SLN contendo os herbicidas ATZ e SMZ no tempo final de armazenamento (120 dias). A) SLN+ATZ+SMZ, aumento 21560 vezes; B) Distribuição de tamanho por intensidade no tempo 120 dias; C) Distribuição de tamanho por volume no tempo 120 dias. Seta: Deformações na morfologia das SLN.

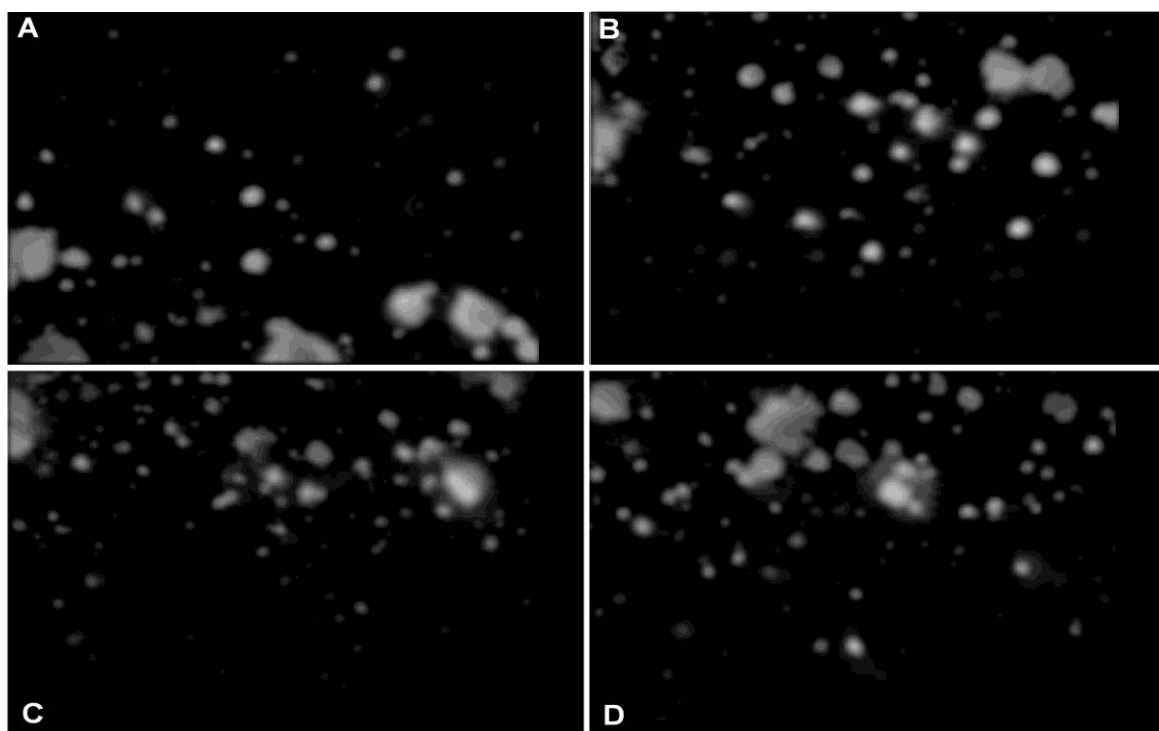


4.4 Rastreamento de Nanopartículas

A técnica de rastreamento de nanopartículas, foi utilizada para caracterizar as suspensões de SLN. A figura 18 traz as imagens das nanopartículas obtidas através do software interfaciado ao microscópio. As imagens são correspondentes a um dos “frames” gravados para realização da análise do tamanho das partículas. Observa-se que, assim como demonstrado pela microscopia eletrônica de

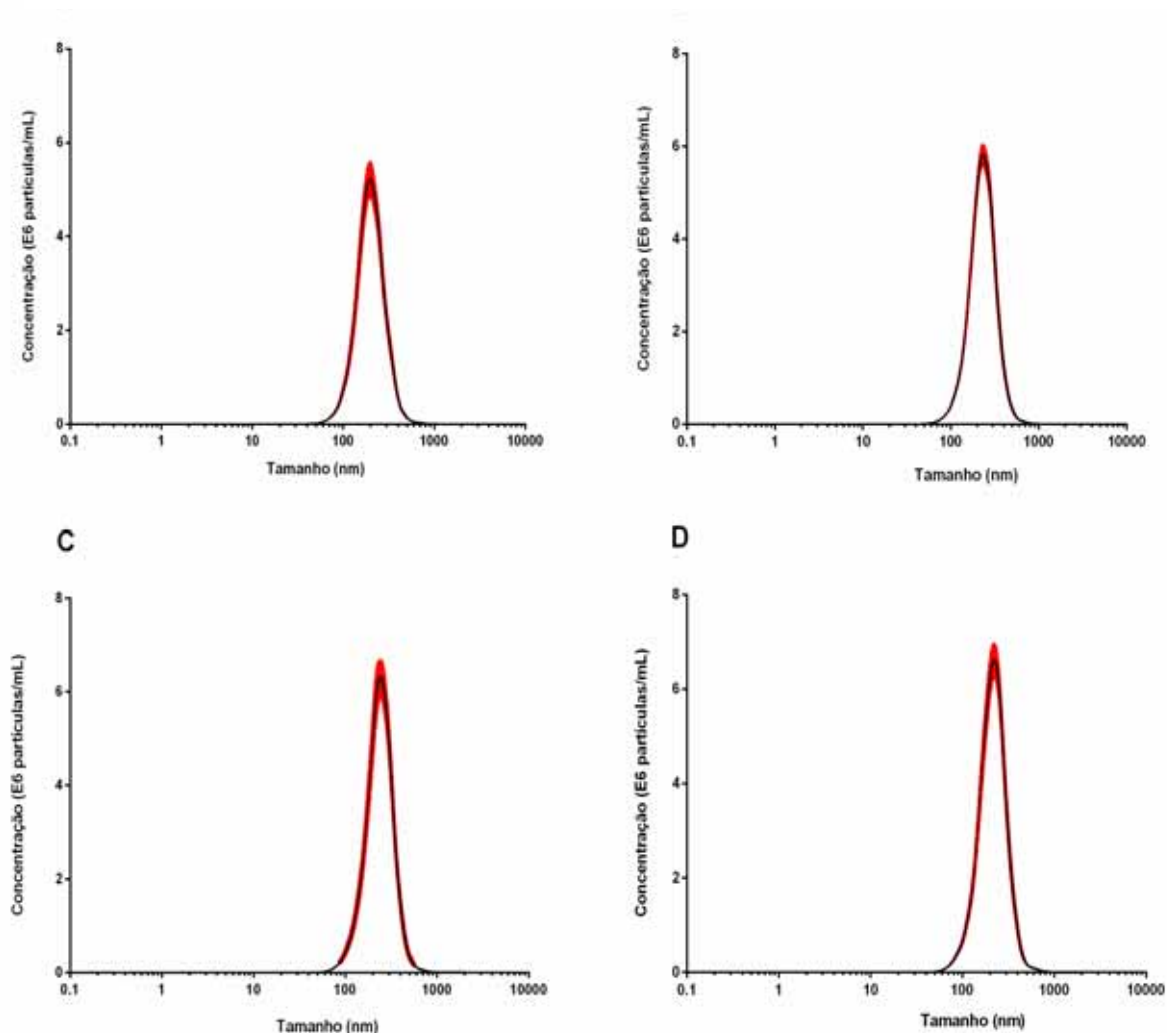
transmissão, as SLN possuem formato esféricos, sendo possível observar diferentes tamanhos de partículas.

Figura 18: “Frame” do vídeo gravado para as análises das SLN. A) SLN; B) SLN+ATZ; C) SLN+SMZ e D) SLN+ATZ+SMZ.



As análises de distribuição de tamanho das partículas são apresentadas na Figura 19. Para as SLN na ausência dos herbicidas foi obtido um diâmetro hidrodinâmico de $240,3 \pm 95,5$ nm e uma concentração de $9,0 \pm 0,7 \times 10^{12}$ partículas/mL. Para as SLN contendo os herbicidas atrazina e simazina separadamente, foram obtidos diâmetros médios de $271,2 \pm 95,2$ nm e $278,6 \pm 96,6$ nm e uma concentração de $11,3 \pm 0,4 \times 10^{12}$ partículas/mL e $12,3 \pm 0,5 \times 10^{12}$ partículas/mL, respectivamente. Para as SLN contendo ambos os herbicidas foi obtido um diâmetro hidrodinâmico médio de $252,1 \pm 91,5$ nm e uma concentração de $11,7 \pm 0,6 \times 10^{12}$ partículas/mL. Pode-se observar que, para ambas as técnicas (DLS e NTA), foram obtidos valores semelhantes para a distribuição de tamanho, e também um perfil monomodal, ou seja, apenas uma população de partículas.

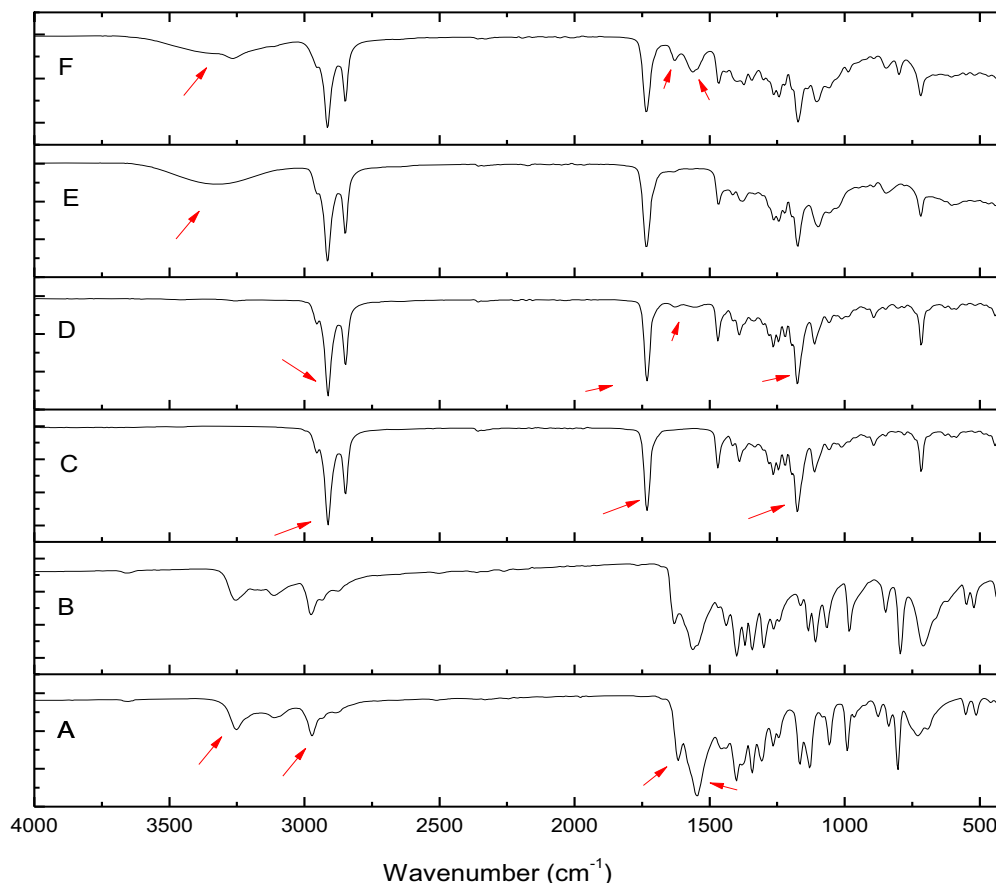
Figura 19: Distribuição de tamanho das partículas em função da concentração. A) SLN; B) SLN+ATZ; C) SLN+SMZ e D) SLN+ATZ+SMZ, as análises foram realizadas a 25°C, totalizando um n=15. A linha vermelha é correspondente ao desvio padrão das análises.



4.5 Espectroscopia na Região do Infravermelho

Com o propósito de observar evidências na interação dos herbicidas às nanopartículas, foram coletados espectros na região do infravermelho para as amostras de herbicidas (ATZ, SMZ), para a tripalmitina, e as SLN sem e contendo os herbicidas, assim como a mistura física entre os componentes, como podemos observar na figura 20.

Figura 20: Espectros de infravermelho para A) ATZ, B) SMZ, C) Tripalmitina, D) Mistura física dos componentes, E) SLN, F) SLN+ATZ+SMZ. Os espectros foram adquiridos utilizando acessório de reflectância total atenuada (ATR), com um total de 32 acumulações na faixa de frequência de 4000 a 400 cm^{-1} . As setas indicam em cada espectro as principais bandas de absorção características.



Na figura 20 (A e B) observam-se os espectros dos herbicidas atrazina e simazina. Devido ambos pertencerem a família dos herbicidas triazínicos, seus espectros possuem semelhanças, sendo possível destacar a existência de bandas específicas como em 3251 cm^{-1} correspondente à deformação axial simétrica e assimétrica de N-H; em 2972 cm^{-1} observa-se o estiramento de C-H de alifáticos, e em 1616 e 1546 cm^{-1} encontra-se a deformação das ligações C=C e C=N. Na figura 20 (C), pode-se observar o espectro da tripalmitina, sendo algumas bandas específicas como em 2914 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C-H do grupamento alquila, em 1733 cm^{-1} o do estiramento da ligação C=O da função éster e em 1173 cm^{-1} a deformação angular de C-O. Na mistura física (Figura 20-D) pode-se observar as bandas características do lipídio tripalmitina, como o estiramento da ligação C=O da função éster e o estiramento da ligação C-H do

grupamento alquila, assim como a deformação das ligações C=C e C=N pertencentes aos herbicidas.

No espectro da SLN sem ativo (Figura 20-E), observa-se praticamente a maioria das bandas presentes na tripalmitina e também de uma banda na região de 3340 cm^{-1} caracterizada pela presença do grupamento O-H na estrutura, provavelmente devido à utilização do álcool polivinílico utilizado como estabilizante no preparo das nanopartículas.

A figura 20 (F) apresenta o espectro da SLN carregada com os ativos atrazina e simazina. Neste espectro pode-se observar a presença da mesma região de 3340 cm^{-1} , provavelmente devido a presença do álcool polivinílico, bem como observa-se também as bandas características da tripalmitina. Como indicado pela seta podemos identificar em menor intensidade as bandas específicas da deformação das ligações C=C e C=N em 1629 e 1561 cm^{-1} , proveniente dos herbicidas, as quais sofreram deslocamento. Portanto isto indica que os herbicidas encontram-se encapsulados/interagindo com as nanopartículas. MELO e colaboradores (2014) observaram através das análises de FTIR que o anestésico articaína interagiu com nanoesferas de alginato/quitosana e com nanocapsulas de PCL/PEG, pois ocorreram mudanças vibracionais e sobreposição de bandas, sendo ambos os tipos de nanopartículas adequados para carrear o anestésico. O que também foi observado para as SLN contendo ambos os herbicidas, onde ocorreram mudanças vibracionais e sobreposição de picos, além do aparecimento de bandas específicas dos herbicidas.

4.6 Calorimetria Diferencial Exploratória

Com o intuito de uma melhor caracterização e observação da interação dos herbicidas (atrazina e simazina) com as nanopartículas lipídicas sólidas, foram realizados as análises de CDE como descritos no item 3.5.

Os resultados de CDE são apresentados na Figura 21, onde temos o fluxo de calor (W/g) em função da temperatura ($^{\circ}\text{C}$). Foram realizadas análises dos herbicidas puros (Fig. 21-A e Fig. 21-B), da tripalmitina (Fig. 21-C), da mistura física

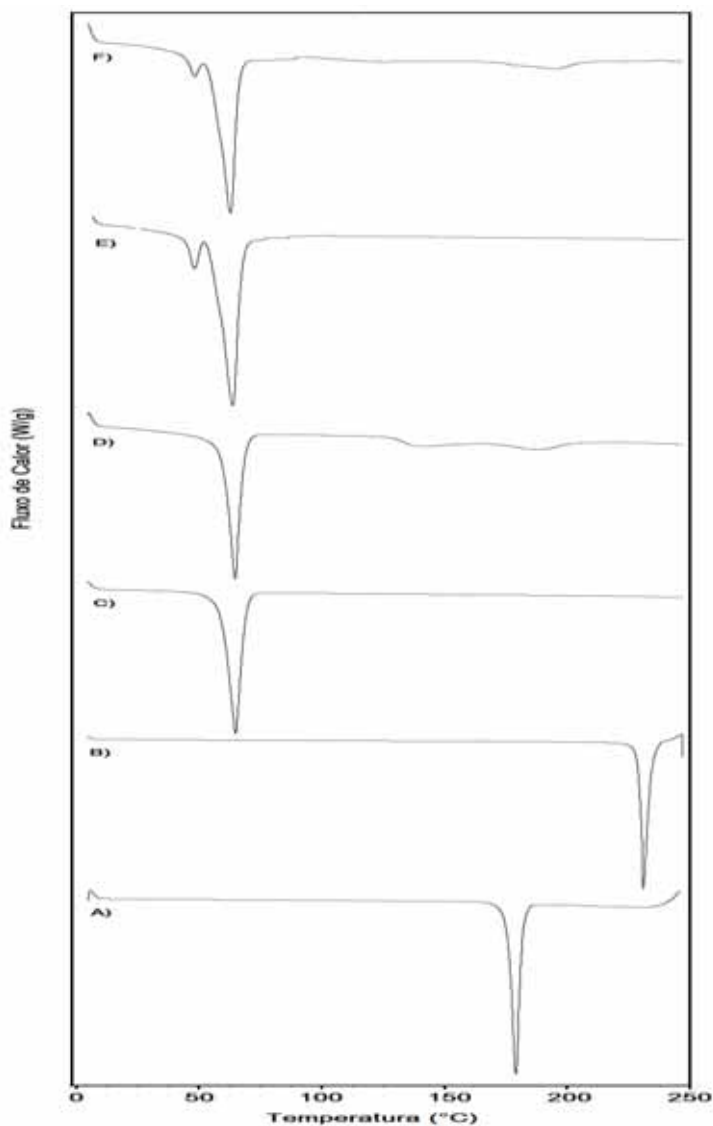
dos constituintes da partícula e os ativos na respectiva proporção de preparo (Fig. 21-D), das SLN sem a presença dos herbicidas (Fig. 21-E) e das SLN contendo ambos os herbicidas (Fig. 21-F).

Pode-se observar nas Figuras 21 – A e B, dois picos endotérmicos estreitos em 179 °C e 232 °C correspondentes ao ponto de fusão da atrazina e da simazina respectivamente.

A Figura 21-C traz um pico em 64 °C mostrando o ponto de fusão da forma β do lipídeo tripalmitina puro (AWAD et al., 2009). A mistura física dos componentes é mostrada na Figura 21-D, observa-se a presença de dois picos alargados, atribuídos a presença dos herbicidas, porém estes sofreram deslocamentos devido a interação com a tripalmitina.

A Figura 21-E traz a análise da SLN sem a presença dos herbicidas, podemos observar um pico simétrico em 64 °C característico da fusão da forma β da tripalmitina e um outro pico em 48 °C este devido a recristalização da forma α da tripalmitina (HEURTAULT, 2003). Suspensões coloidais a base de lipídeos podem trazer modificações na cristalização e polimorfismo dos lipídeos consequentemente modificações em seu ponto de fusão (BUNJES, 2011; HEURTAULT, 2003). Para as SLN contendo os herbicidas observa-se os picos característicos da fusão das formas α e β , e também a presença de um pico alargado, atribuído a presença dos herbicidas. Porém este pico sofreu deslocamentos devido a interação com o lipídio tripalmitina, indicando que os herbicidas estão disperso em toda a matriz das nanopartículas e não sendo encontrado disperso na forma de cristais.

Figura 21: Termogramas de Calorimetria Diferencial Exploratória para: a) atrazina; b) simazina; c) tripalmitina; d) mistura física; e) SLN sem herbicidas; f) SLN com atrazina e simazina.



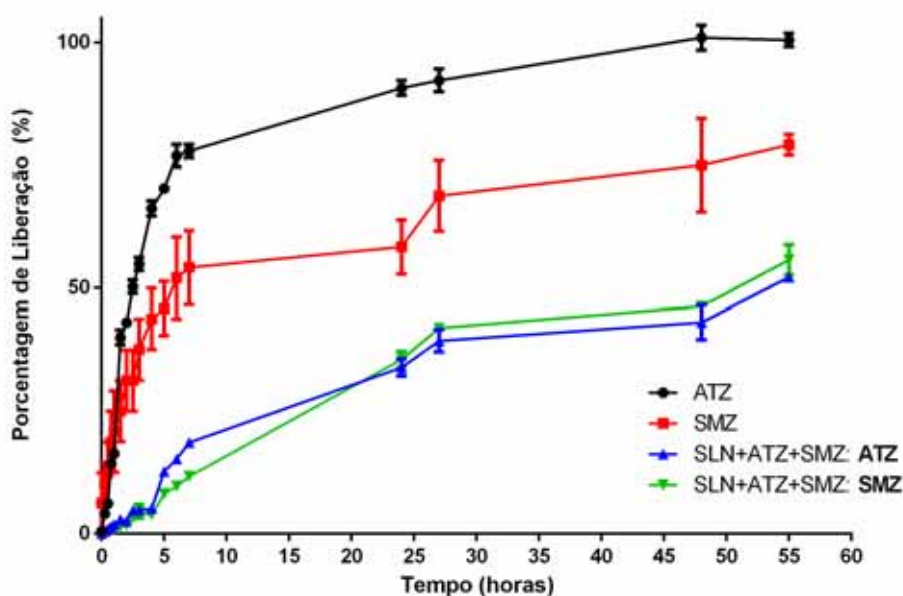
4.7 Cinética de liberação dos herbicidas das SLN

Os ensaios de cinética de liberação foram realizados utilizando a metodologia proposta no item 3.7 e todos os resultados foram analisados por CLAE. Os valores das áreas dos cromatogramas foram convertidos em porcentagem e em seguida os dados foram graficados em porcentagem de liberação cumulativa da

ATZ e SMZ em função do tempo (horas). Nestes experimentos de cinética de liberação, os herbicidas possuem a capacidade de atravessar os poros da membrana que separa o compartimento doador do receptor. No entanto, as nanopartículas não a atravessam e, desta forma, é possível observar o efeito da encapsulação do herbicida na velocidade de liberação da SLN. Para os ensaios com os herbicidas livres, foram utilizadas concentrações solúveis em água, para garantir a liberação completa do ativo.

A figura 22 mostra o perfil de cinética de liberação da atrazina e simazina encapsulados conjuntamente nas SLN. Observa-se que em comparação com os herbicidas livres, as formulações de SLN conseguiram modificar o perfil de liberação, retardando a liberação dos ativos em função do tempo. A solução de ATZ livre liberou 50% do ativo em 2,5 horas (0,1 dias), enquanto a encapsulada atingiu 50 % de liberação em aproximadamente 54 horas (2,25 dias). Para a SMZ livre, foram necessárias 5,3 horas (0,25 dias) para liberar 50 % do ativo, enquanto a encapsulado levou 51 horas (2,125 dias).

Figura 22: Perfil de cinética de liberação in vitro para os herbicidas atrazina e simazina livres e associados às SLN, 25°C, determinação em triplicata (n=3). Os ensaios foram realizados em sistema de dois compartimentos em triplicata.



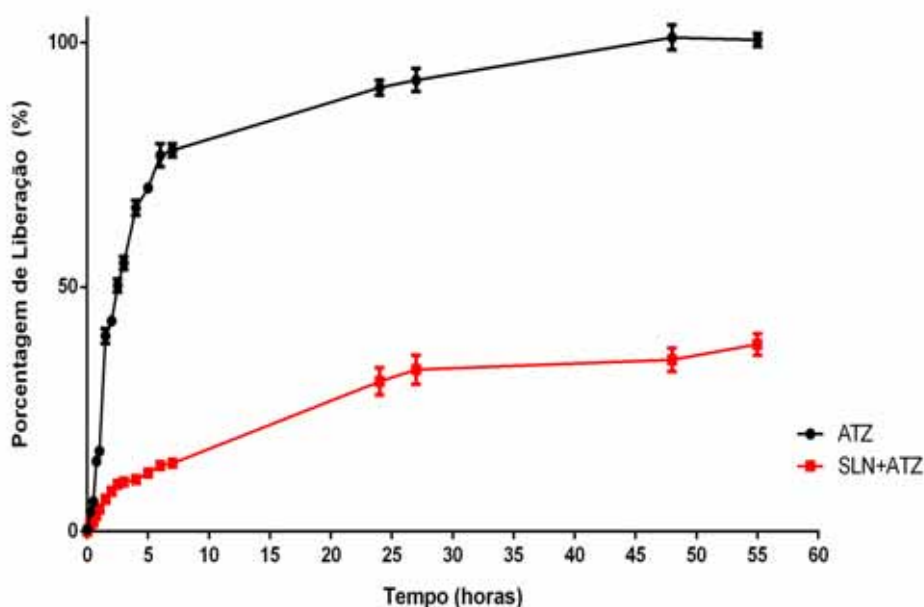
A liberação do ativo das SLN está diretamente relacionada com a estrutura das nanopartículas. Basicamente as nanopartículas lipídicas sólidas são

compostas por um núcleo sólido coberto por uma camada de moléculas de agente tensoativo (MARCATO, 2009). A estrutura das partículas é dependente do método de preparo utilizado e das concentrações dos componentes da partícula (SOUTO;MÜLLER, 2008).

A análise dos perfis de liberação dos herbicidas das nanopartículas (para o modelo de liberação utilizado) mostra que nas primeiras horas a ATZ possui uma liberação mais rápida em relação à SMZ, fato este pode ser devido ao tipo de interação que estes ativos estão tendo com as nanopartículas. Esta diferença está diretamente relacionada com a eficiência de encapsulação, pois a ATZ possui uma menor eficiência de encapsulação o que faz com que a fração livre no meio deste ativo seja liberado mais rapidamente. Passando este período, observa-se que o perfil de liberação é muito parecido, indicando que os ativos encapsulados encontram-se interagindo com o núcleo hidrofóbico das nanopartículas da mesma forma.

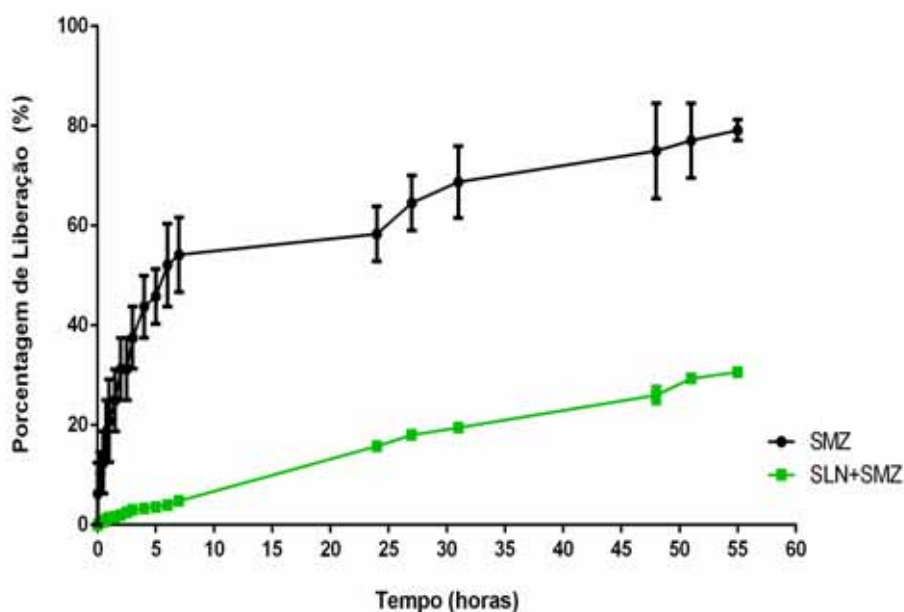
As SLN contendo os herbicidas separadamente também conseguiram modificar o perfil de liberação dos ativos, como podemos observar nas figuras 23 e 24. A Figura 23 mostra o perfil de liberação da atrazina livre e a da encapsulada nas SLN. Pode-se observar que as partículas foram capazes de retardar a liberação do herbicida, sendo que a solução livre liberou 50% do ativo com 2,5 horas (0,1 dias), já a encapsulada com 55 horas de experimento havia liberado aproximadamente apenas 38% do ativo.

Figura 23: Perfil de cinética de liberação in vitro para o herbicida atrazina livre e associado às SLN, 25°C, determinação em triplicata (n=3).



A Figura 24 mostra o perfil de liberação da simazina livre em comparação com a encapsulada nas SLN. Observa-se que as formulações de SLN foram capazes de retardar a liberação do herbicida, sendo que com 5,3 horas (0,25 dias) a solução livre liberou 50% do herbicida, já a encapsulada demorou 55 horas para liberar cerca de 31% do herbicida.

Figura 24: Perfil de cinética de liberação in vitro para o herbicida simazina livre e associado às SLN, 25°C, determinação em triplicata (n=3).



A tabela 9 traz os valores de porcentagem de liberação dos ativos no tempo final de análise (55 horas) e o fluxo aparente (F_{app}) para os herbicidas livres, os encapsulados individualmente e os encapsulados conjuntamente nas SLN. Observa-se para os herbicidas encapsulados individualmente nas SLN que o perfil de liberação para a SMZ foi mais lento quando comparado com o perfil de liberação da ATZ. No entanto, quando os herbicidas estão em uma associação conjunta nas SLN, a diferença no perfil de liberação é reduzida. Este fato pode ser devido à quantidade de ativo ser muito grande em uma associação conjunta (dobro que nas nanopartículas individuais), o que faz com que a interação com o lipídio seja diminuída em relação às nanopartículas que possuem apenas um herbicida. Os dados de fluxo aparente mostram que o fluxo de massa da simazina é menor quando comparado ao da atrazina, tanto para o herbicida livre quanto para os

encapsulados. Isto deve-se à solubilidade de cada composto, sendo que a simazina é mais hidrofóbica que a atrazina (5 mg L^{-1} a 20°C para simazina e 30 mg L^{-1} a 20°C para atrazina). Através das análises de F_{app} e em comparação com a porcentagem de liberação das formulações no tempo de 55 horas, observa-se que a organização dos ativos dentro das partículas se dá de forma diferente para a encapsulação conjunta e a separada. O F_{app} é determinado pela parte linear do gráfico de liberação (tempo inicial). Portanto observa-se que quando os ativos estão encapsulados de forma separada, ocorre uma liberação rápida inicialmente e mais lenta depois. Isto ocorre de forma contrária para os herbicidas encapsulados conjuntamente.

Em uma associação conjunta, na parte livre e na parte mais periférica da partícula há a presença dos dois herbicidas, o que promove uma liberação mais lenta inicialmente em comparação as partículas que possuem apenas um herbicida. Após este período inicial, ocorre a liberação dos ativos mais interiorizados nas partículas, e a diferença está no fato de que em uma associação separada, a interação destes ativos com o lipídio é mais forte, o que promove uma liberação mais lenta quando comparada a associação conjunta, onde a interação é diminuída pela presença dos dois ativos.

Tabela 9: Valores de Porcentagem de liberação no tempo final e Fluxo Aparente (F_{app}) para herbicidas livres, os encapsulados individualmente e os encapsulados conjuntamente nas SLN.

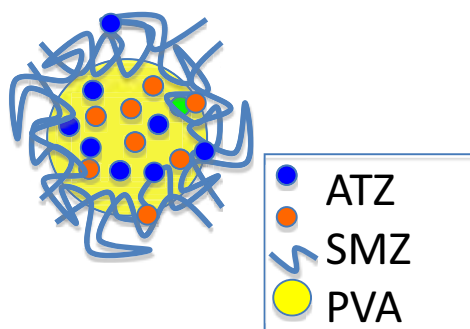
Formulação	% Lib. T = 55h	F_{app} ($\text{mg m}^{-2} \text{h}^{-1}$)
ATZ	$100 \pm 0,04$	$428,0 \pm 43,74$
SMZ	$79,2 \pm 0,40$	$322,8 \pm 31,5$
SLN+ATZ	$39,4 \pm 0,22$	$111,5 \pm 8,78$
SLN+SMZ	$30,2 \pm 0,43$	$48,7 \pm 5,11$
SLN+ATZ+SMZ: ATZ	$53,1 \pm 0,10$	$50,9 \pm 0,69$
SLN+ATZ+SMZ: SMZ	$55,3 \pm 0,15$	$13,8 \pm 1,04$

Na literatura diversos trabalhos relatam a modificação da cinética de liberação de compostos ativos (herbicidas, inseticidas, entre outros) quando encapsulados ou funcionalizados a sistemas nanoparticulados (HERMOSIN et al.,

2001; CELIS et al., 2002; GARRIDO-HERRERA et al., 2009; MAQUEDA et al., 2009; FERNANDEZ-PÉREZ et al., 2011; GRILLO et al., 2011). GRILLO et al. (2012) encapsularam os herbicidas atrazina, simazina e ametrina a nanocapsulas de poli(ϵ -caprolactone) (PCL) e observaram modificações nos perfis de liberação. A liberação dos herbicidas através das nanocápsulas foi mais lento, em comparação aos herbicidas livres, sendo o mecanismo de liberação devido à difusão e relaxamento das cadeias poliméricas.

Encontram-se ainda basicamente três modelos descritos para a associação de compostos ativos em nanopartículas lipídicas sólidas: o modelo homogêneo de matriz, o modelo de casca rica em ativo e o de núcleo rico em ativo (SOUTO et al, 2004). A Figura 25 traz um esquema das nanopartículas lipídicas sólidas contendo os herbicidas atrazina e simazina com o núcleo rico em ativo, uma vez que a liberação destes foi bastante lenta em relação ao ativo apenas.

Figura 25: Representação esquemática das SLN contendo os herbicidas atrazina e simazina dispersas no núcleo das SLN.



4.8 Modelagem matemática para avaliação do mecanismo de liberação

Investigar o mecanismo de liberação de compostos ativos através de sistemas nanoestruturados pode trazer informações significativas a respeito dos fatores que regem a liberação destes ativos. Portanto, são descritos na literatura modelos matemáticos utilizados para analisar as propriedades de liberação dos ativos a partir de nanopartículas (COSTA e LOBO, 2001; SCHAFFAZICK et al., 2003).

Com o objetivo de investigar o mecanismo de liberação dos herbicidas ATZ e SMZ a partir das SLN, foi aplicado o modelo teórico de Korsmeyer-Peppas conforme descrito anteriormente no item 3.8 (COSTA e LOBO, 2001). A partir das curvas de liberação foram feitas as regressões lineares para determinação dos coeficientes de correlação (r) e constante de liberação (k). Os resultados obtidos com o tratamento dos dados de liberação com o modelo matemático são demonstrados na figura 26 (gráficos) e na tabela 10.

Figura 26: Resultados obtidos usando o modelo matemático de Korsmeyer-Peppas: A) SLN+ATZ, B) SLN+SMZ, C) SLN+ATZ+SMZ: ATZ e D) SLN+ATZ+SMZ: SMZ.

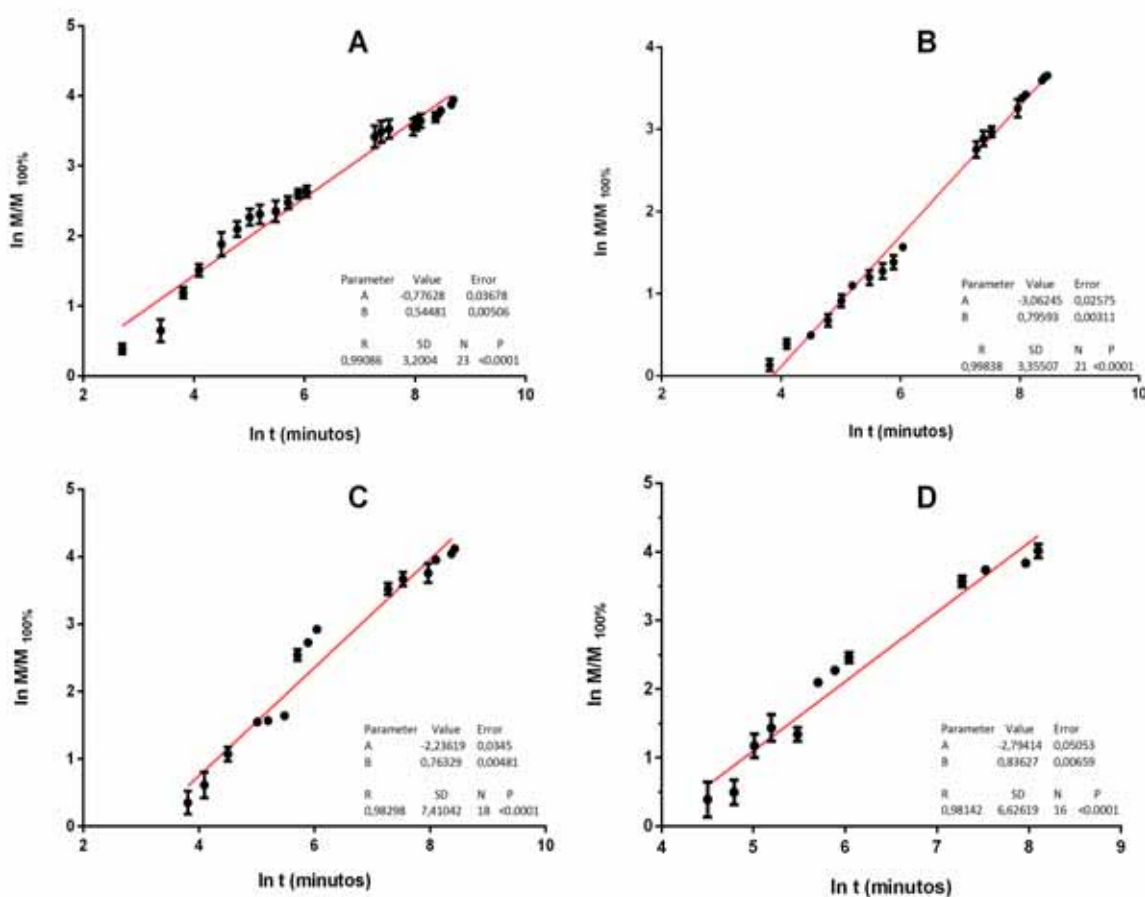


Tabela 10: Valores de constantes de liberação (k), expoente de liberação (n) e coeficiente de correlação (r) obtidos das curvas das cinéticas de liberação dos herbicidas associados às nanopartículas lipídicas sólidas.

Formulações	Constante de Liberação (k)	Expoente de Liberação (n)	Coeficiente de correlação (r)
SLN+ATZ	$1,23 \pm 0,04 \text{ min}^{-1}$	0,54	0,9908
SLN+SMZ	$0,27 \pm 0,06 \text{ min}^{-1}$	0,79	0,9983
SLN+ATZ+SMZ:ATZ	$0,40 \pm 0,03 \text{ min}^{-1}$	0,76	0,9829
SLN+ATZ+SMZ: SMZ	$0,31 \pm 0,05 \text{ min}^{-1}$	0,83	0,9814

Através do modelo matemático de Korsmeyer-Peppas, pode-se prever qual é o mecanismo que descreve a liberação dos compostos ativos a partir de sistemas nanoestruturados. Basicamente estes mecanismos podem ser por difusão do herbicida (transporte Fickiano) e/ou por transporte Caso II (PEPPAS, 1985; PEPPAS; SAHLIN, 1989;). KORSMEYER-PEPPAS (1983) determinou valores específicos de expoente de liberação (n), para indicar quais mecanismos controlam a liberação dos ativos, sendo: $n < 0,45$ indica que o mecanismo que controla a liberação do herbicida no sistema é a difusão pura, quando $n > 0,85$, a liberação do ativo se dá pelo transporte de Caso II, quando $0,45 < n < 0,85$ indica que é uma cinética de transporte anômalo, ou seja, combinação dos dois mecanismos de liberação.

Os valores de constante de liberação (k) obtidos para as formulações de SLN+ATZ, SLN+SMZ, SLN+ATZ+SMZ: ATZ, SLN+ATZ+SMZ: SMZ, foram de $1,23 \pm 0,04 \text{ min}^{-1}$, $0,27 \pm 0,06 \text{ min}^{-1}$, $0,40 \pm 0,03 \text{ min}^{-1}$, $0,31 \pm 0,05 \text{ min}^{-1}$, respectivamente, quanto maior são os valores de k mais rápida ocorre a liberação do ativo. Todos os valores obtidos para o expoente de liberação ficaram entre $0,45 < n < 0,85$, indicam portanto, uma cinética de transporte anômalo.

GRILLO et al. (2012) aplicaram o modelo de Korsmeyer-Peppas para investigar o mecanismo de liberação dos herbicidas atrazina, simazina e ametrina, a partir de nanocapsulas de poli(ε-caprolactone) (PCL). A constante de liberação (k) obtida para os herbicidas atrazina e simazina foi de $6,8 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ e $2,4 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$, respectivamente. Observa-se que assim como os resultados mostrados neste trabalho para as SLN contendo os herbicidas, a constante de liberação da

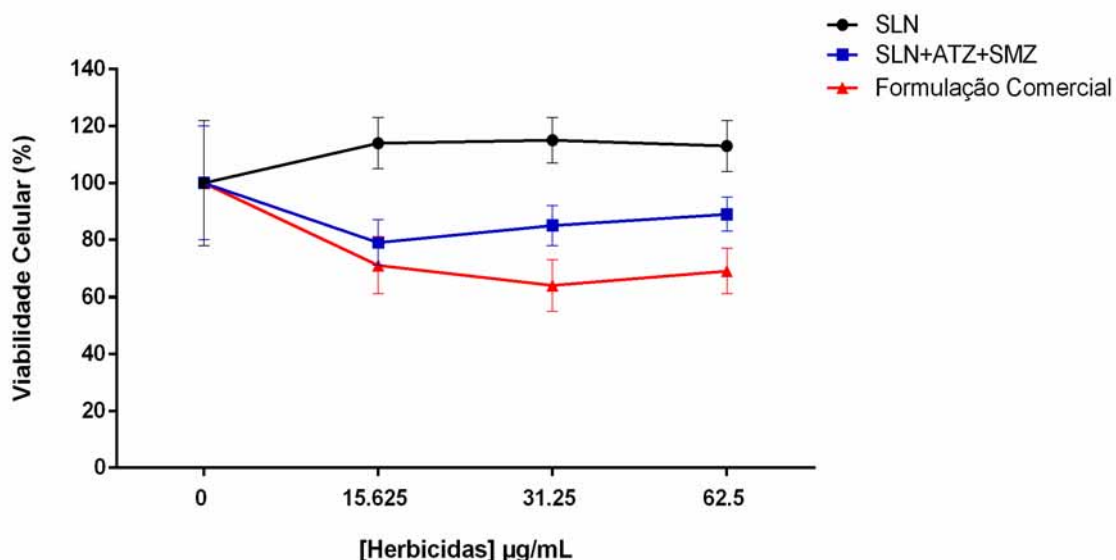
ATZ foi mais rápida quando comparada a SMZ. O mecanismo de liberação que controlou a liberação dos herbicidas através da nanocapsulas de PCL, foi o transporte de Caso II, ou seja, a liberação dos herbicidas se da pelo relaxamento da cadeia polimérica.

4.9 Avaliação da citotoxicidade através do ensaio de MTT

A figura 27 traz os resultados para o ensaio de viabilidade celular, onde foram avaliados os efeitos citotóxicos das SLN contendo os herbicidas, da formulação comercial e também das SLN na ausência dos herbicidas.

Os resultados mostram que as SLN sem a presença dos herbicidas não apresentaram citotoxicidade na faixa de concentração testada, uma vez que mantiveram a viabilidade celular em torno de 100 % para todas concentrações. Quando os herbicidas foram incorporados às SLN, observa-se que até a máxima concentração investigada a viabilidade celular foi de 80 %. Já para a formulação comercial na mesma faixa de concentração observou-se uma maior citotoxicidade, sendo o valor de viabilidade celular de 64 %. Através dos resultados é possível observar que a encapsulação dos herbicidas nas nanopartículas lipídicas sólidas causou uma diminuição no efeito citotóxico em relação ao herbicida comercial.

Figura 27: Avaliação da citotoxicidade dos herbicidas e das formulações. . Efeitos citotóxicos das SLN (com e sem fungicidas) e formulação comercial nas concentrações entre 15,625 - 31,25 e 62,5 µg/mL em células de fibroblastos de camundongos Balb-c 3T3, determinadas por redução de MTT.



Resultados semelhantes foram observados por GRILLO e colaboradores (2012) quando desenvolveram nanocápsulas de PCL contendo herbicidas triazínicos. Observou-se que através dos ensaios de *Allium Cepa* e Cometa que a encapsulação dos herbicidas reduziu a citotoxicidade e genotoxicidade dos herbicidas, quando comparado ao herbicida na forma livre. PEREIRA e colaboradores (2014) observaram que as formulações de nanocápsulas e nanoesferas de PCL contendo atrazina foram menos genotóxicas em comparação com a atrazina livre, indicando que a associação do princípio ativo com o sistema carreador foi capaz de diminuir os danos no DNA das células de *Allium cepa*.

4.10 Ensaio de Atividade Herbicida

O efeito das formulações de nanopartículas contendo atrazina e simazina, assim como das nanopartículas sem a presença dos herbicidas, foi investigado através dos tratamentos pré e pós emergência para a espécie-alvo *Raphanus raphanistrum* (Nabo) e para espécie não alvo *Zea mays* (milho). A aplicação conjunta dos herbicidas atrazina e simazina é realizada especificamente para a cultura do milho, pois este possui características que o torna resistente aos herbicidas (RODRIGUES; ALMEIDA, 2011).

A figura 28 (A e B) e Figura 29 (A e B), traz as imagens e os gráficos da parte aérea e raiz, correspondentes ao tratamento pré-emergência para a espécie-alvo. Observa-se que para a concentração 3 kg/ha, (denominada 1:1), todas as formulações causaram efeito tanto na parte aérea quanto na raiz (Figura 28-A e B) quando comparado ao controle (somente água). Porém o efeito da formulação comercial e dos herbicidas (ATZ e SMZ) encapsulados nas SLN foi significativamente maior em relação a SLN na ausência dos herbicidas (isto devido a presença do ativo). O efeito das SLN sem a presença dos herbicidas nas plantas pode estar relacionado as modificações na fisiologia da semente, ocasionando perturbações em seu desenvolvimento, ou até mesmo por causar efeitos tóxicos à mesma (MA et al., 2010; REMÉDIOS et al., 2012).

Quando as formulações foram diluídas dez vezes (1:10) observou-se que as SLN sem a presença dos herbicidas não foram fitotóxicas quando comparadas ao

controle. A formulação comercial apresentou efeito significativo apenas para a raiz, enquanto que as SLN contendo ambos os herbicidas, causaram um efeito maior tanto na parte aérea quanto na raiz das plantas quando comparadas a formulação comercial. Isto evidencia a efetividade e o potencial agrícola das SLN contendo os herbicidas. Quando aplicadas na concentração recomendada todas as formulações causaram inibição no crescimento das plantas, porém quando foram diluídas a uma concentração dez vezes menor, a formulação comercial teve seu efeito diminuído, enquanto as SLN contendo os herbicidas mantiveram-se efetivas.

A maior eficácia das SLN contendo os herbicidas pode estar relacionada a redução da sorção no solo dos herbicidas, da proteção físico-química e microbiológica que o encapsulamento proporciona e também pelo fato das nanopartículas direcionarem de maneira mais eficaz o ativo nas sementes. Outro ponto importante, demonstrado no item 4.7, é que as nanopartículas foram capazes de sustentar a liberação dos herbicidas em função do tempo, o que pode ter contribuído para a eficácia da formulação. Porém maiores experimentos devem ser realizados a fim de compreender o mecanismo de ação desta formulação nanotecnológica nas plantas.

Figura 28: Imagem das plantas (*Raphanus raphanistrum*) após tratamento pré-emergência com as formulações de nanopartículas lipídicas sólidas (SLN), formulação comercial (FC) e formulação de nanopartículas lipídicas sólidas contendo os herbicidas atrazina e simazina. Foram investigadas diferentes concentrações sendo: A) dosagem recomendada 3 kg/há (1:1); B) dosagem diluída 10 vezes (0,3 kg/ha).

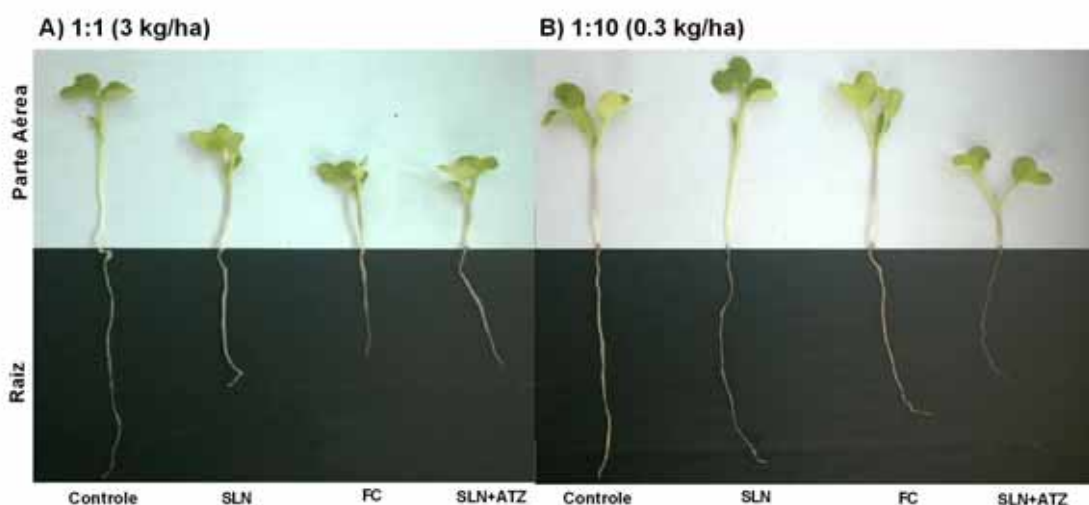
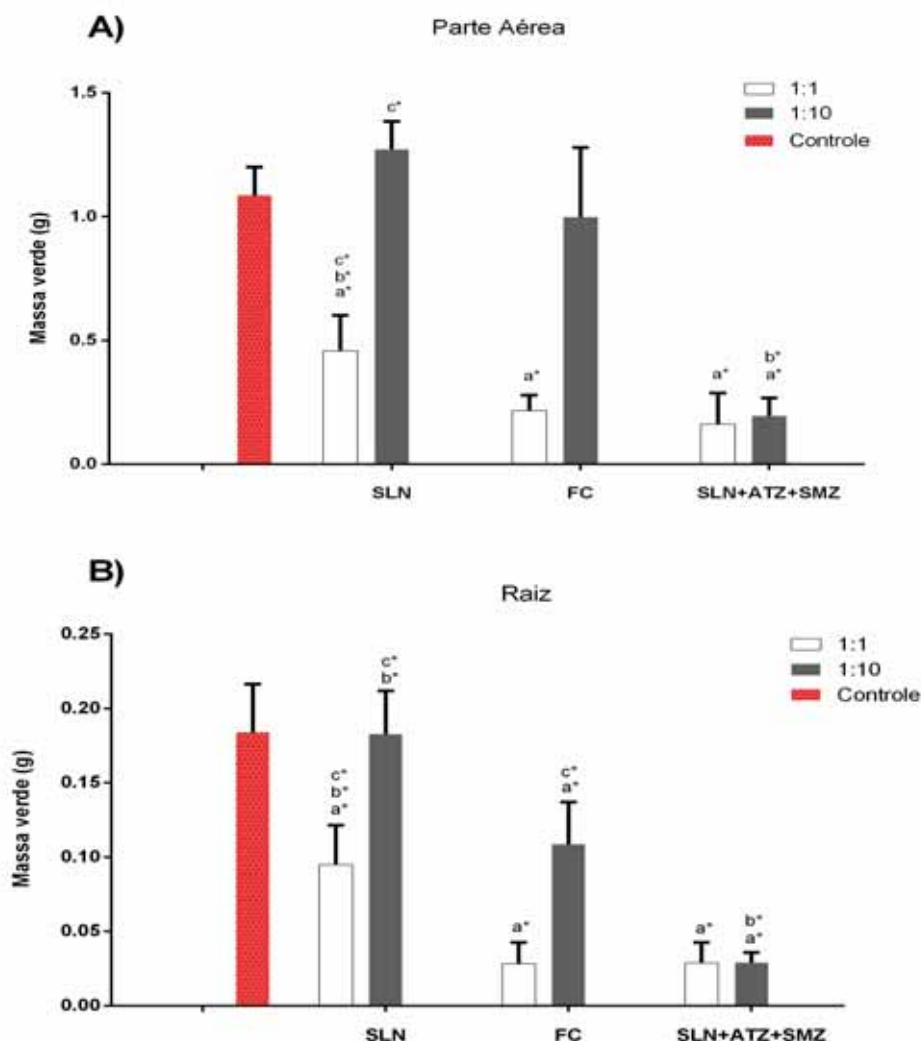


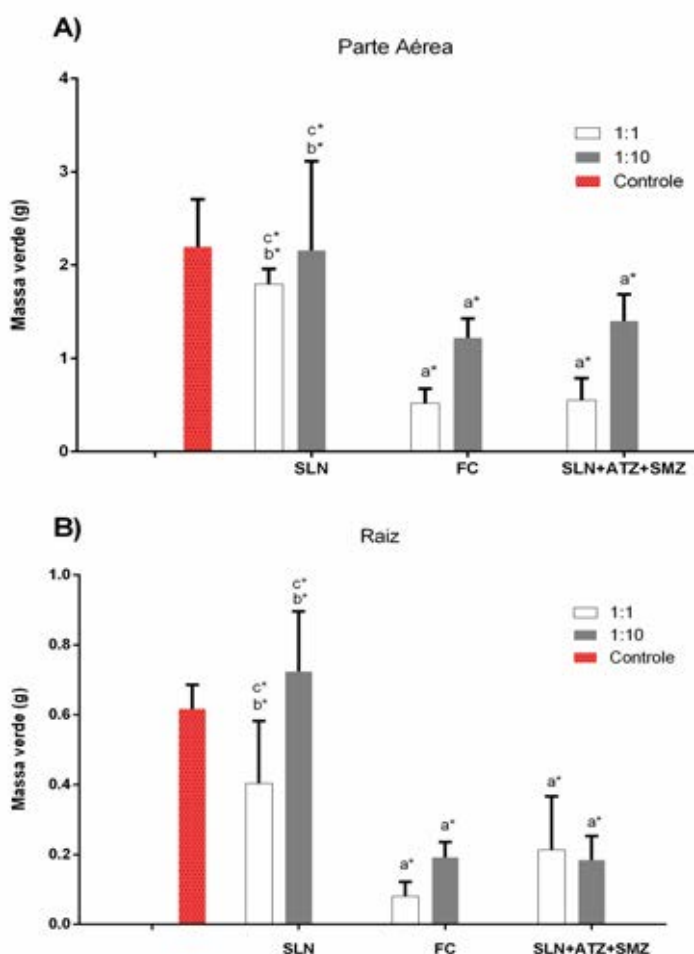
Figura 29: Tratamento Pré-emergência para espécie alvo *Raphanus raphanistrum* (Nabo). A) Massa fresca (g) para a parte aérea; B) Massa fresca (g) para a raiz. Foi considerada uma significância de $p < 0,05$ para as diferenças estatísticas observadas entre os grupos da mesma concentração, onde a* representa variações significativas entre os grupos em relação ao controle; b* comparação a formulação comercial; c* comparação com as SLN carregas com os herbicidas.



A figura 30 (A e B), traz os gráficos de massa da parte aérea e raiz, correspondentes ao tratamento pós-emergência da espécie-alvo. A aplicação das formulações no tratamento pós-emergência foi realizada de forma foliar. Observa-se que as SLN na ausência dos herbicidas não apresentaram efeito fitotóxico em ambas as concentrações, tanto para parte aérea quanto para raiz quando comparadas ao controle. Já a formulação comercial, e as SLN carregadas com os herbicidas apresentaram efeito fitotóxico em ambas as concentrações para parte aérea e raiz. Porém não foi observado diferença significativa no efeito da

formulação comercial comparada as SLN carregadas, como no tratamento pré-emergência, sendo que ambas apresentaram efeito na concentração recomendada e na diluída dez vezes.

Figura 30: Tratamento Pós-emergência para espécie alvo *Raphanus raphanistrum* (Nabo). A) Massa fresca (g) para a parte aérea; B) Massa fresca (g) para a raiz. Foi considerada uma significância de $p < 0,05$ para as diferenças estatísticas observadas entre os grupos da mesma concentração, onde a* representa variações significativas entre os grupos em relação ao controle; b* comparação a formulação comercial; c* comparação com as SLN carregas com os herbicidas.



Para os ensaios realizados com organismo não-alvo *Zea mays* (milho), observou-se que para ambas concentrações (3 kg/ha e 0,3 kg/ha), tanto para o tratamento pré-emergência (Figura 31 e Figura 32 – A e B) quanto para o pós-emergência (Figura 32 – C e D) todas as formulações não apresentaram efeito fitotóxico quando comparado ao controle.

Figura 31: Imagem das plantas (*Zea mays*) após tratamento pré-emergência com as formulações de nanopartículas lipídicas sólidas (SLN), formulação comercial (FC) e formulação de nanopartículas lipídicas sólidas contendo os herbicidas atrazina e simazina. Foram investigadas diferentes concentrações sendo: A) dosagem recomendada 3 kg/há (1:1); B) dosagem diluída 10 vezes (0,3 kg/ha).

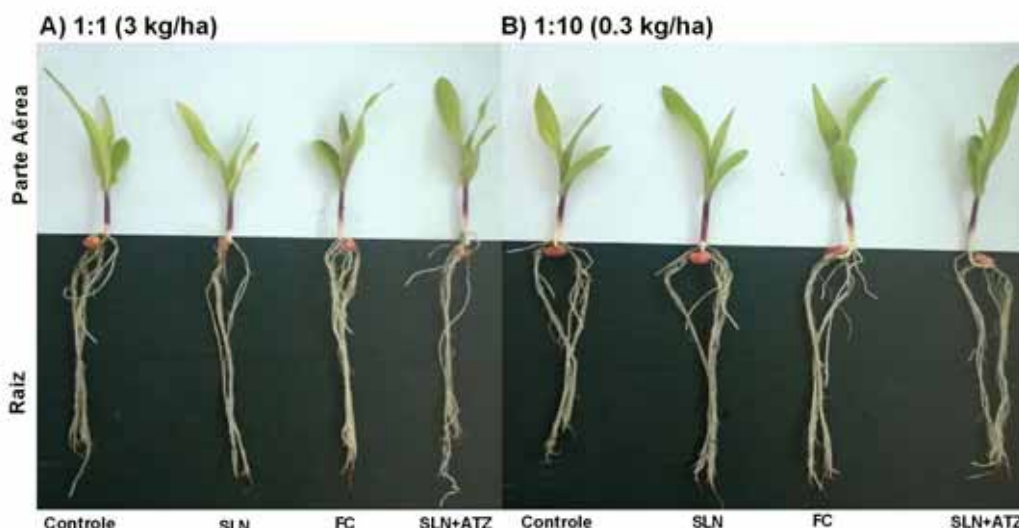
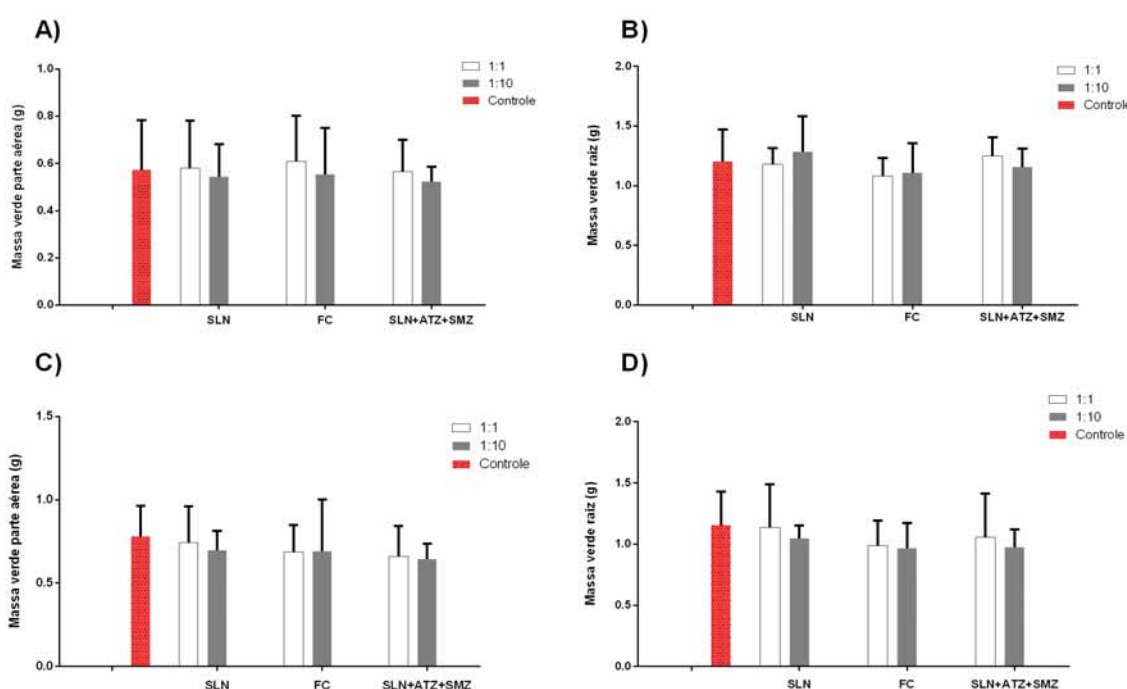


Figura 32: Tratamentos pré e pós-emergência para espécie não-alvo *Zea mays* (milho). A) Massa fresca (g) para a parte aérea após tratamento pré-emergência; B) Massa fresca (g) para a raiz após tratamento emergência; C) Massa fresca (g) para a parte aérea após tratamento pós-emergência; D) Massa fresca (g) para a raiz após tratamento pós-emergência.



A partir dos resultados apresentados acima, observa-se que ocorreram efeitos fitotóxicos das SLN nos ensaios de pré-emergência, os quais, podem ser devidos a possíveis interações das SLN com as raízes da espécie *Raphanus raphanistrum*, o que faz com que processos de absorção de água ou mesmo de nutrientes sejam alterados, ou até que estas nanopartículas possam ser absorvidas pelas raízes causando efeitos tóxicos e como consequência sofram uma redução de crescimento. Já as SLN contendo os herbicidas mostraram-se com grande potencial agrícola para o tratamento pré-emergência da espécie alvo, uma vez que apresentou significativa efetividade em relação a formulação comercial. Na literatura encontram-se diversas revisões sobre a interação de nanopartículas com plantas, e os seus efeitos fitotóxicos (MA et al., 2010; MONICA; CREMONINI, 2009; NAVARRO et al., 2008; REMÉDIOS et al., 2012; STAMPOULIS et al., 2009). No entanto, destaca-se que esta interação das SLN com a espécie *Raphanus raphanistrum* (Figura 28,29 e 30) parece ser específica, uma vez que nos ensaios com *Zea mays* não foram observados efeitos fitotóxicos das SLN nas mesmas faixas de concentração (Figura 31 e 32).

Apesar dos avanços no estudo da interação e fitotoxicidade das nanopartículas, inúmeras são as perguntas a serem respondidas sobre os impactos no ambiente e os verdadeiros efeitos biológicos destas formulações' (MA et al., 2010). Tendo em vista que as nanopartículas podem ser produzidas a partir de uma grande variedade de materiais, podendo seu mecanismo de ação estar relacionado a sua composição química, tamanho e até mesmo morfologia (MONICA; CREMONINI, 2009).

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho forneceu informações importantes sobre o preparo, caracterização, avaliação da cinética de liberação, citotoxicidade e a efetividade no controle de plantas daninhas das nanopartículas lipídicas sólidas contendo os herbicidas atrazina e simazina, preparadas pelo método de emulsificação-evaporação do solvente.

As nanopartículas foram preparadas e obteve-se uma eficiência de encapsulação de aproximadamente 90% para ATZ e 98% para SMZ, tanto para os herbicidas encapsulados separadamente quanto os encapsulados conjuntamente, indicando uma boa interação dos herbicidas com o sistema carreador. A associação dos herbicidas às nanopartículas também foi demonstrada pelas análises de infravermelho e calorimetria diferencial de varredura. As SLN apresentaram diâmetro hidrodinâmico compreendido entre 255 nm e 300 nm, um índice de polidispersão abaixo de 0,2 e potencial zeta de aproximadamente -17 mV, em função do tempo. Todas as formulações mantiveram-se praticamente estáveis, sendo a SLN contendo apenas o herbicida simazina a que apresentou melhor estabilidade físico-química. As análises de microscopia mostraram que as SLN apresentam morfologia esférica, sem a presença de agregados, porém durante o tempo de armazenamento as SLN contendo ambos os herbicidas sofreram deformações em sua estrutura. As análises de rastreamento de partículas (NTA) corroboraram com os resultados de microscopia mostrando a morfologia esférica das SLN. Os valores de diâmetro hidrodinâmico foram próximos aos fornecidos pela técnica de DLS e foram obtidas para as SLN contendo os herbicidas atrazina e simazina separadamente, uma concentração de $11,3 \pm 0,4 \times 10^{12}$ partículas/mL e $12,3 \pm 0,5 \times 10^{12}$ partículas/mL, respectivamente. Para as SLN contendo ambos os herbicidas foi obtida uma concentração de $11,7 \pm 0,6 \times 10^{12}$ partículas/mL. Os ensaios de cinética de liberação demonstraram que os perfis cinéticos dos herbicidas encapsulados (conjuntamente/separadamente) nas SLN foram mais lentos, quando comparados com os herbicidas livres. A organização dos ativos dentro das partículas ocorre de forma diferente para a encapsulação conjunta e a separada, conforme demonstrado pelos ensaios de fluxo aparente. A aplicação do modelo matemático de Korsmeyer-Peppas mostrou que o processo de liberação é governado pelo transporte anômalo. Os ensaios de atividade herbicida mostraram

que para o tratamento com a espécie não-alvo (Milho) as formulações de SLN não apresentaram efeito fitotóxico quando comparado ao controle. Já para a espécie alvo (Nabo), em um tratamento pós-emergente, as SLN contendo ambos herbicidas apresentaram a mesma eficácia que a formulação comercial. Já pra o tratamento pré-emergente as SLN carregadas com os herbicidas atrazina e simazina, mostraram ser mais eficazes quando diluídas 10 vezes, o que comprova o potencial agrícola destas formulações. Os ensaios de viabilidade celular para as formulações mostraram que as SLN exercem um efeito protetor, pois as SLN carregadas com os herbicidas apresentaram maior viabilidade celular em comparação com a formulação comercial, resultado que agrega maior potencial agrícola a formulação uma vez que além de apresentar maior efeito herbicida em menores concentrações, as SLN contendo os herbicidas são menos citotóxicas.

Os resultados abrem novas perspectivas para o uso de sistemas de liberação modificada de herbicidas, os quais podem apresentar maior eficácia no combate às pragas, além de reduzir a quantidade de produtos utilizados.

Figura 33: Resumo dos principais resultados obtidos para as formulações de nanopartículas lipídicas sólidas contendo os herbicidas atrazina e simazina

Eficiência de encapsulação – $\cong 90\%$ para ATZ e $\cong 98\%$ para SMZ

Diâmetro hidrodinâmico – Compreendido entre 255 nm e 300 nm

Índice de polidispersão – $< 0,2$

Potencial Zeta – $\cong -17$ mv

Melhor estabilidade físico-química – SLN+SMZ

FTIR e DSC – Herbicidas estão encapsulados e interagindo com SLN.

Morfologia – Esférica, deformações com 120 dias de armazenamento

Concentração – em média 11×10^{12} partículas/mL.

Cinética de Liberação – SLN modificaram o perfil de liberação dos herbicidas em relação a forma livre.

Modelagem Matemática – Transporte anômalo.

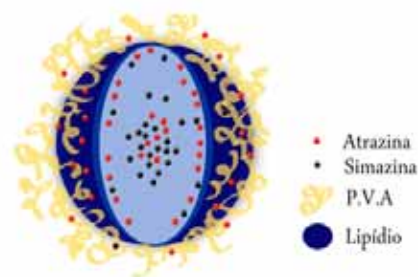
Citotoxicidade – SLN diminuíram a citotoxicidade dos herbicidas.

Atividade Herbicida :

Não apresentou efeito fitotóxico para **organismo não-alvo**

Organismo Tratamento Pós-emergente : eficácia similar a formulação comercial.

Alvo Tratamento Pré-emergente : Mais eficaz que a formulação comercial em concentração diluída 10 vezes.



6. REFERÊNCIAS

- ALVES FILHO, J. P. **Uso de agrotóxicos no Brasil: controle social e interesses corporativos**. Annablume, Fapesp: São Paulo, 2002.
- ANDERSON, W.; KOZAK, D.; COLEMAN, V. A.; JÄMTING, Å. K.; TRAU, M. A comparative study of submicron particle sizing platforms: Accuracy, precision and resolution analysis of polydisperse particle size distributions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 405, p. 322–330, 2013.
- ANDREI, E. **Compêndio de Defensivos Agrícolas**. 8ªed., Andrei Editora, 2009.
- ARANHA, I. B.; LUCAS, E. F.; Poli(Álcool Vinílico) Modificado com Cadeias Hidrocarbônicas: Avaliação do Balanço Hidrófilo/Lipófilo. **Polímeros**, v.11, n.4, p.174-181, 2001.
- ARMAS, E.D.; MONTEIRO, R.T.R.; ANTUNES, P.M.; SANTOS, M.A.P.F.; CAMARGO, P.B. Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do rio Corumbataí e principais afluentes. **Quim. Nova**, v.30, n.5, p.1119-1127, 2007.
- ATKINS, P. W.; JONES, LORETTA. **Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente**. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2012.
- AWAD, T. S.; HELGASON, T.; WEISS, J.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Effect of Omega-3 Fatty Acids on Crystallization, Polymorphic Transformation and Stability of Tripalmitin Solid Lipid Nanoparticle Suspensions. **Crystal Growth & Design**, v. 9, n. 8, p. 3405–3411, 2009.
- BARIK, T. K.; SAHU, B.; SWAIN, V. Nanosilica—from medicine to pest control. **Parasitology Research**, v. 103, p. 253–258, 2008.
- BERNAL, C.; COUTO, A. B.; BREVIGLIERI, S. T.; CAVALHEIRO, E. T. G. Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais – DSC. **Química Nova**. n. 5, p. 849-855. 2002.
- BICALHO, S. T. T.; LANGENBACH, T. Distribution of the herbicide atrazine in a microcosm with riparian forest plants. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 47, n. 6, p. 505–511, 2012.
- BOYD, R. D.; PICHAIMUTHU, S. K.; CUENAT, A. New approach to inter-technique comparisons for nanoparticle size measurements; using atomic force microscopy,

- nanoparticle tracking analysis and dynamic light scattering. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 387, n. 1-3, p. 35–42, 2011.
- BRASIL, ANVISA. Resolução - **Resolução nº 899**, Brasília, 2003.
- BRECKENRIDGE, C.B.; ELDRIDGE, J.C.; STEVENS, J.T.; SIMPKINS, J.W. Symmetrical Triazine Herbicides: A Review of Regulatory Toxicity Endpoints. Cap. 79, Hayes' **Handbook of Pesticide Toxicology**, 2010.
- BRIGHENTI, M. A., OLIVEIRA, F. M. Biologia de Plantas Daninhas. In: OLIVEIRA JR, S. R., CONSTANTIN, J., INOUE, H. M. (Eds). **Biologia e Manejo de Plantas Daninhas**. Curitiba: Omnipax, 2011, p. 1-35.
- BRITO NM, JUNIOR OPA, POLESE L, RIBEIRO ML . Validação de Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão. **Ecotoxicologia e Meio Ambiente** . v.13, p.129-146, 2003.
- BUNJES, H. Structural properties of solid lipid based colloidal drug delivery systems. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 16, n. 5, p. 405–411, 2011.
- CARNEIRO, F. F. P., W; RIGOTTO, R M; AUGUSTO, L G S. RIZZOLO, A; MULLER, N M; ALEXANDRE, V P.; FRIEDRICH, K; MELLO, M S C. Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Parte 1 - Agrotóxicos, Segurança Alimentar e Nutricional e Saúde. Rio de Janeiro: **ABRASCO**, 2012.
- CAMPOS, E. V. ; OLIVEIRA, J. L. ; FRACETO, L. F. . Applications of Controlled Release Systems for Fungicides, Herbicides, Acaricides, Nutrients, and Plant Growth Hormones: A Review. **Advanced Science, Engineering and Medicine**, 2014.
- CELIS, R.; HERMOSIN, M.C.; CARRIZOSA, M.J.; CORNEJO, J. Inorganic and organic clays as carrier for controlled release of the herbicide hexazinone. **J. Agric. Food Chem.** v.50, p.2324-2330, 2002.
- CHEN, H; YADA, R. Nanotechnologies in agriculture: New tools for sustainable development. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 22, p.585-594, 2011.
- CHOI, K-C., ADITYA, N.P., KO, S. Effect of aqueous pH and electrolyte concentration on structure, stability and flow behavior of non-ionic surfactant based solid lipid nanoparticles. **Food Chemistry** , v.147, p. 239–244, 2014.
- CIRRI, M; BRAGAGNI, M; MENNINI, N; MURA, P. Development of a new delivery system consisting in “drug – in cyclodextrin – in nanostructured lipid carriers” for

ketoprofen topical delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.80, p.46–53, 2012.

COLOMBO, G.; PADERA, R.; LANGER, R.; KOHANE, D. S. Prolonged duration anesthesia with lipid-protein-sugar particles containing bupivacaine and dexamethasone. **Prolong. Duration Local Anesth.**, v. 75, p. 458-464, 2005.

CORNEJO, L.; CELIS, R.; DOMINGUEZ, C.; HERMOSIN, M.C.; CORNEJO, J. Use of modified montmorillonites to reduce herbicide leaching in sports turf surfaces: Laboratory and field experiments. **Applied Clay Science**, v. 42, p. 284 -291, 2008.

COSTA JR., E. S.; MANSUR, H. S.; Preparação e Caracterização de Blendas de Quitosana/Poli(Álcool Vinílico) Reticuladas Quimicamente com Glutaraldeído para Aplicação em Engenharia de Tecido. **Quim. Nova** , v. 31, n. 6, p.1460-1466, 2008.

COSTA, C.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, p. 123–133, 2001.

CRUZ, L., SOARES, L., COSTA, T. D., MEZZALIRA, G., DA SILVEIRA, N. P., GUTERRES, S. S., POHLMANN, A. R. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 313, p. 198–205. 2006.

DAMALAS, C. A.; ELEFTHEROHORINOS, I. G. Dicamba and atrazine antagonism on sulfonylurea herbicides used for Johnsongrass (*Sorghum halepense*) control in corn (*Zea mays*). **Weed Technol.**, v. 15, n. 1, p. 62-67, 2001.

DAS, S; NG, K. W; TAN, H. B. R. Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): Development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs? **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.47, p.139–151, 2012.

DELGADO, I.F.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Intoxicações e uso de pesticidas por agricultores do município de Paty do Alferes, Rio de Janeiro, Brasil. **Cad Saúd Pública**. v.20, n 1, p. 180-183, 2004.

DE LIMA, R.; FEITOSA, L.; PEREIRA, A. DO E. S.; et al. Evaluation of the Genotoxicity of Chitosan Nanoparticles for Use in Food Packaging Films. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 6, p. N89–N96, 2010.

DE LIMA, R.; FEITOSA, L. O.; GRILLO, R.; PEREIRA, A. E.; FERNANDES, L. Evaluation of the genotoxicity of polymeric microparticles containing ametryn herbicide. **Revolution**, v. 2, p. 3, 2012.DURAN, N., MARCATO, D. P.

Nanobiotechnology perspectives. Role of nanotechnology in the food industry: a review. **Int. j. food sci. technol.**, v.48, p. 1127–1134, 2013.

DO CARMO, D. A. et al. Environmental behavior and toxicity of herbicides atrazine and simazine. **Ambiente e Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 8, n. 1, 2013.

EL BAHRI, Z.; TAVERDET, J. L. Elaboration and characterisation of microparticles by pesticide model. **Powder Technology**, v. 172, p. 30-40, 2007.

European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 13, p. 123–133, 2001.

EXTOXNET (EXTENSION TOXICOLOGY NETWORK). **Pesticides information profiles**. Disponível em: <<http://extoxnet.orst.edu/pips/simazine.htm>>. Acesso em: 23 de dezembro 2013.

FERNADÉZ-PÉREZ, M.; VILLAFRANCA-SÁNCHEZ, M.; FLORES-CÉSPEDES, F.; DAZA-FERNANDÉZ, I. Ethylcellulose and lignin as bearer polymers in controlled release formulation of chloridazon. **Carbohydr. Polym.**, v.83, p.1672-1679, 2011.

FIEL, L. A.; PAESE, K.; RIZZI, M.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. A strategy to estimate the intrinsic flux of a poorly water soluble substance for comparison with its release from lipid-core nanocapsules. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 441, p. 716–724, 2014.

FILIFE, V.; HAWES, A.; JISKOOT, W. Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 5, p. 796–810, 2010.

GARRIDO-HERRERA, F. J.; DAZA-FERNÁNDEZ, I.; GONZÁLEZ-PRADAS, E.; FERNÁNDEZ-PÉREZ, M. Lignin-based formulations to prevent pesticides pollution. **Journal of Hazardous Materials**, v. 168, p. 220–225, 2009.

GASCO, M. R. Method for producing solid lipid microspheres having a narrow distribution. US Patent Nº 5250236, 1993.

GILLESPIE, C.; HALLING, P.; EDWARDS, D. Monitoring of particle growth at a low concentration of a poorly water soluble drug using the NanoSight LM20. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 384, n. 1-3, p. 233–239. doi: 10.1016/j.colsurfa.2011.03.052, 2011.

GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V.; PAKNIKAR, K. M. Perspectives for nano-biotechnology enabled protection and nutrition of plants. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 792–803, 2011.

- GOSWAMI, A; ROY, I; SENGUPTA, S; DEBNATH, N. Novel applications of solid and liquid formulations of nanoparticles against insect pests and pathogens. **Thin Solid Films**, v.519, p.1252–1257, 2010.
- GRAYMORE, M., STAGNITTII, F., ALLINSON, G.. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. **Environ. Int.**, v. 26, p. 483-495, 2001.
- GREENWOOD, R. Review of the measurement of zeta potentials in concentrated aqueous suspensions using electroacoustics. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.106, p.55-81, 2003.
- GRESSEL, J. Synergizing herbicides. **Reviews of Weed Science**, Champaign, v.5, p.49-82, 1990.
- GRILLO, R.; dos SANTOS, N.Z.P.; MARUYAMA, C.R.; ROSA, A.H.; LIMA, R.; FRACETO, L.F. Poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules as carriers systems for herbicides: Physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. **J. Hazard. Mater.** v.231, p.1-9, 2012.
- GRILLO, R.; MELO, N.F.S.; LIMA, R.; LOURENÇO, R.W.; ROSA, A.H.; FRACETO, L.F. Characterization of atrazine-loaded biodegradable poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) microspheres. **J, Polym, Environ.** V.18, p.26-35, 2010.
- GRILLO, R.; PEREIRA, A.E.S.; MELO, N.F.S.; PORTO, R.M.; FEITOSA, L.O.; TONELLO, P.S.; FILHO, N.L.D.; ROSA, A.H.; LIMA, R.; FRACETO, L.F. Controlled release system for ametryn using polymer microspheres: Preparation, characterization and release kinetics in water. **J. Hazard. Mater.** V.186, p.1645-1651, 2011.
- GUO, H.; ZHANG, J.; LIU, Z.; YANG, S.; SUN, C. Effect of Tween80 and β -cyclodextrin on the distribution of herbicide mefenacet in soil–water system. **Journal of Hazardous Materials**, v. 177, p. 1039-1045, 2010.
- GUTERRES, S.S.; POLETO, F.S.; COLOMÉ, L.M.; RAFFI, R.P; POHLMANN A.R. **Polymeric Nanocapsules for Drug Delivery An Overview**, 2010.
- HERMOSIN, M.C.; CALDERÓN, M.J.; AGUER, J-P.; CORNEJO, J. Organoclays for controlled release of the herbicide fenuron. **Pest Manag. Sci.** v.57, p.803-809, 2001.
- HESS, F.D. Light dependent herbicides - An overview. **Weed Science**, v. 48, p.160-170, 2000.
- HEURTAULT, B. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, v. 24, n. 23, p. 4283–4300, 2003.

- INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos - DOC CGRE-008, Brasília, 2010. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf>
- INOUE, M. H., OLIVEIRA, JR. R. S., REGITANO, J. B., TORMENA, C. A., TORNISIELO, V. L., CONSTANTIN, J. Critérios para a avaliação do potencial de lixiviação dos herbicidas comercializados no estado do Paraná. **Planta Daninha**, v. 21, n. 2, p. 313-323, 2003.
- JORES, K.; MEHNERT, W.; DRECHSLER, M.; et al. Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy. **Journal of Controlled Release**, v. 95, n. 2, p. 217–227, 2004
- JOSHI, M.D.; MÜLLER, R.H. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, p. 161-172, 2009.
- KAH, M., BEULKE, S., TIEDE, K., HOFMANN, T. Nanopesticides: State of Knowledge, Environmental Fate, and Exposure Modeling. **Crit. Rev. Env. Sci. Technol.** v.43, p. 1823–1867, 2013.
- KAH, M., HOFMANN, T. Nanopesticide research: Current trends and future priorities. **Environment International**, v.63, p. 224–235, 2014.
- KODAMA, T.; DING, L.; YOSHIDA, M.; YAJIMA, M. Biodegradation of an s-triazine herbicide, simazine. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 11, p.103–1078, 2001.
- KORSMEYER, R. W.; PEPPAS, N. A. **Macromolecular and modeling aspects of swelling-controlled systems**. In: Roseman TJ, Mansdorf SZ (Eds.). Controlled release delivery systems. New York, USA: Marcel Dekker Inc, 1991.
- KORSMEYER, R.W.; GURNY, R.; DOELKER, E.; BURI, P.; PEPPAS, N.A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **Int. J. Pharm.**, v. 15, p. 25-35, 1983
- LEBRAON, H.M.; MCFARLAND, J.E.; BURNSIDE, O.C. **The Triazine Herbicides: 50 years Revolutionizing Agriculture**, 2008.
- LI, Z.; WANG, Y.; SHEN, J.; LIU, W.; SUN, X. The measurement system of nanoparticle size distribution from dynamic light scattering data. **Optics and Lasers in Engineering**, v. 56, p. 94–98, 2014.

LIMA-E-SILVA, P. P.; GUERRA, A. J. T.; MOUSINHO, P.; BUENO, C.; ALMEIDA, F. G.; MALHEIROS, T. M. M.; SOUZA JR., A. B. **Dicionário brasileiro de ciências ambientais**. 2. ed. Rio de Janeiro: Thex Editora, 2002.

Liquid chromatographic determination of simazine, atrazine and propazine residues in catfish. **J. aoac intern.**, v.78, p.1067-1071, 1995.

MA, X.; GEISER-LEE, J.; DENG, Y.; KOLMAKOV, A. Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation. **Science of The Total Environment**, v. 408, n. 16, p. 3053–3061, 2010.

MANDAWGADE, S.D., SHOBHONA, S., PATHAK S., PATRAVALE, V.B. Development of SMEDDS using natural lipophile: Application to Artemether delivery Int. **J. Pharm.** v. 362, p.179–183, 2008.

MAQUEDA, C.; VILLAVARDE, J.; SOPENA, F.; UNDABEYTIA, T.; MORILLO, E. Novel System for Reducing Leaching of the Herbicide Metribuzin Using Clay-Gel-Based Formulations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p.11941–11946, 2008.

MAQUEDA, C.; VILLAVARDE, J.; SOPEÑA, F.; UNDABEYTIA, T.; MORILLO, E. Effects of soil characteristics on metribuzin dissipation using Clay-Gel Based formulations. **J. Agric. Food Chem.** v.57, p.3273-3278, 2009.

MARCATO, P. D. Preparation, characterization and application in drugs and cosmetics of solid lipid nanoparticles. **Revista Eletrônica de Farmácia**. Vol 6(2), 1-37, 2009.

MARCHI, G.; MARCHI, E. C. S.; GUIMARÃES, T. G. **Herbicidas: mecanismos de ação e uso**, Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2008.

MARTINELLI, A.; MATIC, A.; JACOBSSON, P.; BÖRJESSON, L.; NAVARRA, A. M.; FERNICOLA A.; PANERO, S.; SCROSATI, B.; Structural analysis of PVA-based proton conducting membranes. **Solid State Ionics**, v.177, p. 2431-2435, 2006.

MEHNERT W, MADER K. Solid lipid nanoparticles. Production, characterization and applications. **Adv Drug Del Rev.** v. 47, p. 165–96, 2001.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A review. **Tropical J. Pharm. Res.** v. 5, p. 561-573, 2006.

MONICA, R. C.; CREMONINI, R. Nanoparticles and higher plants. **Caryologia**, v. 62, n. 2, p. 161, 2009.

MORAGAS, M. W., SCHNEIDER, M. O. **Biocidas: suas propriedades e seu histórico no Brasil**. In: **Caminhos de geografia** (revista online), v.10, setembro de 2003. Disponível na Internet em http://www.ig.ufu.br/revista/volume10/artigo03_vol10.pdf. Arquivo consultado em 2014.

MORA-HUERTAS, C.E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **Int. J. Pharm.**, v. 385, p. 113-142, 2010.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de Óleos e Gorduras Vegetais**. São Paulo: Varela, 1998, 150p.

MORGAN, K. T., KENT E. C., SHINJIRO, S. Release Mechanisms for Slow- and Controlled release Fertilizers and Strategies for Their Use in Vegetable Production. **Hortechology**, v.1, p. 19, 2009.

MOUSAVI, R. S., REZAEI, M. Nanotechnology in Agriculture and Food Production. **J. Appl. Environ. Biol. Sci.**, v. 10, p.414-419, 2011.

MÜLLER H. R., MADER K., GOHLA S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. **Euro. Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.50, 161-177, 2000.

MÜLLER, R. H.; LUCKS, J. S. Medication vehicles made of solid lipid particles (solid lipid nanospheres - SLN). Eur. Patent Nº 0605497. Germany, 1996.

MÜLLER, R.H., RUNGE, S.A., RAVELLI, V., THÜNEMANN, A.F., MEHNERT, W., SOUTO, E.B. Cyclosporine-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): Drug–lipid physicochemical interactions and characterization of drug incorporation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.68, p. 535–544, 2008.

MULQUEEN, P. Recent advances in agrochemical formulation. **Advances in colloid and interface science**, v. 106, n. 1, p. 83–107, 2003

NAIR, R.; VARGHESE, S.H.; NAIR, B.J.; MAEKAWA, T.; YOSHIDA, Y.; KUMAR, D.S. Nanoparticulate material delivery to plants. **Plant Science**. v.179, p.154-163, 2010.

NAVARRO, E.; BAUN, A.; BEHRA, R.; et al. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. **Ecotoxicology**, v. 17, n. 5, p. 372–386, 2008.

NEMEN, D; LEMOS-SENNA, E. Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. **Quim. Nova**, Vol. 34, No. 3, p.408-413, 2011.

OLIVEIRA JR, S. R. Introdução ao Controle Químico. In: OLIVEIRA JR, S. R., CONSTANTIN, J., INOUE, H. M. (Eds). **Biologia e Manejo de Plantas Daninhas**. Curitiba: Omnipax, p. 1-35.

PAAVOLA A.; YLIRUUSI, J.; KAJIMOTO, Y.; KALSO, E.; WAHLSTRÖM, T.; ROSENBERG, P. Controlled release of lidocaine from injectable gels and efficacy in rat sciatic nerve block. **Pharm. Res.**, v. 12, p. 1997-2002, 1995.

PACIONI, N.L., VEGLIA, A.V. Determination of poorly fluorescent carbamate pesticides in water, bendiocarb and promecarb, using cyclodextrin nanocavities and related media. **Anal. Chim. Acta.** v.583, p.63-71, 2007.

PAN, Pesticides Action Network; **Pesticides Registration Status**. Disponível em: <<http://www.pesticideinfo.org>> Acessado em: 30 de Outubro de 2013.

PANDEY, R; SHARMA, S; KHULLER, K. G. Oral solid lipid nanoparticle-based antitubercular chemotherapy. **Tuberculosis**, v.85, p.415–420, 2005.

PAQUES, W. F., MACEDO, A. G. Lipases de Látex vegetais: Propriedades e Aplicações industriais. **Quim. Nova**, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.

PARDEIKE, J., HOMMOSS, A., MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics**, v.366, p. 170-184, 2009.

PEPPAS, N.A. & SAHLIN, J.J. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. **Int. J. Pharm.**, v. 57, p. 169-172, 1989.

PEPPAS, N.A. Analysis of fickian and non-fickian drug release from polymers. **Pharm. Acta Helv.**, v. 60, n. 4, p. 110-111, 1985.

PEREIRA, A. E. S.; GRILLO, R.; MELLO, N. F. S.; ROSA, A. H.; 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**, v. 268, p. 207–215, 2014.

PERES, F.; MOREIRA, J. C. Saúde e ambiente em sua relação com o consumo de agrotóxicos em um pólo agrícola do Estado do Rio de Janeiro, Brasil Health, environment, and pesticide use in a farming area in Rio de Janeiro State, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 23, n. Sup 4, p. S612-S621, 2007.

PERLATTI, B., BERGO, S. L. P., DA SILVA, F. G. F. M., FERNANDES, B. J., FORIM, R. M. **Polymeric Nanoparticle-Based Insecticides: A Controlled Release Purpose for Agrochemicals**. In: STANISLAV, T. (Ed). *Insecticides - Development of Safer and More Effective Technologies*. Intech, 2013, p. 523-550.

Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/insecticides-development-of-safer-and-more-effective-technologies/polymeric-nanoparticle-based-insecticides-a-controlled-release-purpose-for-agrochemicals>>

PETERSON, D.; THOMPSON, C. R.; SHOUP, D. E.; OLSON, B. L. **Herbicide Mode of Action**, Kansas State University, Abril, 2013. Disponível em: <<http://www.ksre.ksu.edu/bookstore/pubs/c715.pdf>>

RAI, M., INGLE, A. Role of nanotechnology in agriculture with special reference to management of insect pests. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.94, p.287–293, 2012.

READING, M.; CRAIG, D. Q. M. **Thermal Analysis of Pharmaceuticals**. CRC Press, p. 1-21. 2006.

REIS, C. P.; NEUFELD, R. J.; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I: Methods preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 2, p. 8-21, 2006.

REMÉDIOS, C.; ROSÁRIO, F.; BASTOS, V. Environmental Nanoparticles Interactions with Plants: Morphological, Physiological, and Genotoxic Aspects. **Journal of Botany**, v. 2012, p. 1–8, 2012.

RICHARDSON, M.L. GANGOLLI, S. **The dictionary of substances and their effects**. Cambridge, Royal Society of Chemistry, p.44-47,1994.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. 6^a. ed. Edição dos autores: Londrina, p. 591, 2011.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quim. Nova**, v. 26, p. 726-737, 2003.

SENSEMAN, S.A., **Herbicide Handbook**. 9^a edição. Champaign, EUA: Weed Science Society of America, p. 458, 2007.

SEVERINO, P., ANDREANI, T., MACEDO, S. A. et al., Current State-of-Art and New Trends on Lipid Nanoparticles (SLN and NLC) for Oral Drug Delivery. **Journal of Drug Delivery**, v. 2012, p.10, 2012.

SHAVIV, A. Advances in Controlled Release of Fertilizers. **Advances in Agronomy**, v.71, p.1-49, 2000.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N.A. Modelling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, p. 139-157, 2001.

SILVA, C. M. S; FAY, E. F. **Agrotóxicos e Meio Ambiente** – Brasília, DF – Embrapa Informação Tecnológica, 2004.

SILVA, M. S.; COCENZA, D.S.; GRILLO, R.; MELO, NATHALIE F. S.; TONELLO, P.S.; OLIVEIRA, L.C.; CASSIMIRO, D.L.; ROSA, A. H.; FRACETO, L.F. Paraquat loaded alginate/chitosan nanoparticles: preparation, characterization and soil sorption studies. **Journal of Hazardous Materials**, v. 190, p. 366-374, 2011.

SILVA, M.S.; COCENZA, D.S.; DE MELO, N.F.S.; GRILLO, R.; ROSA, A.H.; FRACETO, L.F. Nanopartículas de alginato como sistema de liberação para o herbicida clomazone. **Química Nova**, 2010.

SINDAG. **Venda de defensivos segue em alta no Brasil**. Disponível em: <http://www.sindag.com.br/noticia.php?News_ID=2337>. Acessado em 04 abril de 2014.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A.; **Princípios de Análise Instrumental**, 5ª Ed. Bookman: porto Alegre, 2002.

SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B.. **Química Orgânica**, 7a. ed., LTC - Livros SOPEÑA, F.; MAQUEDA C.; MORILLO E. Controlled release formulations of herbicides based on micro-encapsulation. **Cien. Ciencia e Investigación Agraria**, v.35, p. 27 42, 2009.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable Polymeric Nanoparticles as Drug Delivery Devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1-20, 2001.

SOUTO, B. E; SEVERINO, P; SANTANA, A. H. M; PINHO, C. S. Nanopartículas de lipídios sólidos: Métodos clássicos de produção laboratorial. **Quim. Nova**, Vol. 34, No. 10, 1762-1769, 2011.

SOUTO, E. B.; MÜLLER, R. H. The use of SLN® and NLC® as topical particulate carriers for imidazole antifungal agents. **Die Pharmazie**, v. 61, p. 431-437, 2005.

SOUTO, E.B.; MÜLLER, R.H. Cosmetic features and applications of lipid nanoparticles (SLN® , NLC®). **International Journal of Cosmetic Science**. v. 30, n. 3, p. 157–165, 2008.

SOUTO, E.B.; WISSING, S.A.; BARBOSA, C.M.; MULLER, R.H. Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 278, n. 1, p. 71-77, 2004.

SOUZA, P. M. S.; LOBO, F. A.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F. Desenvolvimento De Nanocápsulas De Poli-E-Caprolactona Contendo O Herbicida Atrazina. **Quim. Nova**, V. 35, p. 132-137, 2012.

STAMPOULIS, D.; SINHA, S. K.; WHITE, J. C. Assay-Dependent Phytotoxicity of Nanoparticles to Plants. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 24, p. 9473–9479, 2009.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E.C.; PEZZIN, A.P.T.; MEIER, M.M.; SILVA, D.A.K. Biodegradable Microspheres of Poly(3-hydroxybutyrate)/Poly(e-caprolactone) loaded with Malathion Pesticide: Preparation, Characterization, and In Vitro Controlled Release Testing. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 117, p. 3419–3427, 2010.

VAN DEN WYNGAERT, S. et al. Herbicides in the environment alter infection dynamics in a microbial host-parasite system: Infection dynamics and environmental pollution. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 837–847, 2013.

VILLAVERDE, J.; MAQUEDA, C.; MORILLO, E. Effect of the simultaneous addition of beta-cyclodextrin and the herbicide norflurazon on its adsorption and movement in soils. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 54, p. 4766- 4772, 2006.

VITORINO, C., CARVALHO, A. F., ALMEIDA, J. A., SOUSA, J. J., PAIS, C. C. A. A. The size of solid lipid nanoparticles: An interpretation from experimental design. **Colloids Surf. B**, v. 84, p. 117–130, 2011.

WHO World Health Organization. The WHO **Recommended Classification of Pesticide by Hazard and Guidelines to Classification**, 2004. <http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard_rev_3.pdf>. Acesso em 04 de abril de 2014.

WISSING, S. A., KAYSER, O., MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 1257-1272, 2004.

XU, R. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. **Particuology** v.6, p. 112-115, 2008.

YI, Y.; XU, S.; SUN, H.; CHANG, D.; YIN, Y.; XU, H.; LOU, Y. Gelation of photocrosslinkable carboxymethyl chitosan and its application in controlled release of pesticide. **Carbohydr. Polym**, v.86, p.1007-1013, 2011.

YUAN, H. et al., Preparation and characteristics of nanostructured lipid carriers for control-releasing progesterone by melt-emulsification. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.60, p.174–179, 2007.

ZHANG, G. X et al. Reversal activity of nanostructured lipid carriers loading cytotoxic drug in multi-drug resistant cancer cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 361, p.239–244, 2008.