



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

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS**

**PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE  
NANOCARREADORES LIPÍDICOS HÍBRIDOS  
VISANDO A LIBERAÇÃO CONTROLADA DO  
HERBICIDA ATRAZINA**

Débora Ribeiro Antunes

Ilha Solteira - SP

Março /2020

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS**

**PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCARREADORES  
LIPÍDICOS HÍBRIDOS VISANDO A LIBERAÇÃO  
CONTROLADA DO HERBICIDA ATRAZINA**

Débora Ribeiro Antunes

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

Área de conhecimento: Química dos Materiais

**Orientador:** *Prof. Dr. Renato Grillo*

Ilha Solteira - SP

Março /2020

FICHA CATALOGRÁFICA  
Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

A636p Antunes, Débora Ribeiro.  
Preparo e caracterização de nanocarreadores lipídicos híbridos visando a liberação controlada do herbicida atrazina / Débora Ribeiro Antunes. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2020  
67 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Química dos Materiais , 2020

Orientador: Renato Grillo  
Inclui bibliografia

1. Carreadores lipídicos nanoestruturados . 2. Herbicidas . 3. Liberação modificada.

  
Raiane da Silva Santos  
Supervisora Técnica de Seção

Seção Técnica de Referência, Atendimento ao usuário e Documentação  
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação  
CRB/8 - 9999

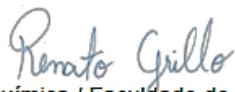
**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**


**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:** PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCARREADORES LIPÍDICOS HÍBRIDOS VISANDO A LIBERAÇÃO CONTROLADA DO HERBICIDA ATRAZINA


**AUTORA:** DÉBORA RIBEIRO ANTUNES

**ORIENTADOR:** RENATO GRILLO

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

Prof. Dr. RENATO GRILLO   
Departamento de Física e Química / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP

Profa. Dra. MARCIA REGINA DE MOURA AOUADA   
Departamento de Física e Química / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP

Prof. Dr. LEONARDO FERNANDES FRACETO   
Departamento de Engenharia Ambiental / Instituto de Ciências e Tecnologia de Sorocaba - UNESP

Ilha Solteira, 26 de março de 2020

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”. (Paulo Beleki)

## AGRADECIMENTOS

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

Aos meus pais, Marcia e Manoel, por todo exemplo, paciência e apoio.

À minha família, pelo incentivo, que mesmo distante sempre esteve presente a cada etapa da minha vida.

Ao meu namorado Guilherme, por estar sempre do meu lado, me dando a força que preciso para alcançar meus objetivos.

Sou muito grata ao meu orientador, Prof. Dr. Renato Grillo, pela orientação e conhecimentos transmitidos e pela inspiração e motivação.

Ao Grupo de Nanoquímica Ambiental: Luiz, Maíra, Mariana, Érica, Yasmim, Manoela pelo companheirismo e por toda ajuda.

Ao meu amigo Denys, pelo incentivo, pela ajuda, pelo carinho, e por fazer parte de momentos importantes da minha vida, e terá minha eterna gratidão.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao CNPq (#427498/2018-0) e a FAPESP (#2017/21004-5) pelo auxílio financeiro.

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

Ao corpo docente, funcionários e amigos do Departamento de Física e Química (DFQ) da UNESP Campus de Ilha Solteira, pela contribuição na realização desse projeto, e por ajudar em meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço ao Laboratório de Nanotecnologia Ambiental da UNESP de Sorocaba pelas análises de DLS e NTA, em especial Prof. Dr. Leonardo F. Fraceto.

Agradeço também ao Grupo de Química Analítica e Materiais Nanoestruturados (GAMN) pelo uso do espectrofotômetro UV-VIS e de alguns equipamentos importantes para a realização deste trabalho, bem como ao Grupo de Polímeros (GPOL) pelas análises térmicas e DRX, em especial Dr. Alex Otávio Sanches pelas discussões e auxílio nas análises.

Ao servidor Élton José de Souza pelas análises de MEV.

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

À profa. Dr. Márcia R. M. Aouada, por ter concedido seu equipamento Turrax para o preparo dos nanocarreadores.

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

## RESUMO

Inúmeros sistemas nanoestruturados vêm sendo desenvolvidos para o transporte e liberação modificada de defensivos agrícolas nos últimos anos. Tais sistemas vêm se mostrando uma potencial ferramenta para reduzir a toxicidade destes ingredientes ativos no ambiente, bem como vêm melhorando a eficiência de pesticidas no campo. Entretanto pouco se conhece sobre o destino, toxicidade e mecanismos de ação destes nanocarreadores no ambiente. Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver potenciais sistemas de liberação modificada, encapsulando o herbicida atrazina (ATZ) em carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) sem e contendo nanopartículas inorgânicas (magnéticas ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$ ) e plasmônicas ( $\text{Au}@CTAB$ )), a fim de construir um sistema de liberação marcado que possa ser rastreado, auxiliando assim em futuras análises destes nanocarreadores no ambiente. Para o desenvolvimento das nanoformulações a técnica de emulsificação/evaporação solvente foi aplicada e diversos métodos físico-químicos foram empregados para a sua caracterização. As nanoformulações permaneceram estáveis por mais de 60 dias à temperatura ambiente. Além disso, os CLNs demonstraram ter índice de polidispersão (PDI)  $< 0,2$ , potencial zeta entre  $-5,38 \pm 0,27$  a  $-23,5 \pm 1,25$  mV e uma eficiência de encapsulação maior que 90 % para a ATZ. As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelaram ausência de agregados e morfologia esférica ao sistema. Além disso, as técnicas de espectroscopia de Infravermelho (FTIR) e Raio-X (DRX) confirmaram a encapsulação da ATZ na matriz lipídica. Análises de NTA e DLS mostraram que os CLNs apresentaram tamanho médio compreendido entre 215 e 427 nm, variando conforme se associavam as nanopartículas inorgânicas. As análises térmicas de DSC demonstraram pequenas mudanças, com o encapsulamento da ATZ e com as nanopartículas inorgânicas. Os ensaios de cinética de liberação *in vitro* se comparado aos diferentes sistemas estudados (CLN:ATZ, CLN:ATZ\_Au@CTAB e CLN:ATZ\_Fe3O4@OA) houve modificação na cinética de liberação da ATZ, porém todos apresentaram liberação modificada através do mecanismo de transporte super caso-II, que consiste em fenômenos de inchamento/relaxamento da matriz lipídica. Avaliou-se também o efeito herbicida dos diferentes CLNs contendo ATZ em planta aquática (*Lemna valdiviana*), e observou-se que as formulações foram mais efetivas que a ATZ pura. Assim, esses sistemas permitem a redução da dose de herbicida, e abrem novas perspectivas para a compreensão do destino e comportamento destes nanocarreadores no ambiente, uma vez que podem ser rastreados devido a presença de nanopartículas inorgânicas.

**Palavras chaves:** Carreadores lipídicos nanoestruturados, Herbicidas, Liberação modificada.

## ABSTRACT

Several nanostructured has been developed for the modified release system of pesticides in recent years. Such systems have been shown to be a potential tool to reduce the toxicity of active ingredients in the environment, as well as improving the efficiency of pesticides in the field. However, little is known about the fate, toxicity, and mechanisms of action of these nanocarriers in the environment. In this sense, the objective of the present work was to develop potential modified release systems, encapsulating the herbicide atrazine (ATZ) in nanostructured lipid carriers (CLNs) without and with inorganic (magnetic (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@OA) and plasmonic (Au@CTAB)) nanoparticles), in order to build a label release system that can be tracked, helping in future analyzes of these nanocarriers in the environment. For the development of nanoformulations, the solvent emulsification / evaporation technique was applied, and several physicochemical analyses were used evaluated. For instance, the nanoformulations showed to be stable for more than 60 days at room temperature. Besides, CLNs have been shown to have a polydispersity index (PDI) <0.2, zeta potential between  $-5.38 \pm 0.27$  to  $-23.5 \pm 1.25$  mV and encapsulation efficiency > 90% for ATZ. Scanning electron microscopy (SEM) analyzes revealed the absence of aggregates and spherical morphology to the system. Also, Infrared spectroscopy (FTIR) and X-ray (DRX) techniques confirmed the encapsulation of ATZ in the lipid matrix. Analysis of NTA and DLS showed that the CLNs presented an average size between 215 and 427 nm, changing according to the inorganic nanoparticles. DSC analysis showed small changes between the treatments when associated ATZ and inorganic nanoparticles inside the CLNs. Also, the *in vitro* release kinetics showed differences in the release profile of each nanoformulation. The release mechanism of all nanoformulations was super case-II transport, which consists of swelling/relaxation phenomena of the lipid matrix. The herbicidal effect of the different CLNs containing ATZ was also evaluated, using an aquatic plant (*Lemna valdiviana*), and it was observed that the formulations were more effective than ATZ non-encapsulated. Thus, these systems allow the reduction of the herbicide dose, and open new perspectives for understanding the fate and behavior of these nanocarriers in the environment, since they can be traced due to the presence of inorganic nanoparticles.

**Keywords:** Nanostructured lipid carriers, Herbicides, Controlled release.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>IA</b>	Ingrediente ativo
<b>AO</b>	Ácido oleico
<b>ATZ</b>	Atrazina
<b>Car</b>	Carotenoide
<b>CLNs</b>	Carreadores lipídicos Nanoestruturados
<b>Chl</b>	Clorofila
<b>CTAB</b>	Brometo de cetiltrimetilamônio
<b>DLS</b>	Espalhamento de luz dinâmico
<b>DRX</b>	Difração de Raios-X
<b>DSC</b>	Calorimetria exploratória diferencial
<b>E.E</b>	Eficiência de encapsulação
<b>ERO</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>Fv / Fm</b>	Eficiência quântica fotoquímica
<b>FTIR</b>	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
<b>Ic</b>	Índice de cristalinidade
<b>ICH</b>	Conselho Internacional para Harmonização
<b>LD</b>	Limite de detecção
<b>LQ</b>	Limite de quantificação
<b>MEV</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura
<b>NBT</b>	Nitroazul de tetrazólio
<b>NIR</b>	Espectroscopia de infravermelho próximo
<b>NPs</b>	Nanopartículas
<b>NTA</b>	Rastreamento de nanopartículas
<b>PCL</b>	Poli- $\epsilon$ -caprolactona
<b>PDI</b>	Índice de polidispersão
<b>PNIPAm</b>	Poli(N-isopropilacrilamida)
<b>PVA</b>	Álcool polivinílico
<b>PZ</b>	Potencial zeta
<b>SLN</b>	Nanopartículas lipídicas sólidas
<b>TBARS</b>	Ácido tiobarbitúrico
<b>TG</b>	Termogravimetria
<b>UV-VIS</b>	Espectroscopia de Absorção molecular no ultravioleta / visível

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>1.1 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	13
1.1.1 Agricultura e nanotecnologia .....	13
1.1.2 Nanopesticidas.....	16
1.1.3 Nanopesticidas híbridos.....	18
1.1.4 Carreadores lipídicos nanoestruturados para liberação de defensivos agrícolas .....	20
1.1.5 Organismos Fotoautotróficos .....	21
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	23
<b>2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	23
<b>3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	24
<b>3.1 MATERIAIS</b> .....	24
<b>3.2 MÉTODOS</b> .....	24
3.2.1 Padronização da metodologia analítica para o herbicida .....	24
3.2.2 Sínteses das nanopartículas inorgânicas .....	25
3.2.2.1 Síntese das nanopartículas superparamagnéticas de óxido de Ferro estabilizadas com ácido oleico .....	25
3.2.2.2 Síntese das nanopartículas de ouro estabilizadas com CTAB.....	25
3.2.2.3 Sínteses dos carreadores lipídicos híbridos .....	26
3.2.3 Eficiência de encapsulação do herbicida atrazina .....	27
<b>3.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICAS DAS NANOFORMULAÇÕES</b> .....	28
3.3.1 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial zeta .....	28
3.3.2 Rastreamento de nanopartículas (NTA) .....	28
3.3.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier ( <i>FTIR</i> )	29
3.3.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	30
3.3.5 Difração de raios-X (DRX) .....	30
3.3.6 Análises térmicas .....	31
3.3.6.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....	31
3.3.6.2 Termogravimetria (TG) .....	31
3.3.7 Medidas de estabilidade das formulações (pH) .....	32
<b>3.4 CINÉTICA DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO HERBICIDA</b> .....	32
<b>3.5 EFEITOS DOS CLNs EM PLANTAS AQUÁTICAS</b> .....	34
3.5.1 Superóxido de dismutase (SOD) e Peroxidação lipídica.....	34

3.5.2	Teor de pigmento .....	35
3.5.3	Eficiência quântica .....	35
<b>3.6</b>	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>36</b>
<b>4.1</b>	<b>PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA O HERBICIDA ATZ ..</b>	<b>36</b>
<b>4.2</b>	<b>EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DO HERBICIDA ATRAZINA .....</b>	<b>37</b>
<b>4.3</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS NANOCARREDORES HÍBRIDOS ...</b>	<b>38</b>
4.3.1	Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial zeta. ....	38
4.3.2	Rastreamento de nanopartículas (NTA) .....	40
4.3.3	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier ( <i>FTIR</i> ) ..	41
4.3.4	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	42
4.3.5	Difração de raios-X (DRX) .....	44
4.3.6	Análises térmicas .....	46
4.3.6.1	Calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....	46
4.3.6.2	Termogravimetria (TG) .....	48
<b>4.4</b>	<b>MEDIDAS DE ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES (pH) .....</b>	<b>51</b>
<b>4.5</b>	<b>CINÉTICA DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO HERBICIDA .....</b>	<b>51</b>
<b>4.6</b>	<b>EFEITO DOS CLNs EM PLANTAS AQUÁTICAS.....</b>	<b>54</b>
4.6.1	Superóxido dismutase (SOD) e peroxidação lipídica .....	55
4.6.2	Teor de pigmento .....	56
4.6.3	Eficiência Quântica .....	57
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>60</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O uso inadequado de defensivos agrícolas tem causado uma série de problemas ambientais, tais como resistência a patógenos, contaminação de recursos naturais, bioacumulação a cadeia trófica e redução da biodiversidade. Atrelado a isto, muito dos defensivos agrícolas apresentam baixa solubilidade aquosa e problemas de instabilidade físico-química, podendo ser facilmente degradados ou adsorvidos no ambiente. Estudos apontam que apenas cerca de 10 a 0,1% destes ativos chegam efetivamente ao seu destino final (ZHAO et al., 2017) o que provoca um excesso de contaminantes no ambiente e risco à saúde humana (VALCKE et al., 2017).

Atualmente, inúmeros sistemas de liberação de defensivos agrícolas vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de amenizar estes problemas de toxicidade e instabilidade (KAH; TUFENKJI; WHITE, 2019). Tais sistemas utilizam carreadores, como hidrogéis, micro ou nanopartículas, constituídos de polímeros biodegradáveis, lipídios, proteínas, argilas, sílica, os quais são capazes de aprisionar pesticidas, fertilizantes, material genético de plantas, produtos naturais ou hormônio em sua estrutura. A associação de ingredientes ativos (IA) aos carreadores pode ocorrer por diversas maneiras, desde interações físicas ou ligações covalentes, proporcionando uma liberação retardada do IA no campo. Além disso, estes carreadores podem melhorar a dispersão do IA em água, prevenindo contra degradação físico-química precoce (OLIVEIRA et al., 2018), aumentar a fertilidade do solo (RALIYA et al., 2017), e a eficiência no controle de pragas (FRACETO, 2014; OLIVEIRA et al., 2018). Diversos estudos descrevem as potencialidades destes sistemas de liberação para a agricultura, e apontam potenciais benefícios em relação as formulações convencionais já existentes, tais como: i) estabilização contra a degradação ambiental por fatores físico-químicos, ii) dosagem reduzida, iii) redução na evaporação e lixiviação do IA., iv) aumento do número de organismos-alvo, v) aumentos nos intervalos de aplicação, entre outros (PETEU et al., 2010).

Entretanto, apesar dos inúmeros benefícios, pouco se conhece sobre o mecanismo de ação destes carreadores, bem como o seu destino e efeito no ambiente. Entre os carreadores, os nanopesticidas são os mais estudados atualmente, pois devido ao seu tamanho reduzido (< 1000 nm) podem ser mais reativos, e por consequência interagem mais com o ambiente. Além disso, poucas são as técnicas analíticas capazes de detectar/rastrear nanopesticidas no solo, plantas ou outros organismos, o que dificulta estudos relacionados ao destino e comportamento destes sistemas. Como exemplo, Jacques e colaboradores 2017 desenvolveram nanopesticidas marcados com um lipídio fluorescente para avaliar seu destino, comportamento e efeito tóxico em nematoides presentes no solo (*C. elegans*). Em um outro estudo, (GOMES et al., 2019), o

efeito de nanopesticidas marcados com sondas fluorescentes em outra classe de nematoide (*E. Crypticus*) foi avaliado, porém não foi possível rastrear os nanopesticidas no organismo dos animais. Desta forma, o desenvolvimento de outros tipos de nanopesticidas marcados, capazes de serem identificados por outras técnicas analíticas, que não sejam apenas por fluorescência, devem ser urgentemente desenvolvidos, a fim de melhorar a compreensão desta nova tecnologia que vem abrindo caminho para uma agricultura de precisão e sustentável. Assim, o objetivo deste trabalho consistiu em desenvolver nanopesticidas associados com nanopartículas inorgânicas, tais como ouro e óxido de ferro, em nanocarreadores lipídicos nanoestruturados (CLN). Assim, estes nanopesticidas híbridos, quando presentes no ambiente, poderão ser identificados e rastreados por outras técnicas analíticas, tais como, espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), “single particle ICP-MS”, espectroscopia de absorção atômica, microscopia de Raio-X, entre outras. Além disso, associando estas nanopartículas inorgânicas aos nanopesticidas, os CLNs podem ganhar propriedades inteligentes, como por exemplo, podem ser facilmente manipulados através de suas propriedades magnéticas ou apresentar liberação responsiva a luz, através da capacidade fototérmica das nanopartículas de ouro incorporadas aos nanocarreadores.

## **1.1 Revisão da literatura**

### *1.1.1 Agricultura e nanotecnologia*

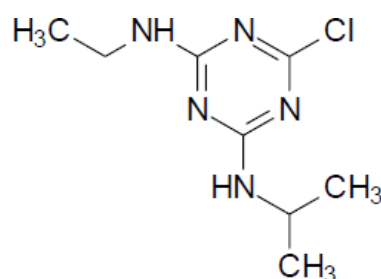
O desenvolvimento de novas tecnologias agrícolas que sejam sustentáveis é essencial para a continuidade da atividade humana no planeta. Sabe-se que o fornecimento de alimentos, acessíveis e seguro ao consumidor tem enfrentado desafios para atender às necessidades de uma crescente população mundial. Estima-se que a população chegará em aproximadamente 9 a 10 bilhões de pessoas em 2050, e assim surge a necessidade de fornecer cerca de 25 a 70% mais alimentos em relação aos que estão sendo produzidos atualmente.

Neste sentido, os defensivos agrícolas são amplamente utilizados, uma vez que seu uso tem protegido as plantações de pragas, assegurando boas colheitas e eficiência na produção de alimentos (HONGDA CHEN, 2014). Apesar destes benefícios, sabe-se que uma grande parte dos defensivos agrícolas aplicados no campo não atingem seu destino final (ANDROUTSOPOULOS et al., 2013). Assim, o uso excessivo destes ativos resultou na contaminação de espécies terrestres e aquáticas em todo o mundo (AKTAR; SENGUPTA; CHOWDHURY, 2009). Este tipo de exposição ao ser humano pode ser por diferentes vias, incluindo: (i) rotas diretas, por exemplo, oral, cutânea e inalatória e (ii) rotas indiretas, por exemplo, exposição ocupacional e consumo de

alimentos (KENNEDY et al., 2015). Essa exposição aos defensivos pode levar a vários problemas de saúde relacionados a alergia, distúrbios neurológicos, problemas endócrinos, entre outros (ANDROUTSOPOULOS et al., 2013; GEORGE; SHUKLA, 2011; LAMMOGLIA et al., 2017; RICHENDRFER; CRETON, 2015). Desta forma, muitos esforços têm sido direcionados para a identificação de interações entre contaminantes e a estrutura dos ecossistemas para evitar a contaminação não intencional destas moléculas no ambiente (BROGAN; RELYEA, 2017).

Como exemplo, os herbicidas triazínicos são mundialmente um dos compostos mais presentes nas águas superficiais e subterrâneas, vindo a representar 80,7% dos contaminantes encontrados em amostras de água superficial e subterrânea (MALISKA, 2000). Dentro desse grupo se destaca o herbicida atrazina (2-cloro-4-etilamina-6-isopropilamina-s-triazina) apresentada como um sólido cristalino branco, com estrutura química representada por um anel triazínico substituído com cloro, etilamina e isopropilamina representada na Figura 1 (CHARLES B. BRECKENRIDGE, CHARLES ELDRIDGE, JAMES T. STEVENS, 2010). O mecanismo de ação deste herbicida ocorre pela inibição da fotossíntese, coibindo o fotossistema II, pois competem pelo sítio de ligação da molécula de plastoquinona na proteína D1, acarretando a saída da plastoquinona, interrompendo a transferência de elétrons entre os fotossistemas (DAS; MONDAL, 2014). Quando ocorre o bloqueio no fluxo de elétrons entre os fotossistemas, os elétrons não são convertidos em energia, 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 (PFISTER; ARNTZEN, 1979).

**Figura 1.** Estrutura química do herbicida atrazina

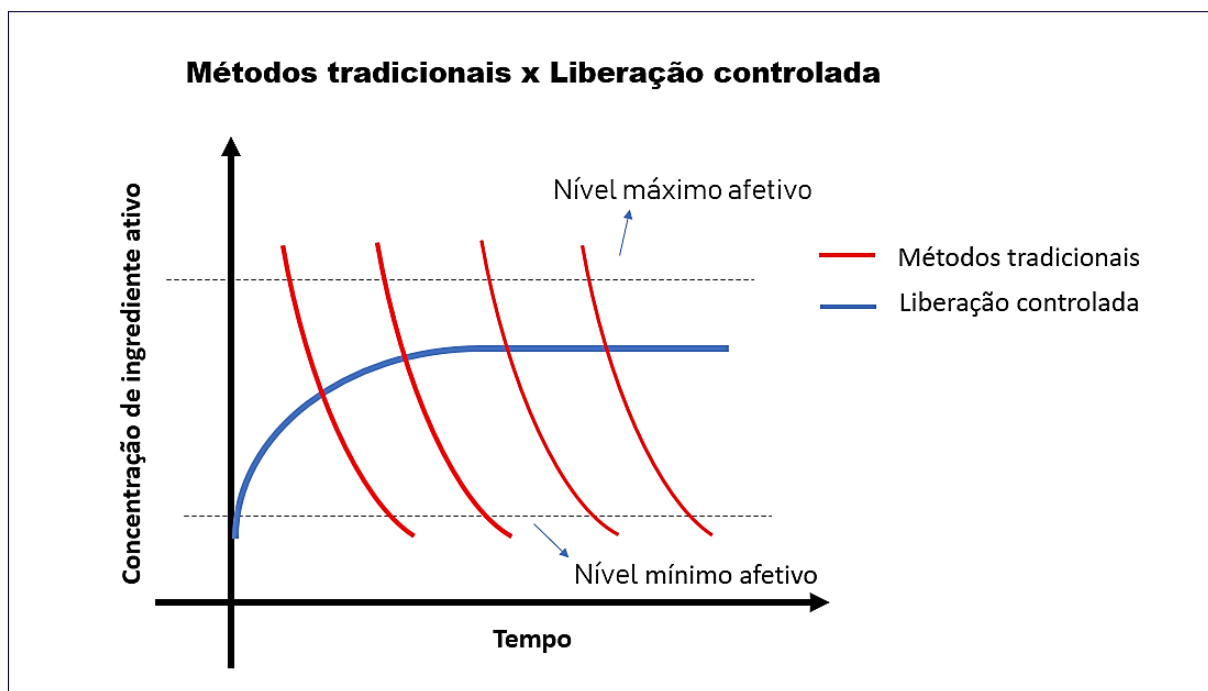


Nas últimas décadas, com o rápido crescimento das inovações tecnológicas levou-se a profundas mudanças estruturais no setor agrícola, entre elas, pode-se destacar a aplicabilidade segura de defensivos agrícolas para o abastecimento adequado de alimentos, a fim de amparar as

culturas contra doenças, pragas e ervas daninhas, bem como garantir a saúde dos animais e trabalhadores no campo (KAH, 2015). Com os avanços tecnológicos, tem se desenvolvido novas formulações com ingredientes ativos de interesse para agricultura. Basicamente estas formulações tem por objetivo aumentar a solubilidade destes ativos, liberá-los de uma forma lenta e/ou protegê-los contra a degradação prematura. Assim, o uso da nanotecnologia veio como uma alternativa para amenizar os riscos que esses defensivos agrícolas causam no ambiente, e ainda garantir, uma maior qualidade dos alimentos.

A nanotecnologia, faz uso de materiais e partículas com pelo menos umas das dimensões em escala nanométrica e tem potencial de revolucionar a agricultura, na aplicação dos atuais defensivos agrícolas (incluindo fertilizantes, herbicidas, pesticidas, inseticidas, fungicidas, antimicrobianos) (CHAUDHRY; CASTLE, 2011; CHEN; YADA, 2011). Tais sistemas, utilizam uma menor quantidade de defensivos agrícolas para atingir o alvo desejado, e apenas uma parte do ativo está imediatamente disponível, sendo que sua maior quantidade fica encapsulada em uma matriz inerte. Desta forma, o defensivo agrícola é liberado lentamente, de acordo com o mecanismo específico de cada carreador como mostrado na Figura 2 (BRUNO PERLATTI; SILVA; FORIM, 2013).

**Figura 2.** Representação dos sistemas de liberação pelos métodos tradicionais versus liberação controlada.



Fonte: Autoria própria

Recentemente as pesquisas tem indicado que por meio da nanotecnologia é possível impactar positivamente o setor agroalimentar. Assim, novos nanomateriais baseados no uso de nanopartículas inorgânicas, poliméricas e lipídicas, tem sido sintetizado por diferentes técnicas (por exemplo, emulsificação, gelificação iônica, polimerização, oxirredução, etc.). Além disso, eles podem ser aplicados no desenvolvimento de nano-sistemas inteligentes, os quais podem liberar o IA somente em condições adequadas. Portanto, tais sistemas têm a vantagem de minimizar lixiviação, melhorando a absorção de nutrientes pelas plantas e reduzindo toxicidade (CAMARA et al., 2019; FRACETO et al., 2016). Além disso, os nanocarreadores são altamente úteis para a proteção dos defensivos contra condições ambientais adversas (como alta temperatura e radiação), enquanto aumentam consideravelmente sua estabilidade, isso também aumenta a dispersão e a molhabilidade dos pesticidas, diminuindo assim o risco de escoamento. Além disso, suas propriedades podem ser vistas devido à grande área superficial, estabilidade térmica, natureza biodegradável e maior afinidade com espécies-alvo. Todos esses fatores dependem principalmente das características específicas do material encapsulado (COOPER, 2010). No entanto, riscos e benefícios devem ser avaliados destas novas formulações para a agricultura a fim de compreender como tais nanocarreadores poderão integrar o ciclo de vida e dos animais. Além da produção agrícola, muitos outros setores, incluindo a produção e saúde animal, gêneros alimentícios ou preservação ambiental, podem se beneficiar das aplicações da nanotecnologia e possivelmente receberão maior atenção no futuro.

### *1.1.2 Nanopesticidas*

Entre uma ampla gama de possíveis aplicações da nanotecnologia na agricultura, houve um interesse particular em desenvolver novos nanopesticidas e nanofertilizantes, que consiste em utilizar defensivos agrícolas já existentes e associá-los a carreadores nanométricos, através de um processo de reformulação (KAH et al., 2018). Os nanopesticidas podem ter a capacidade de suprimir doenças das culturas, agindo diretamente sobre patógenos, comumente por mecanismos de geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), inibidores da fotossíntese, inibidores da divisão celular, inibidores de lipídios, entre outros mecanismos. Por exemplo, a nutrição aprimorada por meio de nanofertilizantes poderia promover defesa de plantas que está ligada as vias de resistência sistêmica, e são diretamente influenciadas pelo tamanho das cargas, carga superficial/potencial zeta, índice de distribuição de tamanho/polidispersão (PDI) e componentes encapsulados com nanopartículas (DIMKPA et al., 2019). No entanto, os mecanismos envolvidos destes nanopesticidas permanecem largamente desconhecidos e mais pesquisas são

necessárias antes que qualquer generalização possa ser feita. Sem contar que uma avaliação crítica desses novos sistemas comparados aos convencionais é essencial para avaliar os benefícios e riscos associados.

Com relação aos tipos de nanoformulação, a maioria dos estudos apresenta formulações à base de polímeros biodegradáveis (e.x. quitosana, alginato), lipídios (tripalmitina, triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos e ceras) ou proteínas (zeína). Os nanocarreadores lipídicos, por exemplo, têm sido relatados como nanocarreadores coloidais promissores para sistemas de liberação controlado de bioativos devido a sua boa estabilidade físico-química e natureza não tóxica. Atualmente, as nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) (MÜLLER, RAINER AND LUCKS, 1996), foi por algum tempo o carreador de escolha para liberação de fármacos e alguns defensivos agrícolas, uma vez que combina a permeabilidade dos lipossomas, com a biodisponibilidade das emulsões, apresentando um sistema com alta estabilidade térmica e fácil escalonamento. Porém devido a estrutura altamente cristalina dos lipídios utilizados no preparo das SLN, estes nanocarreadores subsequentemente apresentavam espaços limitados para as moléculas de bioativos e eventualmente resultavam em uma rápida liberação (NAHAK et al., 2015). Tal limitação foi superada com uma mescla de lipídios líquidos e sólidos no preparo destes nanocarreadores, e assim foi criada uma segunda classe de SLN chamadas de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs). Os CLNs vêm apresentando resultados bastante satisfatórios, com respeito a alta eficácia de encapsulação, boa estabilidade físico-química, liberação sustentada, bem como proteção do ativo contra degradação externa (NAHAK et al., 2015). As vantagens dos CLNs em relação aos sistemas de entrega convencionais (lipossomos, emulsões, nanopartículas poliméricas e nanopartículas lipídicas sólidas) incluem a proteção de compostos a degradação química, um aumento da capacidade de carga dos compostos ativos nas partículas, menor teor de água da suspensão de partículas e minimizando a expulsão do composto ativo durante o armazenamento (LI; GE, 2012).

O que difere os CLN das nanopartícula lipídicas solidas (SLNs), é que os SLN são produzidos a partir de modelos de microemulsão, substituindo o lipídio líquido (óleo) por um lipídio sólido (isto é, lipídio sólido na temperatura ambiente) ou uma mistura de lipídios sólidos (SHAH et al., 2017). As principais desvantagens do uso dos SLN, é o vazamento de ingrediente ativo durante o armazenamento, e isso levou ao desenvolvimento de CLNs, as moléculas lipídicas exibem polimorfismo e podem, portanto, fazer a transição para formas cristalinas consecutivas sem qualquer alteração na estrutura interna, devido à natureza amorfa dos compostos de transição, e assim permite a incorporação de IA que fica retido na matriz lipídica, e assim se obtém um armazenamento prolongado (MAKONI; KASONGO; WALKER,

2019). O lipídio das matrizes de SLN sofrem modificação polimórfica, levando a uma redução na quantidade amorfa regiões da matriz devido a transições  $\alpha$  e/ou  $\beta$  para a forma estável  $\beta$  levando expulsão do I.A do SLN. As partículas de CLN solidificam com resfriamento, mas não recristalizam e, portanto, permanecem em um estado amorfo (MAKONI; KASONGO; WALKER, 2019).

Há vários relatos sobre a preparação de dispersão de nanopartícula lipídicas desde que foram descritas pela primeira vez no início dos anos 90, incluindo homogeneização a alta pressão (GOHLA, 2000, SCHUSTER, 1993), microemulsão (GASGO, 1993), evaporação de solventes (SJSTRM; BERGENSTFIHL, 1992) entre outras. Portanto, a matriz estrutural dos CLNs é derivada de uma mistura de lipídios sólidos e líquidos que são misturados em combinação específica. Transportadores lipídicos inovadores, como CLNs, têm potencial para sustentar e modelar a liberação. Porém, poucos estudos foram relatados sobre seu uso para liberação de defensivos agrícolas (NGUYEN et al., 2012a).

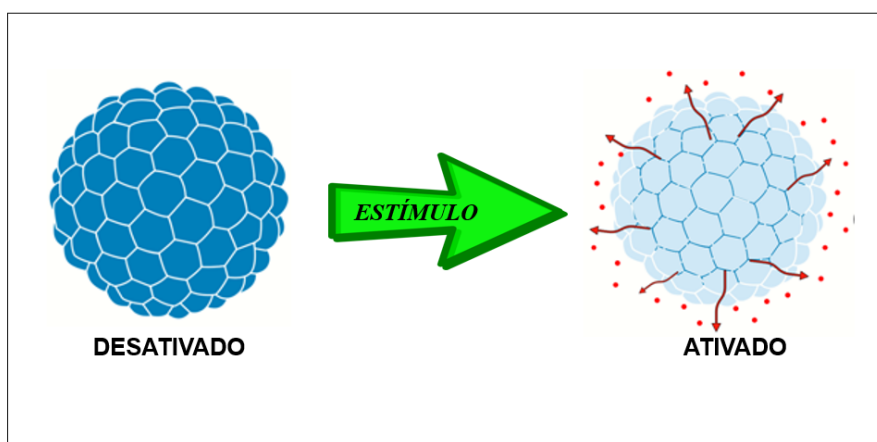
Embora os nanopesticidas tenham alcançado alguns resultados positivos, o nível de caracterização destes materiais ainda é limitado, e a repetitividade e reprodutibilidade dos resultados, é um requisito fundamental. A compreensão do mecanismo, de como os defensivos agrícolas podem ser melhorados através de efeitos nano-específicos é ainda mais valiosa (BABICK et al., 2016). Como exemplo, sabe-se que o herbicida atrazina associado em nanocápsulas de PCL possui efeito positivo para algumas culturas, mas não se sabe ao certo o desfecho deste ativo no ambiente e nas plantas (JACQUESA et al., 2017). Entretanto, abster a aplicação de “nanoativos” até que sejam provados inteiramente seguros é irreal, já que todos os defensivos agrícolas são tóxicos (pelo menos para a praga alvo) e portanto já estão associados a algum risco (KAH, 2015). Existe, portanto, uma clara necessidade de caracterizações, minuciosas desses nanopesticidas. Atualmente, não há muitos estudos na literatura que avalie a eficácia, impacto ambiental em condições de campo, e nem sobre comparações entre nano e os defensivos agrícolas convencionais, necessitando assim de estudos para avaliar os verdadeiros benefícios ou riscos associados ao uso de nanopesticidas.

### **1.1.3 Nanopesticidas híbridos**

Nos últimos tempos, os nanopesticidas ganharam grande popularidade, no entanto, seus benefícios poderão ser expandidos, se adicionar ao seu arsenal a capacidade de se conhecer os mecanismos de liberação e a localização de cada carreador em um determinado organismo alvo (GOMES et al., 2019). Neste sentido, carreadores de liberação inteligentes, mais específicos, que

possam ser rastreados e tenham a capacidade de responder a estímulos, tais como variação da temperatura, luz, densidade, força iônica, força mecânica, concentração de metabólitos ou enzimas no interior de organismos alvo pode ser uma potente ferramenta para o desenvolvimento do setor agrícola. Assim, se espera com estes carreadores inteligentes que a liberação do IA para o ambiente seja como um “gatilho” quando em contato com o estímulo, promovendo uma liberação controlada, garantindo condições ideais de absorção do ativo em seu alvo (Figura 3).

**Figura 3.** Representação da liberação de bioativos em nanocarreadores quando o gatilho é acionado por conta de algum estímulo produzido.



Fonte: próprio autor.

Neste sentido, os nanocarreadores híbridos vem sendo desenvolvidos, os quais consistem na mistura de dois componentes (ou mais) em uma só formulação, como é o caso, por exemplo, da associação de nanopartículas inorgânicas em nanocarreadores orgânicos. Este tipo de sistema híbridos podem ser capazes de liberar uma grande quantidade do ingrediente ativo por mais tempo se comparado com outros sistemas e ainda sugere que a eficiência da liberação de pesticidas pode ser ainda maior. Além disso, pode permitir uma maior taxa de absorção pelas plantas, bem como utilizar material inorgânico como macro ou micronutrientes para as culturas não-alvo (SCHROEDER et al., 2019; LI et al., 2019). Por exemplo, um estudo realizado por Yunhao e seus colaboradores (GAO et al., 2019) na fabricação de um sistema híbrido de sílica mesoporosa oca, responsiva ao pH, para a liberação controlada do inseticida abamectina, exibiu alta eficiência de encapsulação e boa estabilidade, além de não apresentar influência no crescimento de mudas de arroz quando tratadas por esse sistema, indicando ser um candidato promissor para o manejo de pragas.

Apesar disto, alguns sistemas híbridos podem ser influenciados por alguns agentes fototérmicos ou magnéticos incorporados aos carreadores. Nestes sistemas, materiais com propriedades fototérmicas (e.g. ouro NPs, polidopamina NPs, etc) ou magnéticas (e.g. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs), podem ser excitados por um estímulo luminoso ou campo magnético, e assim converter energia magnética ou fotônica em energia térmica produzindo calor, levando ao encolhimento das matrizes poliméricas ou lipídica, permitindo assim a liberação controlada do ativo (WENG et al., 2017). Apesar deste tipo de carreador ser muito explorado para a área médica, pode ser um potente sistema para a agricultura, caso as condições de estímulo sejam otimizadas para o campo. Por exemplo (XU et al., 2017) desenvolveram um sistema de responsivo ao infravermelho próximo (NIR) para liberação controlada de pesticidas. Microesferas de polidopamina foram preparadas, e recobertas com o polímero PNIPAm para a encapsulação do inseticida imidaclopride e tiveram excelente resposta à luz NIR (808 nm com potência irradiada de 2 W/cm<sup>2</sup>).

Atualmente, as abordagens envolvendo processamento inteligente são sinergicamente acoplados, permitindo adaptar sistemas híbridos de vários formatos, com domínios satisfatórios em diferentes escalas de tamanho, composição, funcionalidade e morfologia. Materiais híbridos com caráter orgânico-inorgânico representam não apenas um novo campo de pesquisa básica, mas também, por suas notáveis novas propriedades e natureza multifuncional (SANCHEZ, 2011). Sem contar, com a capacidade de ser melhor identificado em diversas técnicas analíticas.

#### *1.1.4 Carreadores lipídicos nanoestruturados para liberação de defensivos agrícolas*

Nas últimas décadas, houve um interesse crescente em sistemas de administração de defensivos agrícolas à base de lipídios, como carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), pois oferecem a possibilidade de uma liberação controlada e inúmeros benefícios, como fotoproteção de pesticidas (KUMAR et al., 2019; LI, 2012; NAHAK et al., 2015; SHAH et al., 2017). Por exemplo, Nguyen e seus colaboradores 2012 construíram um sistema de nanocarreadores lipídicos (CLN) com boa eficiência de encapsulação e maior fotoproteção para o inseticida deltametrina, em comparação com nanopartículas lipídicas sólidas (SLN), o CLN forneceu uma eficiência de encapsulação mais alta, e também maior fotoproteção na fotólise. Este estudo demonstrou que o novo nanocarreador possui uma ampla gama de aplicabilidade na proteção de compostos foto-lábeis para as indústrias agrícola, alimentícia e farmacêutica (NGUYEN et al., 2012b).

Em outro relato, Cola e colaboradores 2016 desenvolveram um sistemas nanoestruturados lipídico para a avermectina, um potente anti-helmíntico e inseticidas utilizado na pecuária. Neste estudo foi comparado nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) e avaliou-se o potencial de citotoxicidade e genotoxicidade destes sistemas. Como resultado, tais nanocarreadores (NLS e CLNs) apresentaram alta capacidade de encapsulação do ativo (> 99%), boa estabilidade coloidal durante o tempo de estocagem e pôde reduzir os danos celulares, reduzindo assim os danos aos pecuaristas e à saúde animal caso um dia venha ser utilizada tal tecnologia (COLA et al., 2016). Em um outro estudo, Marofpour e colaboradores 2019 desenvolveram nanoformulações para combater o pulgão verde. Sabe-se que o pulgão-verde, é uma das espécies mais comuns de pragas com potencial para transmitir mais de 100 vírus para as plantas. O controle dessa praga é difícil porque se tornou resistente a uma ampla gama de inseticidas. Neste sentido, pirimicarbe e pimetrozina foram encapsulados em CLNs e os resultados revelaram que a nanoencapsulação melhorou o desempenho do IA, aumentando sua duração e conseqüentemente sua atividade inseticida para ambos os inseticidas testados (MAROOFPOUR et al., 2019).

No entanto, não há muitos estudos sobre a aplicação de defensivos agrícolas associados a CLNs, muito menos CLNs híbridos e isso oferece boas perspectivas futuras a fim de desenvolver um sistema que possa ser eficaz e causar menos impactos ambientais.

### 1.1.5 Organismos Fotoautotróficos

Muitas espécies de plantas aquáticas, principalmente macrófitas, têm sido usadas para fitorremediação devido à sua capacidade de acumular metais pesados e outros poluentes das águas residuais (PERDOMO et al., 1999).

A macrófita flutuante livre *Lemna valdiviana* também é conhecida como duckweed ou ainda lentilha d'água é uma das menores plantas vasculares do mundo (Figura 4), sendo confundida com algas e possui uma propagação rápida em pouco espaço de tempo (POTT, 2000). Além disso fotoautotróficos aquáticos em habitats marinhos e de água doce também desempenham um papel fundamental como produtores primários em cadeias alimentares aquáticas, pois é rico em nutrientes (PONTES et al., 2020).

Apesar de apresentar alguns benefícios ao ambiente, as espécies *Lemna* pode ser considerada como pragas quanto encontradas em grandes quantidades, pois frequentemente formam densos tapetes em lagoas e pântanos, reduzindo a incidência de luz subaquática e diminuindo o conteúdo de oxigênio disponível, influenciando fortemente nas condições de crescimento de plâncton,

macrófitas e macroalgas submersas, peixes e macroinvertebrados. Tal controle pode ser feito por meio de remoção mecânica, uso de herbicidas ou lotação de peixes (PE, et al., 2014)

**Figura 4.** Imagens mostrando as macrófitas *Lemna valdiviana* em diferentes magnificações.



Autoria: <https://www.milanuncios.com/peces/lenteja-de-agua-lemna-minor-303721663.htm>

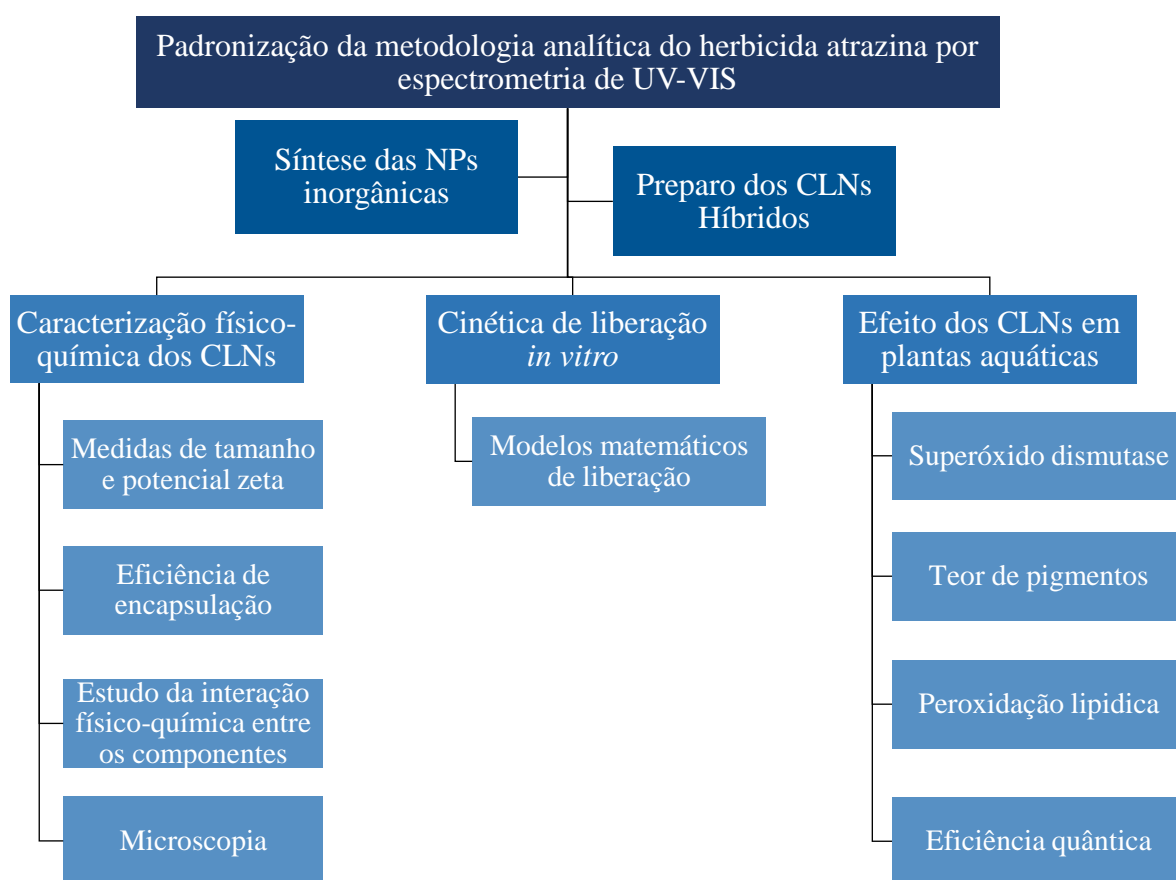
Atualmente, há muita pouca informação sobre o efeito de nanopesticidas no controle desses organismos fotoautotróficos. Portanto pode ser considerada uma ótima ferramenta na contenção de plantas oportunistas, sem contar que devido a sua coloração e morfologia, pode-se facilmente estudar a interação de nanopesticidas híbridos em sua estrutura.

## 2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como principal objetivo preparar e caracterizar carreadores híbridos lipídicos nanoestruturados (CLNs) para o herbicida atrazina. Além disso, estudou-se a cinética de liberação *in vitro* do herbicida atrazina e o efeito dos nanocarreadores híbridos em plantas aquáticas da espécie *Lemna valdiviana*.

### 2.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho podem ser encontrados na forma de fluxograma como descrito abaixo.



### 3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

#### 3.1 MATERIAIS

Os reagentes tripalmitato de glicerol (tripalmitina)  $\geq 85$  %, polivinil-álcool (PVA), cloreto de ouro III ( $\text{AuCl}_3 \geq 99,9\%$ ), borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), brometo de tetraoctilamônio (CTAB), ácido oleico (AO), cloreto de ferro (III) hexa-hidratado 97%, cloreto de ferro (II) tetra-hidratado  $\geq 99\%$  e o herbicida atrazina foram adquiridos da Sigma-Aldrich<sup>®</sup>. O triglicérideo de ácido cáprico/caprílico (Myritol 318) foi doado pela empresa ChemSpecs<sup>®</sup>. Os demais reagentes e solventes orgânicos empregados neste estudo foram de alto grau de pureza analítica adquiridos em mercados nacionais. Água deionizada foi obtida no próprio laboratório utilizando um equipamento de osmose reversa com condutividade elétrica de  $18,2 \Omega \cdot \text{m}^{-2}$ .

#### 3.2 MÉTODOS

##### 3.2.1 Padronização da metodologia analítica para o herbicida

As curvas de calibração foram realizadas em espectrofotômetro Cary 50 (Varian<sup>®</sup>). Para a análise quantitativa do herbicida ATZ foram preparadas soluções de concentrações de 0,5, 1, 3, 5 e 7 mg/L e analisadas em triplicata, no comprimento de onda de absorção máxima do composto (223 nm), obtido através de uma varredura desde a região do visível ao ultravioleta (UV). Todas as concentrações utilizadas para determinação da curva de calibração foram ajustadas de modo a apresentarem absorvância menor que 1. Após a determinação das absorvâncias nas diversas concentrações, foi construído um gráfico de absorvância em função de concentração do herbicida e em seguida realizou-se a análise do comportamento matemático da curva (regressão linear), utilizando o programa Prisma 6.0. Além disso, o limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram realizadas a partir de dados obtidos com a regressão linear da curva analítica e aplicados às Equações 1 e 2, respectivamente (ANVISA, 2003).

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

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

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

### 3.2.2 Síntese das nanopartículas inorgânicas

#### 3.2.2.1 Síntese de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de Fe estabilizadas com ácido oleico

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

**Figura 5.** Nanopartículas de óxido de ferro revestidas com ácido oleico ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@OA$ ).



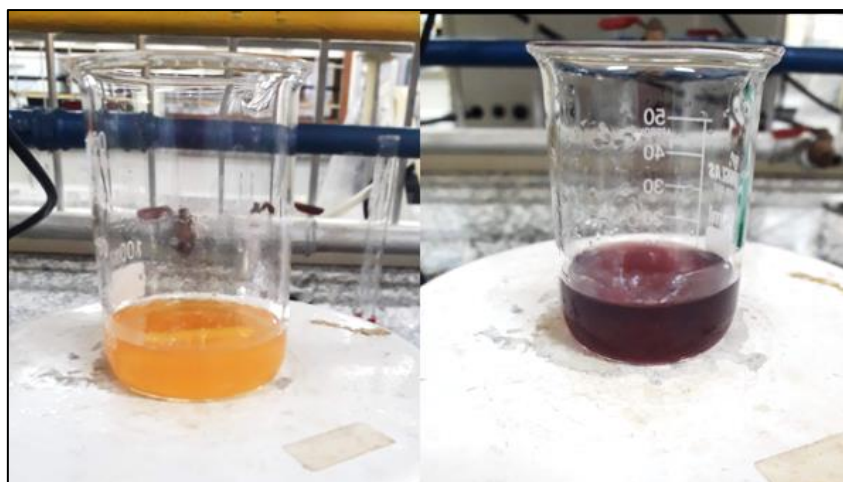
**Fonte:** Autoria própria

#### 3.2.2.2 Síntese de nanopartículas de ouro estabilizadas com CTAB

Nanopartículas de ouro (Au NPs) foram sintetizadas de acordo com o método proposto por (CHENG et al., 2003) com modificações. Tal método envolve a formação de um sistema de duas fases constituídas de clorofórmio e água. Assim, pesou-se 10 mg de CTAB em 15 mL de clorofórmio. Nesta solução foram adicionados uma solução aquosa de cloreto de ouro III (1 mmol/L) sob agitação vigorosa, a fim de transferir o íon ouro III para a fase orgânica

(clorofórmio). Em seguida, a fase aquosa foi separada da fase orgânica com o auxílio de uma pipeta e uma solução aquosa de boro-hidreto de sódio (1% m/v) foi adicionada gota a gota na solução de clorofórmio em agitação até que a coloração amarela da solução se tornasse vermelha, mostrando que houve a redução do ouro e formação das NPs (Figura 6). As NPs de ouro (NPs Au@CTAB) (contendo 39,3 mg/L de Au) foram armazenadas em frasco âmbar a 10 °C para posterior análise.

**Figura 6.** Redução das nanopartículas de ouro estabilizada com CTAB (NPs Au@CTAB).

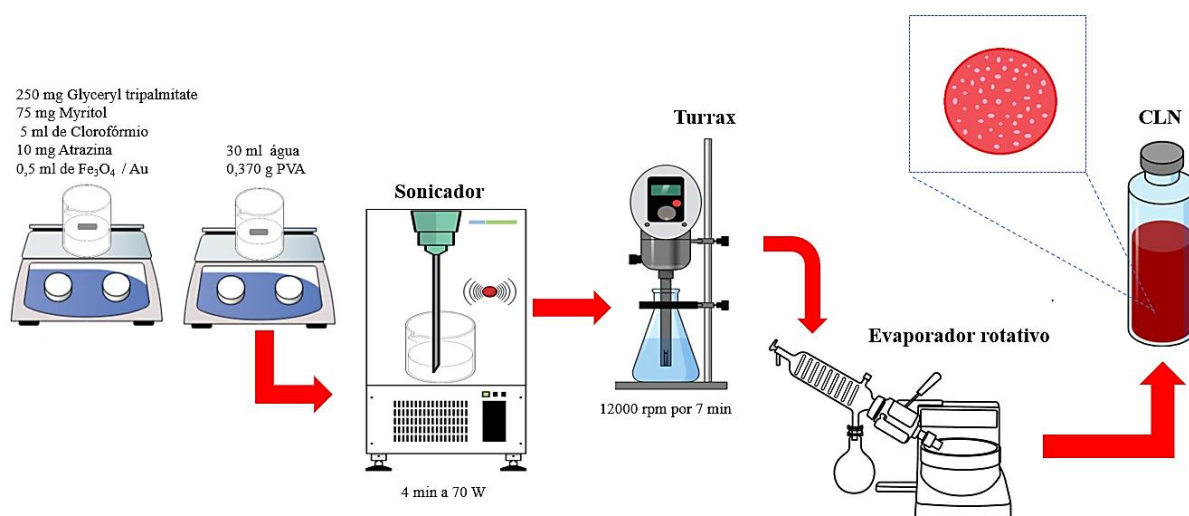


**Fonte:** Autoria própria

### 3.2.2.3 Síntese dos carreadores lipídicos nanoestruturado (CLNs) híbridos

O método emulsificação/evaporação de solvente empregado para a preparação dos carreadores lipídicos nanoestruturado (CLN) foi descrito inicialmente por Campos et al 2015 (CAMPOS et al., 2015) com modificações. Assim, 250 mg de tripalmitina (lipídio sólido) e 75 mg Myritol 318 (lipídio líquido) foram dissolvidos em clorofórmio contendo 10 mg de atrazina. Em seguida a fase orgânica foi adicionada a uma fase aquosa por imersão, contendo 0,370 g de PVA em 30 mL de água. Logo após a mistura foi sonicada por 4 minutos a uma potência de 90 W em sonicador de ponta (Ultrassônico QR 550 W). Posteriormente homogeneizou-se em um Turrax (IKA T25) por 7 min a 12000 rpm. Logo após a formação da emulsão, a nanoformulação foi transferida para e evaporador rotativo, onde foi concentrada em 10 mL, conforme mostra a Figura 7. Para o preparo dos nanocarreadores híbridos, 0,5 mL de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@OA NPs ou Au NPs foram adicionados a fase orgânica em conjunto com os lipídeos.

**Figura 7.** Representação esquemática do preparo dos carreadores lipídicos nanoestruturados.



**Fonte:** autoria própria

As amostras foram armazenadas em frascos de vidro no escuro em temperatura ambiente para posterior análise, como mostra (Figura 8).

**Figura 8.** Carreador lipídico nanoestruturado, CLN, CLN\_Au@CTAB e CLN\_ $Fe_3O_4$ @OA respectivamente.



**Fonte:** Autoria própria

### 3.2.3 Eficiência de encapsulação do herbicida atrazina

Para determinar a eficiência de incorporação da ATZ nos CLNs, foi utilizado o método de ultrafiltração/centrifugação, que consiste em submeter a nanoemulsão à dispositivos de ultrafiltração constituídos de celulose regenerada de 30 kDa (Microcon-Millipore, Amicon). Assim, 0,5 mL de CLN foi centrifugado a 5000 rpm por uma hora. Logo após, foi analisado o

filtrado por espectrofotômetro Cary 50 (Varian®). Pela membrana, só atravessa o herbicida livre, sendo assim, a quantidade de ativo quantificada representa o que não está associado aos carreadores. Assim, por diferença entre o 100% teórico da ATZ e o não associado é possível quantificar a eficiência de encapsulação da ATZ. Diversos trabalhos empregam essa técnica para determinar a taxa de encapsulação de compostos bioativos em nanopartículas (GAMISANS et al., 1999; REZENDE et al., 2003).

### **3.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOFORMULAÇÕES**

#### **3.3.1 Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial zeta (PZ)**

O espalhamento dinâmico de luz (DLS) foi utilizado para análise da distribuição de tamanho e índice de polidispersão dos CLNs, e a técnica de microeletroforese capilar foi empregada para quantificar o potencial zeta (carga de superfície) das nanoformulações em módulo.

O DLS, é uma técnica bem estabelecida que avalia o raio hidrodinâmico de nanopartículas, baseada nas flutuações de intensidade de luz espalhadas em determinado ângulo. A luz é dispersada por partículas com tamanho menor ou igual ao comprimento de onda delas, assim quando o feixe de laser atinge partículas pequenas, ocorre espalhamento em todas as direções sem perda ou ganho de energia através da dispersão de Rayleigh (ROCHA; FUJIMOTO, 2010). Já o potencial zeta refere-se o potencial de superfície das partículas, no qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão, um valor de potencial zeta relativamente alto é importante para uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal (REZENDE et al., 2003). Os CLNs foram diluídos em água (Milli-Q) e, utilizando um analisador de partículas Zetasizer HSA 3000, Malvern® a um ângulo fixo de 173° e temperatura de 25 °C. Todas as medidas foram feitas em triplicata e expressas em porcentagem de intensidade.

#### **3.3.2 Rastreamento de Nanopartículas (NTA)**

O rastreamento de nanopartículas (NTA) é um método que permite visualização de NPs e utiliza propriedades de espalhamento de luz e movimento browniano para fornecer a distribuição de tamanho e contagem das partículas em suspensão líquida (PATTY et al., 2006). A técnica foi utilizada para determinar a concentração e distribuição de tamanho dos CLNs. Assim, por

intermédio de um feixe de laser que atravessa o compartimento da amostra, as partículas em suspensão espalham a luz, e a visualização ocorre por um microscópio e uma câmera de vídeo acoplada. Esta câmera captura o vídeo das partículas em movimento browniano, e pela equação de Stokes-Einstein (Equação 3) (PATTY, 2006) pode-se calcular o diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas.

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

Onde,  $d(H)$  é o raio hidrodinâmico,  $K$  é a constante de Boltzmann,  $T$  é a temperatura absoluta,  $\eta$  é a viscosidade da amostra (0,8872 cP) e  $D$  o coeficiente de difusão.

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

### 3.3.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) é uma técnica fundamentada no aumento da energia de vibração ou de rotação associado à uma ligação covalente, em que esse aumento resulta numa variação do momento dipolar da molécula. Os movimentos vibracionais em uma molécula, ativos no infravermelho, e que dão origem as absorções, são os tipos de vibrações de estiramento ( $\nu$ ) – movimentos ao longo do eixo de ligação, aumentando ou diminuindo a distância interatômica – e vibrações de deformações angulares ( $\delta$ ), caracterizadas por alterações no ângulo entre ligações (PAVIA et al., 2012). É uma técnica de grande importância na análise química, sendo largamente utilizada na identificação e elucidação estrutural de diferentes substâncias, como por exemplo, no controle e acompanhamento de reações e detecção de impurezas (CHART et al., 2004).

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos com a utilização de um espectrofotômetro Nicolet 5DXB FT-IR (Nicolet Instruments, Madison, Wi) instalado no DFQ – UNESP Ilha Solteira. As pastilhas utilizadas na análise foram feitas a partir da mistura de

brometo de potássio (KBr) e amostra seca suficiente para compor 1% (m/m) da mistura, que foi macerada até ficar totalmente uniforme. Para a obtenção dos espectros FTIR foi empregado, para cada amostra, um mínimo de 64 varreduras numa resolução de  $\pm 4 \text{ cm}^{-1}$ , na faixa de 4000 a  $400 \text{ cm}^{-1}$ . Dessa forma, observamos as alterações nas bandas de absorção dos espectros de absorção a fim de correlacioná-las com interações entre os nanocarreadores e herbicidas.

### 3.3.4 *Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma ferramenta útil na investigação da superfície de uma amostra, que é varrida com um feixe de elétrons e o feixe refletido é coletado e depois exibido na mesma taxa de varredura sobre um tubo de raio catódico. A caracterização por microscopia eletrônica de varredura é de fundamental importância por produzir imagens que passam informações topográficas da superfície do material analisado (CALLISTER, 2008). Assim, nanocarreadores híbridos foram analisados por MEV, a fim de avaliar sua distribuição de tamanho e morfologia. As nanoformulações foram diluídas (1:1000) e gotejadas em um suporte de silício previamente limpo e secos durante 24 horas em dessecador contendo  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Posteriormente as amostras receberam uma fina camada de ouro e foram levadas ao MEV. As micrografias foram obtidas por um microscópio eletrônico, modelo EVO-LS15 da marca Carl Zeiss, do DFQ, UNESP Campus de Ilha Solteira.

### 3.3.5 *Difração de Raios-X (DRX)*

Os raios-X são uma forma de radiação eletromagnética que possui altas energias e comprimentos de onda curtos. Quando um feixe de raios-X incide num material sólido, uma porção deste feixe será espalhada em todas as direções pelos elétrons associados com cada átomo ou íon que fica no caminho do feixe, permitindo a obtenção de informações quanto à estrutura cristalina dos material (CALLISTER, 2008). Esta técnica foi utilizada para identificar a presença das NPs inorgânicas nos CLNs, e além disso foi usada para avaliar o tamanho do cristalito ( $\mathcal{E}$ ) das nanopartículas inorgânicas, através da equação de Scherrer (equação 4) (WILSON, 1978).

$$\mathcal{E} = \frac{0,89 \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos \theta} \quad \text{Eq. (4)}$$

onde:  $\lambda$  é o comprimento de onda dos raios-X (0,154 nm),  $\beta$  é a largura total ao meio máximo,  $\theta$  é o ângulo de difração.

A caracterização feita por difração de raios-X (DRX) utilizou a técnica de difração em pó, na qual um feixe de raios-X monocromático é direcionado para uma amostra pulverizada, espalhada em um suporte de vidro, e a intensidade da difração é medida quando o detector é movido em diferentes ângulos.

Os difratogramas foram obtidos através de medidas realizadas no difratômetro Shimadzu modelo XRD-6000, alocado no Departamento de Física e Química da UNESP Ilha Solteira, utilizando como fonte de radiação a linha de emissão do cobre ( $\lambda$  Cu  $K\alpha = 1,5418\text{\AA}$ ). Os parâmetros utilizados foram: varredura no ângulo de 5 a 80°, uma velocidade de varredura do ângulo 1°/min com um *step* de 0,02°, voltagem de 30 kV e uma corrente de 40 mA.

### 3.3.6 *Análises Térmicas*

#### 3.3.6.1 *Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)*

A técnica de DSC mede a diferença de temperatura entre uma substância e um material de referência quando são submetidos a uma programação controlada de temperatura. O uso principal desta técnica é detectar a temperatura inicial dos processos térmicos e qualitativamente caracterizá-los como endotérmico ou exotérmico, reversível ou irreversível, transição de primeira ordem ou de segunda ordem, etc (GROENEWOUD, 1982).

Todas as medidas de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) foram realizadas em um equipamento de DSC 25 - TA Instruments, pertencente a Departamento de Física e Química da UNESP Ilha Solteira. Utilizou-se cerca de 3 mg de cada amostra que foram gotejadas em compartimento de alumínio apropriados, secas e hermeticamente fechadas. A taxa de aquecimento empregada foi de 10 °C/min em uma faixa de temperatura de 10 °C até 240 °C sob atmosfera de nitrogênio com vazão de 50 mL.min<sup>-1</sup>. Os resultados de DSC foram apresentados como termogramas representados por fluxo de calor (cal.g<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>) em função da temperatura (°C) e as transições térmicas foram correlacionadas.

#### 3.3.6.2 *Termogravimetria (TG)*

A termogravimetria (TG) é uma técnica da análise térmica na qual a variação da massa da amostra (perda ou ganho) é medida em função da temperatura e/ou tempo enquanto esta é submetida a uma programação controlada de temperatura (CAVALHEIRO et al., 1995). Esta

técnica possibilita conhecer as alterações que o aquecimento pode provocar na massa das substâncias, permitindo estabelecer a faixa de temperatura em que começam a se decompor, acompanhar o andamento da perda de umidade, oxidação, combustão, decomposição, etc (CANEVALORO, 2004).

As análises foram feitas no equipamento da marca TA Instruments, modelo Q-600 do Departamento de Física e Química da UNESP Ilha Solteira, em cadinho de platina, utilizando cerca de 3 - 6 mg de amostra seca. Os experimentos foram realizados com programação de rampa de aquecimento de 10°C até 800 °C, com razão de aquecimento de 10 °C.min<sup>-1</sup>. A vazão de nitrogênio foi mantida em 100 mL.min<sup>-1</sup>.

### **3.3.7 Medida de estabilidade das formulações (pH)**

A estabilidade de suspensões nanoparticuladas podem ser obtidas mediante o monitoramento do pH, em função do tempo, pois a alteração do mesmo é um importante parâmetro de início de degradação (LOPES et al., 2000).

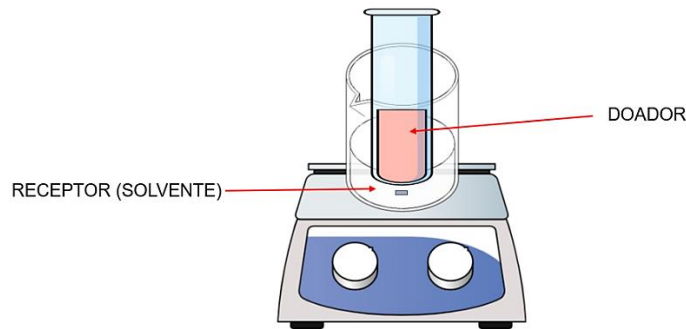
A análise da estabilidade química dos CLN foi avaliada através de medidas de pH em função do tempo (90 dias). As medidas de pH foram realizadas em pHmetro (Tecnal<sup>®</sup>), empregando-se um medidor de pH (pHmetro) acoplado com um eletrodo combinado de vidro, previamente calibrado com tampões comerciais pH 4,0 e 7,0.

## **3.4 CINÉTICA DE LIBERAÇÃO IN VITRO DO HERBICIDA**

A liberação de ativos depende de diferentes fatores, tais como: desorção do ativo da superfície das partículas, da difusão através da matriz e da parede lipídica, da erosão da matriz, ou da combinação dos processos de difusão e erosão (SOPPIMATH et al., 2001).

Para verificar a cinética de liberação da ATZ livre e associada aos nanocarreadores foi utilizado um modelo de dois compartimentos (um compartimento doador e outro receptor) mostrado pela Figura 9, unidos por uma membrana de celulose (Spectrapore<sup>®</sup>, com poro para exclusão molecular de 1 KDa.).

**Figura 9.** Modelo de dois compartimentos (um compartimento doador e outro receptor).



**Fonte:** Autoria própria

As nanoformulações foram dispostas no compartimento doador (1,0 mL) enquanto o compartimento receptor contendo o solvente (50 mL de água), sob agitação leve alíquotas foram retiradas em intervalos de tempo, durante 33 h. Alíquotas foram quantificadas por espectroscopia de UV-Visível e os dados resultantes foram plotados em porcentagem de liberação em função do tempo.

A partir das curvas de liberação da atrazina, utilizou-se o software KinetDS 3.0 para simular diferentes modelos matemáticos de dissolução (Tabela 1). Portanto, tais modelos foram utilizados a fim de compreender como se comporta o mecanismo de liberação deste ativo nos diferentes CLNs formulados. Deste modo, o melhor modelo foi selecionado a partir do coeficiente de determinação ( $r^2$ ) mais próximo de 1 e calculou-se a constante de velocidade (K) e o tempo de liberação em 10, 20 e 30% ( $t_{x\%}$ ) para cada nanoformulação.

**Tabela 1.** Modelos cinéticos aplicados ao perfil de liberação da atrazina nos diferentes carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN).

Modelo Cinético	Equações Matemáticas*
Cinética de ordem zero	$Q_t = Q_0 + Kt$
Cinética de primeira ordem	$\ln Q_t = \ln Q_0 + Kt$
Higuchi	$Q_t = Kt^{1/2}$
Hixson-Crowell	$Q_t = 100 [1 - (1 - k.t)^3]$
Korsmeyer-Peppas	$Q_t/Q_\infty = Kt^n$

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

### 3.5 EFEITO DOS CLNs EM PLANTAS AQUÁTICAS

Apesar das aplicações da nanotecnologia continuarem a se expandir em diversas áreas, estudos sobre como a interação destes nanocarreadores com as plantas e suas consequências para os recursos ambientais é relativamente limitado. Assim, os efeitos tóxicos dos CLNs sem e contendo ATZ, foram investigados na planta aquática *Lemna valdiviana*, em colaboração com o Prof. Dr. Etenaldo F. Santiago e Ms. Montcharles S. Pontes do Centro de Estudos em Recursos Naturais da Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul (UEMS), Dourados. Os testes foram realizados na concentração de 0 a 100 µL/L de atrazina em meio aquoso e comparou-se o herbicida atrazina livre, utilizando os CLNs e as CLNs contendo a atrazina por 24 horas de exposição.

#### 3.5.1 Superóxido dismutase (SOD) e peroxidação lipídica

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada de acordo com o método de Giannopolitis e Ries (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977), com base na capacidade da enzima de inibir a redução de nitroazul de tetrazólio (NBT) pelos radicais superóxido, afim de saber se a um aumento na produção das espécies reativas de oxigênio(ERO). Para a reação, 100 µL de extrato foram misturados em 3 mL de um meio de reação consistindo em 9,6 mL de tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,0), 6 mL de L-metionina (13 mM), 6 mL de NBT (0,44 mM), 6 mL de ácido etileno diaminoteracético-EDTA (100 nM) e, finalmente, 2,4 mL de riboflavina 1 mM. Esta solução foi exposta à luz fluorescente (20W) a uma temperatura de 25° C por 15 minutos. Como controle, os extratos preparados seguindo o mesmo procedimento foram mantidos no escuro. A atividade da SOD foi medida no espectrofotômetro a  $\lambda = 560$  nm, e a diferença entre as absorbâncias dos extratos iluminados e não iluminados foi considerada para determinar a atividade da SOD. O resultado foi expresso em unidades de SOD por 1 mg -1 FW de planta (CITY, 1988).

A peroxidação lipídica foi analisada como um marcador de estresse oxidativo. Os discos de folhas (10 mg) foram homogeneizados com ácido tricloroacético (0,2%) diluído em metanol e depois centrifugados a  $10.000 \times g$  por 5 min. O sobrenadante foi utilizado para determinação do teor de malonaldeído (MDA) pelo método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (ELEKTRONENMIKROSKOPIE, 2011).

### 3.5.2 Teor de pigmento

Os pigmentos são a parte das estruturas macromoleculares que absorvem a luz na região do espectro visível (WALSBY, 1974). Uma grande variedade de pigmentos pode ser encontrada em diferentes organismos fotossintéticos, como clorofilas (Chl) a-b. As propriedades dos pigmentos estão ligadas à sua estrutura química, e ainda há o grupo dos hidrocarbonetos cíclicos (carotenos), que são pigmentos de acessórios que ajudam na absorção de luz que se divide em dois grupos carotenoides e xantofilas (KUCZYNSKA et al., 2015).

O teor de pigmentos foi realizado a partir da extração e determinação das concentrações de clorofila *a*, e clorofila *b* e carotenoides, foram realizadas em solução aquosa de acetona a 80% tamponada imediatamente após o tratamento e, em seguida, seu conteúdo foi determinado por Eqs. 5 a 7 usando os dados UV-Vis (LICHTENTHALER, 1987), com o propósito prever de forma positiva ou negativa se a fotossíntese é influenciada, visto que baixos teores destes pigmentos dificultam a eficiência fotossintética.

$$[\text{Chla}] = 12,25A_{663.2} - 279A_{646.8} \quad \text{Eq.(5)}$$

$$[\text{Chlb}] = 21,5A_{646.8} - 5,1A_{663.2} \quad \text{Eq.(6)}$$

$$[\text{Car}] = (1000A_{470} - 1,82[\text{Chl } a] - 85,02[\text{Chl } b])/198 \quad \text{Eq.(7)}$$

Onde [Chla], [Chlb] e [Car] representam o teor de clorofila *a* clorofila *b* e carotenóides, e  $A_n$  corresponde ao valor de absorbância determinado no comprimento de onda 'n' em nm.

### 3.5.3 Eficiência Quântica

Culturas de *Lemna valdiviana* (Lemnaceae) foram mantidos no Centro de Estudos de Recursos Naturais da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Dourados, MS, Brasil. As macrófitas foram originárias da Estação Ecológica Municipal Veredas de Taquarusu, Mato Grosso do Sul, Brasil (coordenadas: 22 ° 37'50.4 "S e 53 ° 16'50.3" W). Para os tratamentos, 1,0 g de plantas de duckweed foram expostos a nanoformulações durante 24 h. A composição do meio de cultura utilizado para as culturas de duckweed foi preparada de acordo com Frankart (FRANKART, 2002).

Todas as análises de imagem de fluorescência de clorofila foram medidas usando o protocolo de análise de temperatura com luz vermelha actínica (617 nm) e pulso de saturação (branco frio 2000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) após 1 h de adaptação escura usando um sistema de fluorômetro de imagem

FluorCam F-800 (Photon System Instruments, República Tcheca). Para parâmetros de fluorescência estabelecidos, inicialmente mediu-se a fluorescência mínima ( $F_o$ ) e máxima ( $F_m$ ) em folhas escuras adaptadas. Foi estimado o rendimento quântico máximo da fotoquímica do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) de acordo com Kitajima e Butler (KITAJIMA; BUTLER, 1975).

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

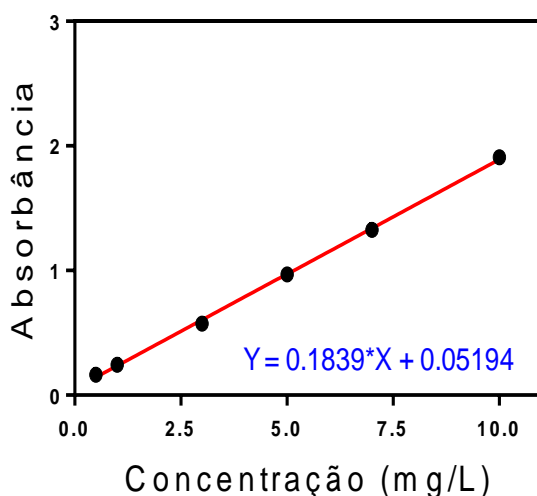
A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada usando análise de variância (One-way ANOVA com teste de Kruskal-Wallis) e foi considerado diferenças significantes como  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Padronização da metodologia analítica para o herbicida ATZ

A curva de calibração mostra a resposta de um método analítico para quantidades conhecidas de analito (RIBEIRO, 2012). Para a análise quantitativa do herbicida ATZ foram preparadas soluções de concentrações de 0,5 a 10 mg/L e analisadas por espectrofotômetro UV-Visível. Todas as curvas foram feitas em triplicata durante três dias consecutivos de acordo com ICH (BRECKENRIDGE et al, 2010) . A média das curvas analíticas foi calculada e apresentada na Figura 10, apresentando um comportamento linear, com coeficiente de correlação linear ( $r^2$ ) próximo a 1.

**Figura 10. Curvas de calibração analíticas para o herbicida Atrazina**



**Fonte:** autoria própria

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

**Tabela 2.** Limite de detecção e limite de quantificação dos métodos analíticos para a ATZ.

	<b>Atrazina</b>
Limite de detecção (mg/L)	0,161
Limite de quantificação (mg/L)	0,539

**Fonte:** autoria própria

#### **4.2** *Eficiência de encapsulação do herbicida atrazina*

A eficiência de encapsulação da atrazina (E.E.) foi realizada pelo método ultrafiltração/centrifugação e as amostras foram analisadas por espectrofotômetro UV-visível. Partículas em escala nanométricas possuem valores elevados de área/volume e isso permite que moléculas sejam facilmente encapsuladas em seu interior (LET; ZAVAREZE, 2012), porém a taxa de E.E. depende especificamente da natureza química de cada molécula e sua interação com o carreador.

A tecnologia de encapsulamento com base nos métodos de remoção de solvente/emulsificação é considerada uma das técnicas mais promissoras para proteção e liberação de ativos, devido a sua alta eficiência de encapsulação, manutenção da estabilidade química e liberação modificada do ativo (LU et al., 2016). No entanto, compostos hidrofílicos apresentam baixo valor de eficiência de encapsulação (~10%) quando associados em nanopartículas lipídicas, enquanto que compostos hidrofóbicos possuem alta afinidade (acima de 70%) (MORA-HUERTAS, 2010). Neste sentido o herbicida ATZ que possui baixa solubilidade em água (~ 28 mg/L) (EXTOXNET, 2011), foi associado aos nanocarreadores lipídicos objetivando uma liberação modificada, a fim de desenvolver nanoformulações que possam causar menos impacto ambiental e a saúde humana.

Os valores de eficiência de encapsulação para as nanoformulações de CLN:ATZ, CLN:ATZ\_Au@CTAB e CLN:ATZ\_Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@OA, foram descritos na Tabela 3, e observa-se que os valores de E.E. estão acima de 90%, mostrando uma boa afinidade do ativo com a matriz lipídica para todos os nanocarreadores.

**Tabela 3.** Valores de eficiência de encapsulação dos CLNs contendo o herbicida atrazina para as diferentes formulações sintetizadas.

<b>Formulações</b>	<b>Atrazina (%)</b>
CLN:ATZ	94,13
CLN:ATZ_Au@CTAB	95,03
CLN:ATZ_Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @OA	91,07

**Fonte:** autoria própria

A elevada eficiência de encapsulação do herbicida atrazina nos CLNs pode ser explicada principalmente pela alta solubilidade deste herbicida nos lipídios líquido (Myritol 318) e sólido (tripalmitina) presentes nos CLNs, bem como pelas interações entre os grupamentos carboxílicos do lipídio com os grupos amino (NH) presentes no herbicida atrazina. Além disso, a E.E. de ativos também pode ser influenciada pela quantidade de PVA utilizada no preparo das nanoformulações, uma vez que a porção hidrofóbica do PVA pode penetrar nas cadeias dos CLNs durante o processo de emulsificação. Assim, com a adição de PVA há capacidade de formar facilmente uma rede interconectada com o ativo, elevando a um aumento do encapsulamento (WU et al., 2008).

Portanto, através deste estudo conclui-se que o herbicida ATZ teve boa encapsulação nos CLNs. Como por exemplo, nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) mostraram também boa associação com compostos hidrofóbicos semelhantes aos usados neste estudo (PASQUOTO et al., 2015). Também, em um outro estudo, (GRILLO et al., 2012) associaram o herbicida atrazina em nanocápsulas de poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) e tiveram eficiência de encapsulação de 86%, um pouco menor que os valores obtidos neste estudo.

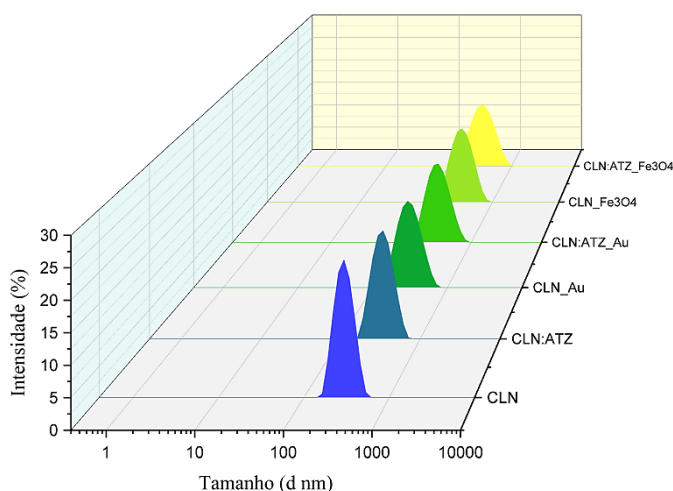
### **4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS NANOCARREADORES HÍBRIDOS**

#### **4.3.1 Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial zeta (PZ)**

Os CLNs foram caracterizados pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e apresentaram perfil de distribuição de tamanho monomodal (única população de partículas) e índice de polidispersão (PDI) entre 0,1 e 0,2 (Figura 11). De acordo com (LEUNG; SHEN, 2018) os índices de polidispersão menor de 0,2 mostram estabilidade coloidal para estes tipos de carreadores. Sistemas sem e contendo herbicida também foram analisados por DLS e observou-

se que a adição da ATZ tornou os CLNs ligeiramente maiores (Tabela 4), devido ao encapsulamento do ativo, como mostra Vitorino e colaboradores (VITORINO et al., 2011). Apenas os  $\text{Fe}_3\text{O}_4@OA$  e  $\text{CLN:ATZ\_Fe}_3\text{O}_4@OA$  não apresentaram diferenças em seu diâmetro médio, que pode estar relacionado a menor associação da ATZ com os carreadores (91%) em relação aos demais.

**Figura 11.** Espalhamento de luz dinâmico realizado a uma temperatura de 25 °C em triplicata.



**Fonte:** autoria própria

**Tabela 4.** Tamanho, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta nas nanoformulações.

Formulações	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
CLN	286,0 ± 1,2	0,11 ± 0,05	-16,2 ± 0,3
CLN:ATZ	311,0 ± 3,6	0,17 ± 0,06	-12,5 ± 0,2
CLN_Au@CTAB	268,5 ± 5,7	0,20 ± 0,02	-17,3 ± 1,5
CLN:ATZ_Au@CTAB	427,0 ± 7,0	0,27 ± 0,30	-5,30 ± 0,2
CLN_Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @OA	295,8 ± 0,4	0,23 ± 0,02	-17,5 ± 0,4
CLN:ATZ_Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @OA	295,0 ± 3,9	0,22 ± 0,02	-23,5 ± 1,2

**Fonte:** autoria própria

A estabilidade coloidal dos CLNs foi avaliada através da análise do potencial zeta (carga superficial). Sabe-se que é necessário um valor mínimo de 30 a 50 mV em módulo para se ter uma repulsão eletrostática suficiente entre as nanopartículas para manter a estabilidade física e impedir a ocorrência de coalescência (MÜLLER et al., 2012). Na Tabela 4 nota-se que o

potencial zeta dos CLNs foram relativamente baixos (entre  $-5,38 \pm 0,27$  a  $-23,5 \pm 1,25$  mV), isso já era esperado uma vez que o PVA utilizado na formulação, adsorve sobre a superfície das nanopartículas criando uma camada estabilizadora por efeito estérico, a qual leva a uma redução do potencial zeta (MALISKA, 2000). Portanto valores baixos de potencial zeta, não representam problemas de estabilidade como descritos por alguns autores (STAVEN et al., 2016).

#### 4.3.2 Rastreamento de Nanopartículas (NTA)

O tamanho dos CLNs sem e contendo herbicidas foram avaliados por NTA, e observou que todas as nanoformulações apresentaram tamanhos compreendidos entre 210 nm e 260 nm. Entretanto, os valores médios de tamanho obtidos pelo NTA foram ligeiramente menores aos valores obtidos pelo DLS (Tabela 5), isso ocorre porque a técnica de NTA é baseada no rastreamento de partículas individuais, enquanto o DLS mede uma maior quantidade de partículas, enfatizando apenas a distribuição de partículas que aparecem em maior número na amostra (FILIPE et al., 2010). No entanto, ambas as técnicas mostraram boa precisão e distribuições de tamanho relativamente estreitas.

A concentração de nanopartículas foi da ordem de  $10^{12}$  partículas/mL com pequenas variações entre as nanoformulações. Apenas para a nanoformulação CLN:ATZ\_Au@CTAB que foi observado um discreto aumento no tamanho das partículas e uma redução na sua concentração, provavelmente devido as NPs de ouro competirem por espaço com as moléculas de ATZ dentro do nanocarreador. Isto provavelmente não foi observado para as CLN:ATZ\_Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@OA, uma vez que as Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@OA NPs são menores (10 nm) que as NPs de Au (46 nm).

**Tabela 5.** Tamanho e concentração de nanopartículas avaliados por NTA.

Sistemas	Tamanho (nm)	Concentração (partículas/ ml)
CLN	$215,0 \pm 0,8$	$7,59 \times 10^{12} \pm 1,75 \times 10^{11}$
CLN:ATZ	$224,5 \pm 1,0$	$9,09 \times 10^{12} \pm 4,36 \times 10^{11}$
CLN_Au@CTAB	$223,1 \pm 3,7$	$8,64 \times 10^{12} \pm 2,73 \times 10^{11}$
CLN:ATZ_Au@CTAB	$258,4 \pm 3,0$	$4,08 \times 10^{12} \pm 1,57 \times 10^{11}$
CLN_Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @OA	$216,3 \pm 2,5$	$7,68 \times 10^{12} \pm 2,29 \times 10^{11}$
CLN:ATZ_Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @OA	$226,3 \pm 2,7$	$9,48 \times 10^{12} \pm 4,96 \times 10^{11}$

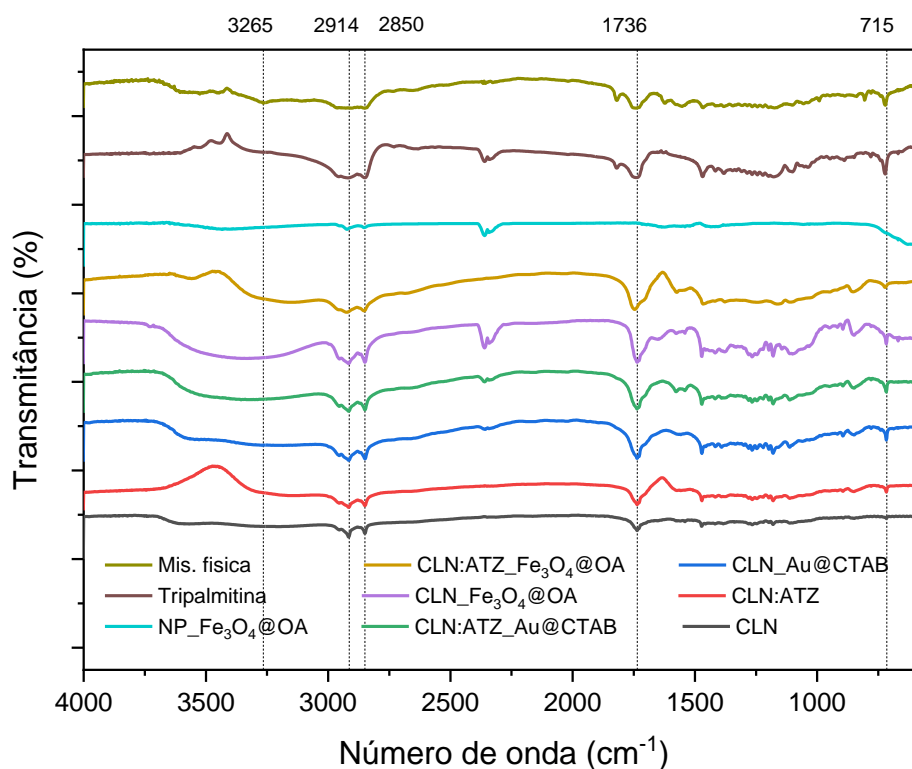
**Fonte:** autoria própria

Todas as análises de distribuição de tamanho mostraram que as nanopartículas apresentaram apenas uma população (monomodal), e estes dados são de grande importância, pois quando se pretende preparar um sistema de liberação modificada, o tamanho das nanopartículas interfere no processo de liberação (REZENDE et al., 2003), assim sendo, quanto mais uniforme for o sistema, maior a reprodutibilidade dos dados, e mais fácil poderemos comparar as diferentes formulações quando expostas em organismos alvos, ocorrendo menores interferências no processo de liberação dos ativos e melhor estabilidade coloidal (FARIA et al., 2016).

#### *4.3.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)*

As atribuições dos modos vibracionais dos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs), foram observadas nos espectros de infravermelho e comparadas as amostras sem e contendo o herbicida (ATZ) e nanopartículas inorgânicas, a fim de observar evidências na associação entre a cadeia lipídica do carreador e os demais componentes da formulação (herbicida, nanopartículas inorgânicas, etc). A Figura 12 apresenta o espectro na região do infravermelho das nanoformulações, e observa-se que em todas as amostras há bandas em  $1736\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento da ligação C=O da função éster presente nos lipídeos, e  $715\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento das ligações C-H. Também, em  $2914\text{ cm}^{-1}$  e  $2850\text{ cm}^{-1}$ , observa-se estiramento da ligação C-H do grupamento alquila. Além disso, observa-se que na mistura física é possível encontrar em  $3265\text{ cm}^{-1}$  uma banda relacionada ao estiramento da ligação N-H da atrazina, não sendo encontrada nas nanoformulações, sugerindo associação com os carreadores. Ademais, não foram observadas mudanças significativa entre os tratamentos quando se incorporaram as nanopartículas inorgânicas aos CLNs.

**Figura 12.** Espectroscopia na região do infravermelho dos CLNs e seus componentes.



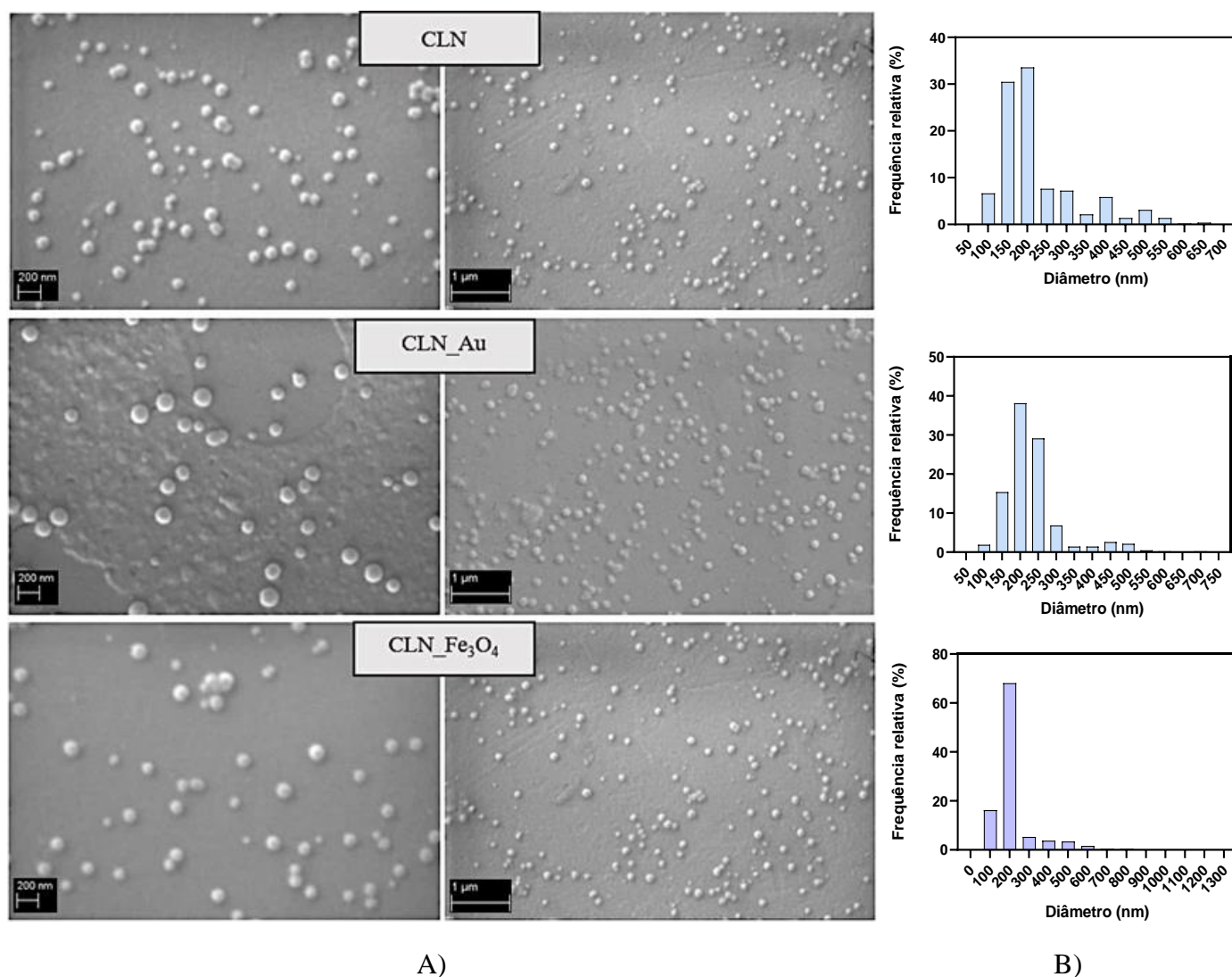
**Fonte:** autoria própria

#### 4.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia dos CLNs magnéticos e plasmônicos, sem e contendo o herbicida atrazina foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Nas amostras das Figuras 13-A e 14-A, observou-se que a morfologia das nanopartículas é predominantemente esférica com superfície lisa, além disso, através de minuciosa análise das imagens foram estimados os tamanhos e as porcentagens relativas demonstrados pelos histogramas representados pelas Figuras 13-B a 15-B obtido por intermédio do programa imagej.

Os CLNs se apresentaram em uma forma bem dispersa, com uma distribuição aleatória de tamanhos, tendo a maior parte das dimensões destas distribuídas entre 150 e 200 nm, obtendo uma estreita distribuição de tamanho.

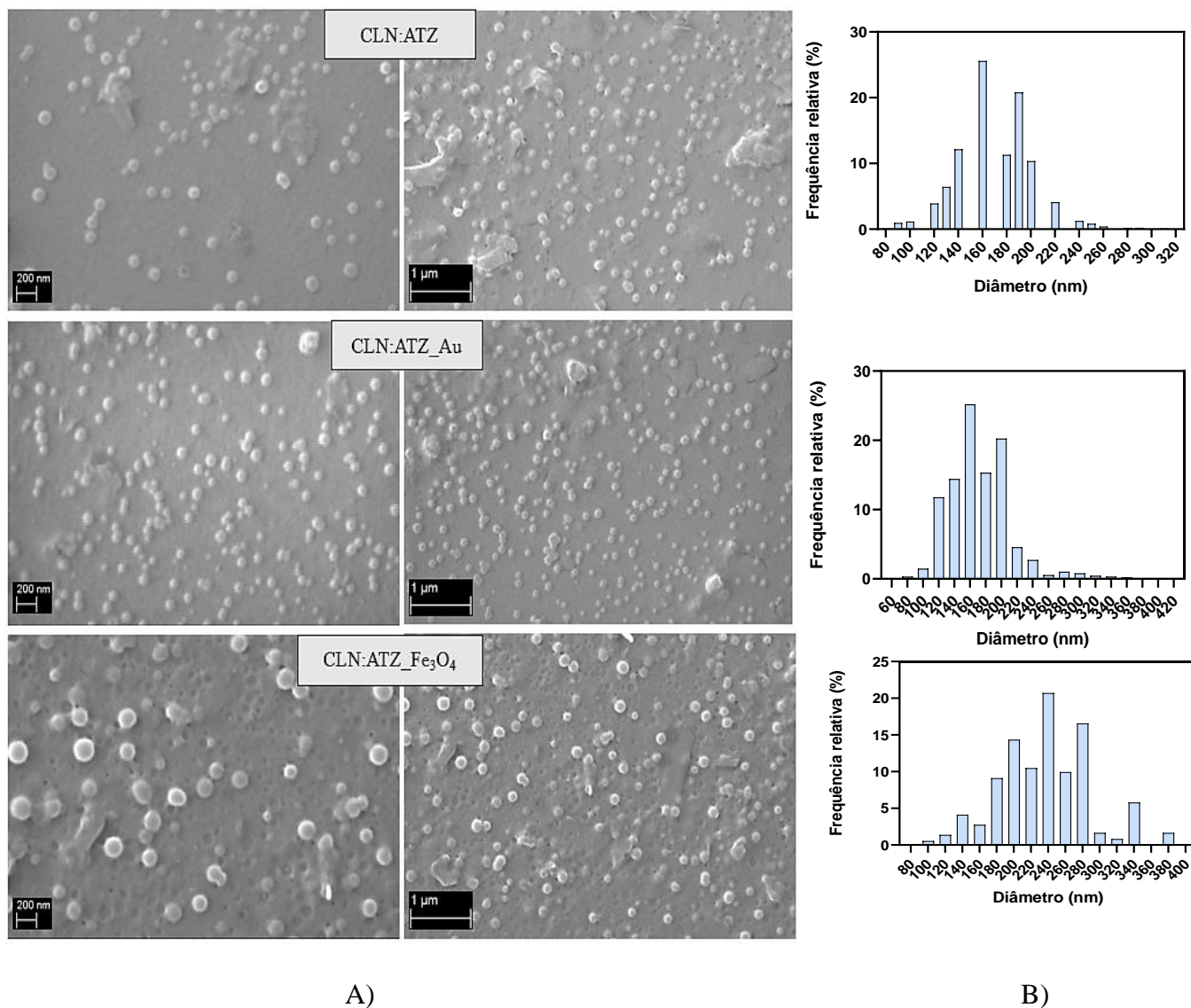
**Figura 13.** Amostras do CLNs sem o herbicida: A) Micrografias de MEV das amostras e B) Histogramas de distribuição de tamanho



**Fonte:** autoria própria

A partir da análise das imagens de MEV foi possível observar que a morfologia dos CLNs não diferiu significativamente com a presença de atrazina (Figura 14-A) e nenhuma micrografia mostrou cristais de atrazina, corroborando com o alto valor de E.E. estudado (Tabela 3).

**Figura 14.** Amostras do CLNs contendo herbicida: A) Micrografias de MEV das amostras e B) Histogramas de distribuição de tamanho.



**Fonte:** autoria própria.

#### 4.3.5 Difração de Raios-X (DRX)

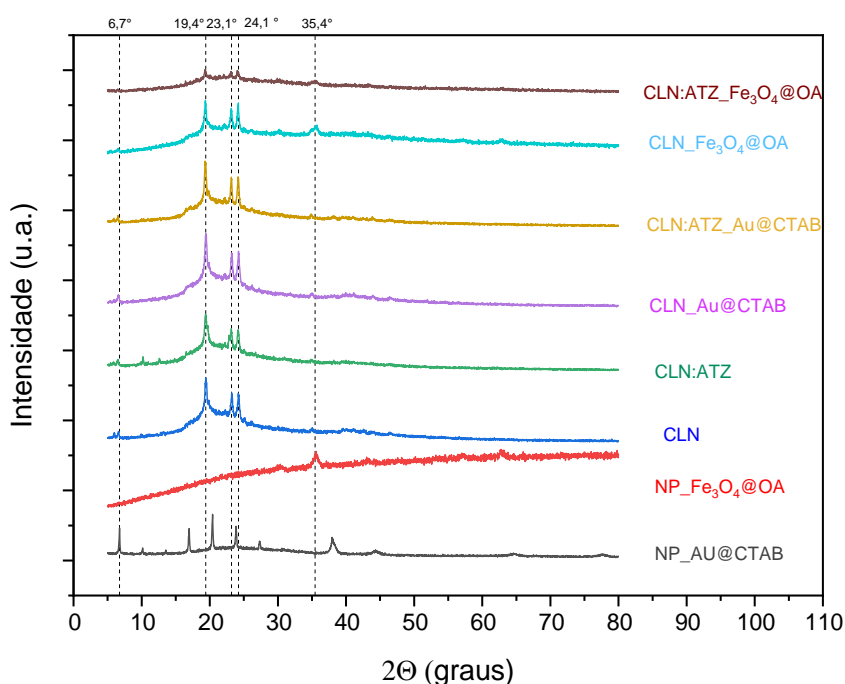
Os difratogramas de raios-x dos CLNs são mostrados na Figura 15, observa-se que os picos de difração correspondem ao lipídio utilizado, de acordo com alguns relatados na literatura (SHI et al., 2019; ZHANG et al., 2016).

Os picos de difração das NPs inorgânicas foram usados para identificação da estrutura cristalina de cada nanopartícula inorgânica. Assim, quatro picos de difração foram identificados para as NPs magnéticas em 30° (2 2 0), 35,4° (3 1 1), 64° (4 4 0) e 57° (5 1 1), sugerindo ser a estrutura da magnetita (tipo espinélio inverso) de acordo com o Crystallographic Open Database

(COD 96– 900– 2318). Já para as NPs de ouro foram observados picos principais de difração em  $38,2^\circ$  (1 1 1),  $44,3^\circ$  (2 0 0),  $64,9^\circ$  (2 2 0), mostrando uma estrutura cúbica (JCPDSNo. 03-0921). Além disso, o tamanho médio do cristalito das nanopartículas foi calculado pela equação de Scherrer, sendo 46,8 nm para as NP\_Au@CTAB e 10,3 nm para NP\_Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@OA.

No que diz a respeito dos nanocarreadores sintetizados, os mesmos picos aparecem em distintas amostras, sem deslocamento significativo. Assim, picos característicos foram observados no padrão de DRX a  $2\theta$  de  $6,76^\circ$ ,  $19,4^\circ$ ,  $23,1^\circ$ ,  $24,1^\circ$ , correspondentes às difrações de picos do lipídio caracterizando a presença da fase  $\beta$  (SHI et al., 2019). Observa-se também, um pequeno pico em  $35,4^\circ$  nas amostras que contem Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, sugerindo que seja nanopartículas magnéticas (MAHDAVI et al., 2013). Ademais, as posições relativas do pico de CLNs sem herbicida, concordam com os picos de difração das que contém o ativo. Nota-se também, que ocorre uma diminuição da intensidade com adição do herbicida, reduzindo a cristalinidade do material, que pode estar relacionado a inexistência de uma orientação preferencial dos cristais, ou seja, os cristalitos não têm uma tendência a se orientarem em determinadas direções cristalográficas. Os picos mais agudos também sugerem que esse sistema tem boa estrutura cristalina. Os dados de DRX sugerem ainda que o efeito das nanopartículas plasmônica e magnética na estrutura das amostras do núcleo/invólucro dos CLNs é insignificante, ficando bem claro o revestimento bem-sucedido feito pelo lipídio.

**Figura 15.** Difratoograma de raio-X dos CLNs e das nanopartículas inorgânicas.



**Fonte:** Autoria própria

### 4.3.6 Análises Térmicas

#### 4.3.6.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Analisando os CLNs, bem como para os contendo nanopartículas inorgânicas e ATZ pelas curvas de DSC representados na Figura 16. Pôde-se observar que os CLNs apresentaram dois picos endotérmicos sobrepostos: o primeiro, de menor intensidade, centrado em aproximadamente  $T_m = 58^\circ\text{C}$ , e o segundo centrado em aproximadamente  $T_m = 63^\circ$ . Isso pode ser atribuído à fusão das estruturas cristalinas presentes na tripalmitina. Tendo em vista que as medidas de DRX, indicaram a presença da fase  $\beta$  (BUNJES; UNRUH, 2007; CHEMISTRY et al., 1990), podemos supor que a sobreposição à formação de uma distribuição ampla em tamanho de cristais, havendo duas distribuições em maior quantidade. O aumento no valor de  $\Delta T_{1/2}$  constatado para as amostras CLN\_ATZ, comparativamente as amostras de CLNs, podem indicar um ampliação no grau de incompatibilidade (diminuição da interação) entre os lipídeos induzida pela presença do herbicida (PRASANT et al., 2015). A incompatibilidade permite que ocorra uma tendência de aumento da porção cristalina dos CLNs aumentando os valores de  $\Delta H_m$ .

Comparando as amostras de CLN\_ATZ com CLN, percebe-se que a  $T_m$  do CLN\_ATZ é menor, sugerindo que há uma menor organização nestes nanocarreadores, reduzindo automaticamente os valores da  $T_m$ . Além disso, nota-se que a temperatura de fusão cristalina ( $T_m$ ) e  $\Delta H_m$  estimado pelo  $I_c$  dos nanocarreadores aumentou nos sistemas contendo nanopartículas inorgânicas (Au@CTAB e  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @OA), levando a uma formação de estrutura mais organizada. O aumento dos valores  $\Delta H_m$ , demonstrou que a organização cristalina se sobrepõe a ampliação dos valores de dispersão de tamanho dos cristais, representado pelo alargamento dos picos de fusão observados por meio dos valores de  $\Delta T_{1/2}$  (PRASANT et al., 2015) (Tabela 6).

**Tabela 6:** Valores das curvas do DSC para os diferentes nanocarreadores sintetizados.

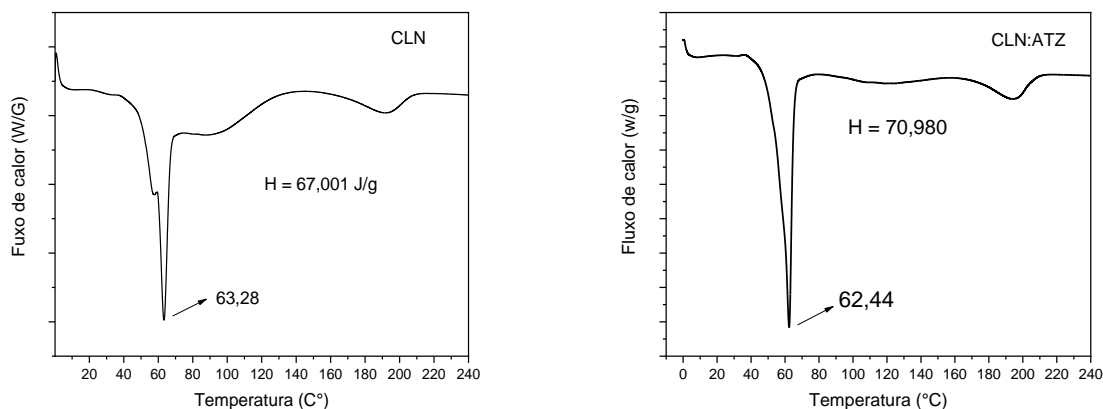
Amostra	$T_m$ ( $^\circ\text{C}$ )	$\Delta H_m$ (J/g)	$\Delta T_{1/2}$ ( $^\circ\text{C}$ )	$I_c$
CLN	63,3	67	4,6	1
CLN_ATZ	62,4	71	6,4	1,12
CLN_Au@CTAB	65	74,1	8,2	1,12
CLN_ATZ_Au@CTAB	62,4	85	5	1,28
CLN_Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @OA	64,1	73,4	9,6	1,29
CLN_ATZ_Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @OA	63,0	67	4,9	1,10

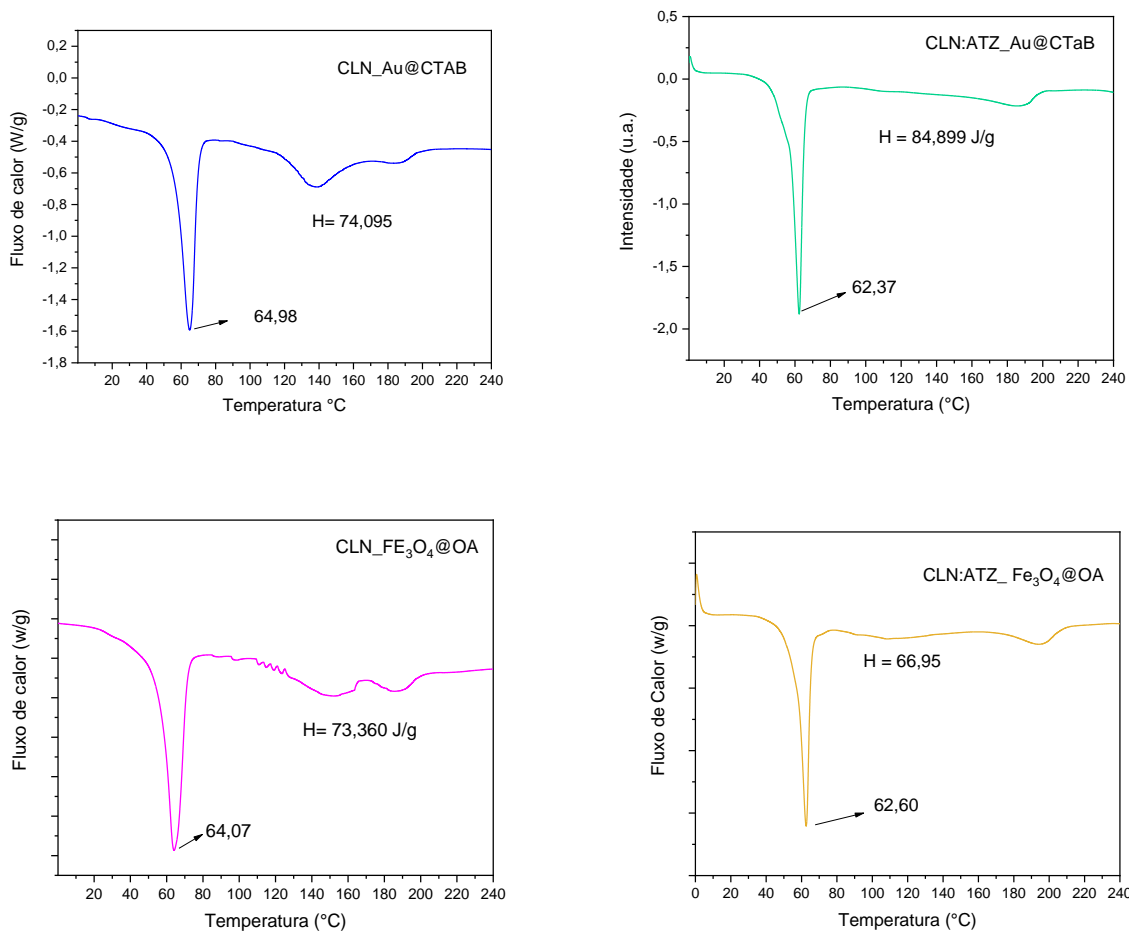
**Fonte:** Autoria própria

Nos nanocarreadores híbridos contendo nanopartícula inorgânica, pode-se notar que ao incorporar a atrazina, teve como efeito geral, a redução dos valores de  $T_m$ , corroborando com a proposta do efeito ativo do ATZ na matriz lipídica. Os valores de entalpia aumentaram ou permaneceram constantes após a adição do herbicida ATZ. Outro fator relacionado ao incremento nos valores de entalpia dos CLNs pode ser atribuído ao aumento da cristalinidade após a adição da ATZ em conformidade com o índice de cristalinidade ( $I_c$ ), visto que, quanto maior a organização do retículo cristalino de um material, maior será a energia necessária para superar as forças de coesão da estrutura e assim o comportamento de cristalização das partículas pode ser determinante na expulsão ou não do ativo durante o tempo de estocagem ou liberação (TAMJIDI et al., 2013). Entretanto, para as CLNs magnéticas, este perfil não foi observado, mostrando que o tipo de nanopartícula inorgânica associada ao carreador também interfere na entalpia do sistema e no índice de cristalinidade (Tabela 6).

Considerando os valores de dispersão obtidos para as amostras de CLN\_ATZ, pode-se sugerir que o grau de dispersão de tamanhos dos cristais seja dirigido pela associação entre os lipídeos, como a ATZ presente tende a diminuir tal associação, isso permite que a organização estrutural da matriz lipídica seja dirigida pelas nanopartículas inorgânicas.

**Figura 16.** Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), dos carreadores sem e contendo ATZ



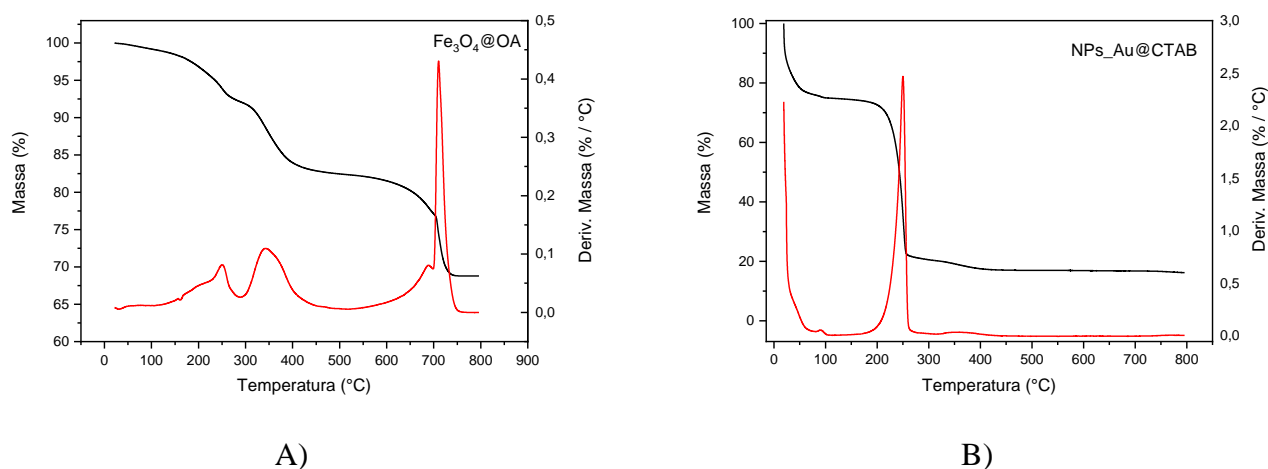


**Fonte:** autoria própria

#### 4.3.6.2 Termogravimetria (TG)

As curvas TGA/DTG das NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  revestidos com OA são mostradas na Figura 17-A. Nota-se que há quatro picos na curva DTA, tais picos estão relacionados a quatro perdas de massa presentes nas nanopartículas magnéticas. O primeiro pico centrado em  $242^\circ\text{C}$ , próximo ao ponto de ebulição ou decomposição do ácido oleico, possivelmente devido à remoção de ácido oleico livre da superfície das NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . O segundo pico centrado em  $350^\circ\text{C}$  fortemente ligado está relacionado a perda de massa de ácido oleico as NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Por sua vez o terceiro pico centrado em  $687^\circ\text{C}$  é atribuído à transição de fase de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  para  $\text{FeO}$ , que é termodinamicamente estável acima de  $570^\circ\text{C}$  como apresentado no diagrama de fases do sistema Fe-O. O quarto pico está localizado em  $711^\circ\text{C}$ , está relacionado a uma de perda de massa possivelmente devido à desoxidação de  $\text{FeO}$ , uma vez que a análise TGA/DTG foi realizada sob a atmosfera de  $\text{N}_2$  (MAHDAVI et al., 2013).

**Figura 17.** Análise termogravimétrica das nanopartículas inorgânicas: A) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@OA e B) NPs\_Au@CTAB

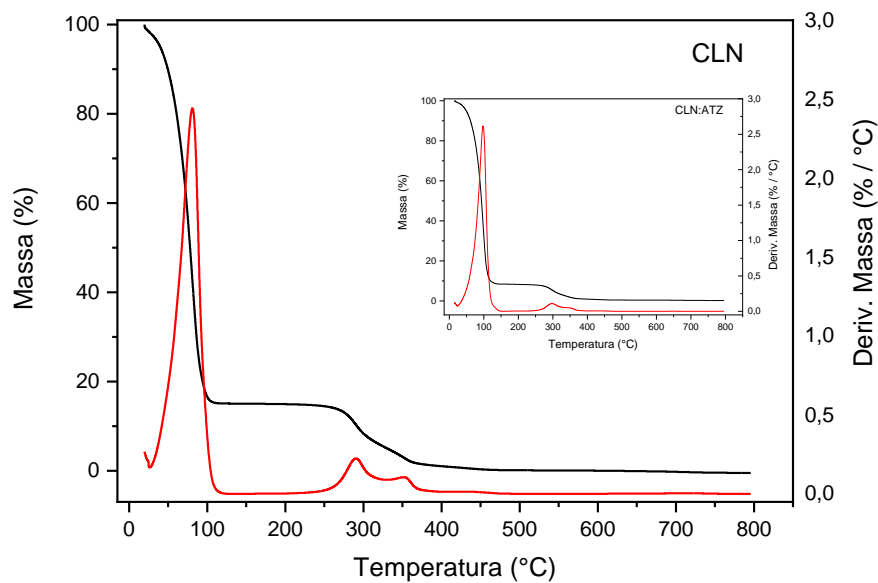


**Fonte:** autoria própria

As NPs Au@CTAB representada pela Figura 17-B, observa-se, dois picos de derivada (DTG), permitindo uma melhor visualização destes resultados, sendo o primeiro relacionado à perda de solvente orgânico e o segundo à degradação das NPs AU@CTAB. O primeiro pico, em torno de 80°C, é menos intenso corroborando para perda de massa por conta da perda de solvente da amostra. No segundo pico, centrado em 250 °C é característico da degradação do CTAB utilizado.

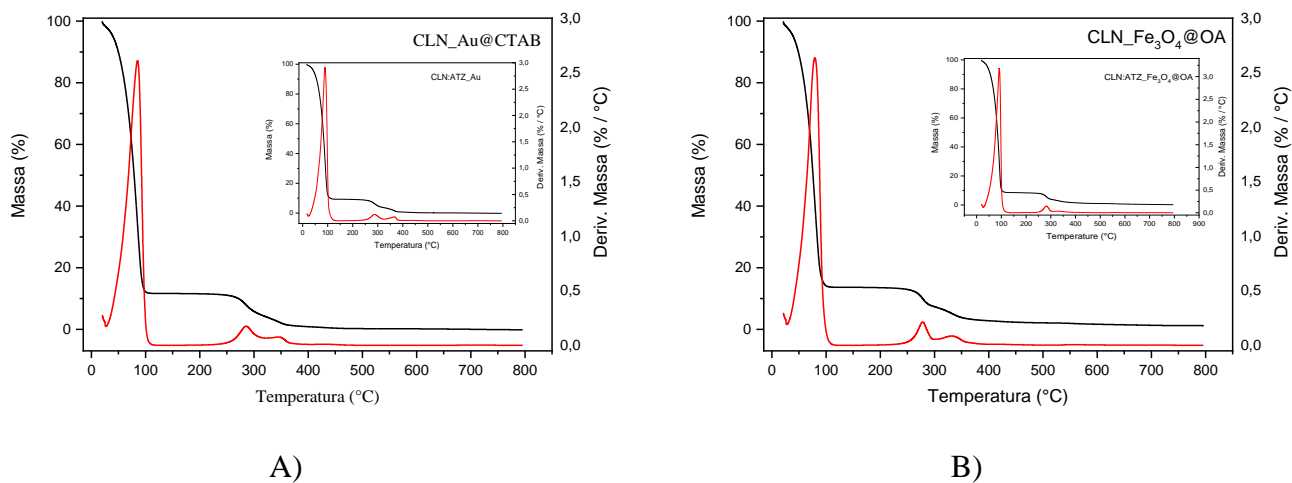
A determinação das propriedades térmicas dos CLNs (Figuras 18 e 19) permite estudar as alterações provocadas por variações da temperatura, para este fim as análises de TG foram utilizadas para avaliar a degradação térmica dos carreadores. Observa-se que em ambos os sistemas CLN, CLN\_Au@CTAB e CLN\_Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@OA sem e contendo herbicida (ATZ), ocorre uma perda de massa inicial em temperaturas abaixo de 100 °C, que está associado à perda de água e degradação de compostos voláteis. Constata-se na derivada que ocorrem três picos, sendo o primeiro em 80 °C, que corresponde a maior perda de massa por conta de perda de água nessas amostras, o segundo pico próximo a 284°C, esse valor pode ser equivalente a temperatura inicial de degradação lipídico por ruptura das ligações, para formar um composto intermediário, (transições térmicas secundárias, por não estar puro o lipídico), em torno 350 °C encontra-se o terceiro pico, indicando a perda de massa da decomposição final para todas as CLNs (GARCÍA et al., 2012)

**Figura 18.** Termogravimetria apenas dos CLNs.



**Fonte:** autoria própria

**Figura 19.** Termogravimetria dos CLNs contendo NPs inorgânicas: A) CLN\_Au@CTAB e B) CLN\_Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@OA



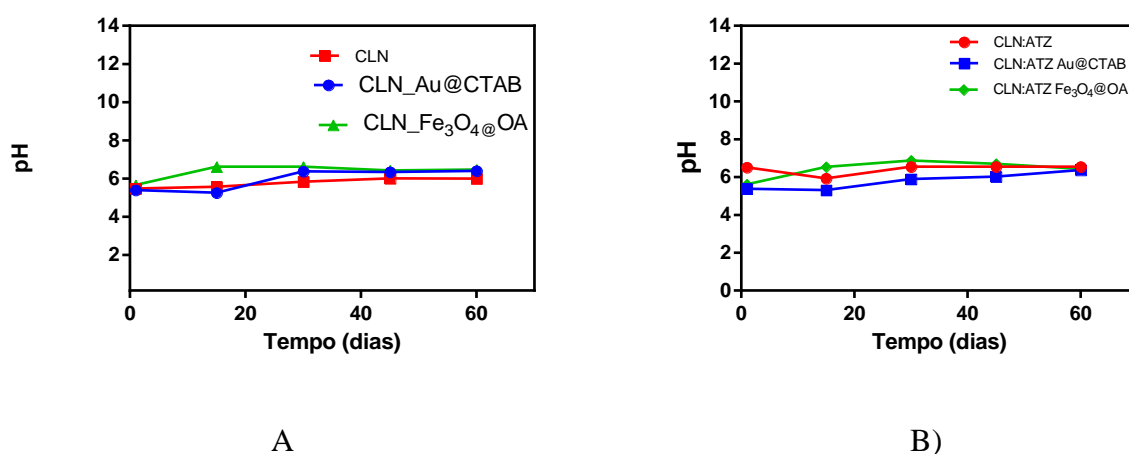
**Fonte:** autoria própria

Portanto através destas análises conclui-se que a adição do herbicida, não influenciou na perda de massa do sistema (Figura 19).

#### 4.4 MEDIDA DE ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES (PH)

O valor do pH influencia na estabilidade química dos nanocarreadores lipídicos (MOHD et al., 2019) e tem sido um importante parâmetro de estabilidade para CLNs. Alterações no valor de pH podem indicar degradação das cadeias lipídicas, uma vez que grupamentos ácidos dos lipídios podem ser transferidos à solução (FARIA et al., 2016). Assim, nota-se que com passar do tempo, o pH se manteve estável em todas as formulações (Figura 20), apresentando valores próximos aos encontrados na literatura (MOHD et al., 2019).

**Figura 20.** Estudo da estabilidade química das nanoformulações lipídicas através de valores de pH: A) CLNs sem ATZ e B) CLNs com ATZ.

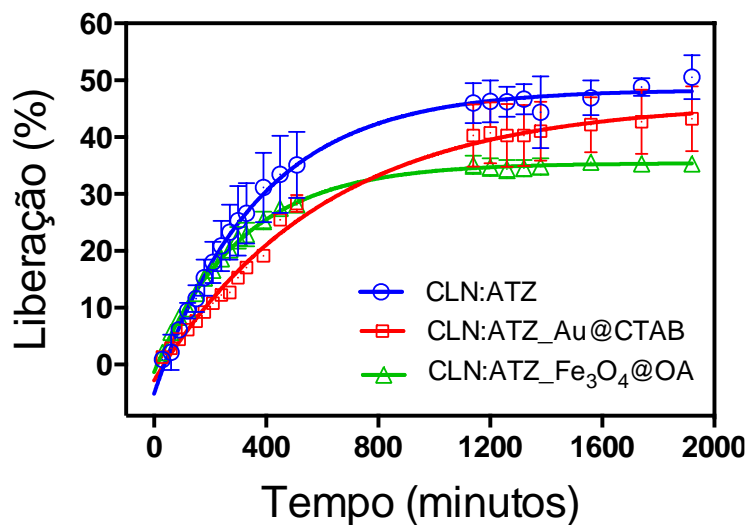


**Fonte:** autoria própria

#### 4.5 CINÉTICA DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DO HERBICIDA

A liberação de um ativo contido nas nanopartículas pode ser determinada por inúmeros fatores, entre eles, tamanho das partículas, massa molar do lipídio, natureza dos reagentes e o tipo de interação entre eles (SIEPMANN; PEPPAS, 2001). Neste sentido comparou-se a liberação dos CLNs híbridos com os CLN sem nanopartículas inorgânicas a fim de verificar alterações no perfil de cinética de liberação. Inicialmente, o perfil para todas as formulações foi rápido, devido a liberação da atrazina não associado aos carreadores e posteriormente foi se tornando mais lenta com o passar do tempo (Figura 21), mostrando que todos os CLNs sintetizados possuem capacidade para agir como sistemas de liberação de ativos.

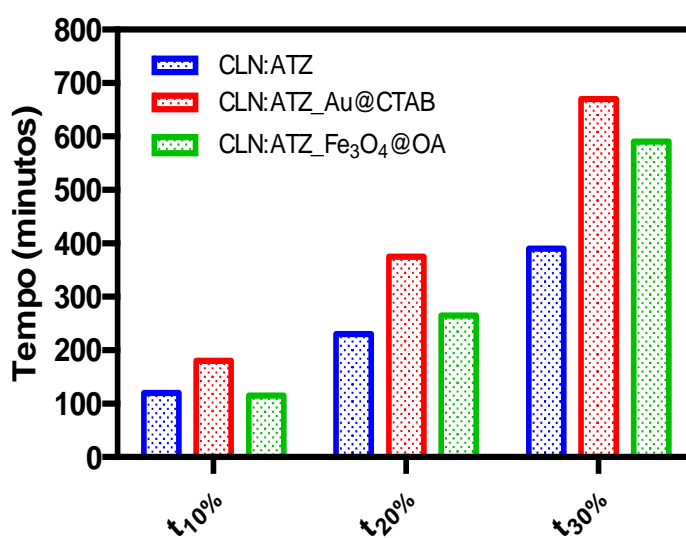
**Figura 21.** Cinética de liberação in vitro dos carreadores lipídicos nanoestruturados, em diferentes sistemas, determinação em triplicata (n=3).



Fonte: autoria própria

A Figura 22 mostra o tempo que cada formulação demora para liberar 10, 20 e 30% da atrazina. Observa-se que os CLNs, que não contêm nanopartículas inorgânicas, atingem a maior taxa de liberação em menor tempo, sugerindo que a adição das nanopartículas inorgânicas, dificultam a liberação do ativo, tornando-a mais lenta.

**Figura 22.** Comparação da liberação dos carreadores contendo o herbicida ATZ em valores de t<sub>10%</sub>, t<sub>20%</sub> e t<sub>30%</sub>.



Fonte: Autoria própria

A análise do mecanismo de liberação de ativos em nanocarreadores pode ser uma ferramenta poderosa para desenvolver novas formas de dosagem, e assim fornecer informações importantes a respeito dos fatores que governam a liberação destes ativos (LAMBERTI; GALDI; ANGELA, 2011). Portanto, alguns modelos matemáticos foram testados, conforme descrito pelas equações representadas na tabela 1, e o modelo que apresentou coeficiente de correlação ( $R^2$ ) mais próximo de 1 foi o escolhido para representar tais sistemas (Tabela 7)

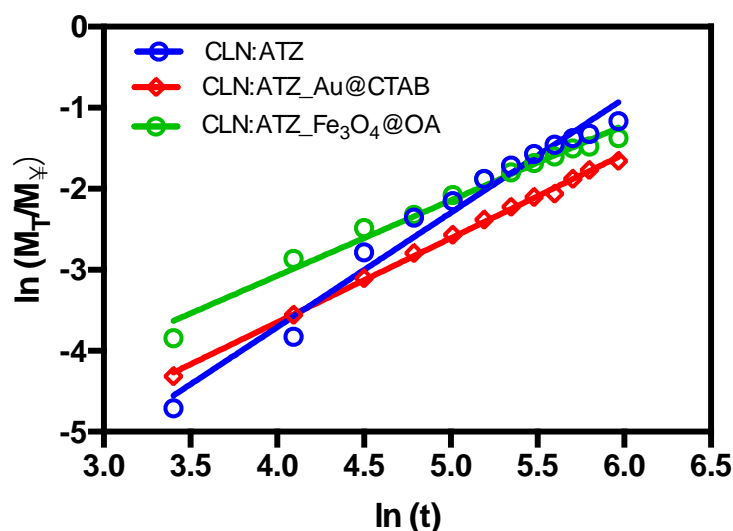
**Tabela 7.** Modelos matemáticos de cinética aplicados ao perfil de liberação da atrazina nos diferentes carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN).

Fomulações	Modelos ( $r^2$ )				
	Ordem zero	Primeira Ordem	Higuchi	Korsmeyer-Peppas	Hickson-Crowell
CLN:ATZ	0,9897	0,7840	0,4390	0,9752	0,8902
CLN:ATZ_Au@CTAB	0,9959	0,8646	0,6483	0,9980	0,9379
CLN:ATZ_Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @OA	0,9771	0,7969	0,7757	0,9808	0,8827

**Fonte:** Autoria própria

O modelo semi-empírico de Korsmeyer-Peppas (Figura 23) foi o que apresentou melhor  $r^2$ . Neste contexto, a partir das curvas de liberação, e em função deste modelo foram realizadas regressões lineares a fim de se determinar os valores da constante cinética de liberação (k), bem como o coeficiente de correlação linear (r). e, portanto, e o expoente da liberação (n) foram calculados (Tabela 8).

**Figura 23.** Modelagem matemática segundo o modelo de Korsmeyer Peppas.



**Fonte:** Autoria própria

**Tabela 8.** Dados referentes a modelagem matemática segundo Korsmeyer Peppas.

Formulações	Constante de liberação (k)	Expoente de liberação (n)	Equação da reta
CLN:ATZ	$8,65 \times 10^{-5}$	1,41	$Y = 1,412 * X - 9,355$
CLN:ATZ_Au@CTAB	$4,10 \times 10^{-4}$	1,03	$Y = 1,038 * X - 7,799$
CLN:ATZ_Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @OA	$1,12 \times 10^{-3}$	0,93	$Y = 0,9301 * X - 6,794$

**Fonte:** Autoria própria

O valor do expoente da liberação (n), é quem indica o tipo de mecanismo que está envolvido na liberação, assim variam os valores de n usados para interpretar e caracterizar o mecanismo de liberação. O cilindro é a forma geométrica mais comum dos comprimidos; neste caso, quando n é igual a 0,45, o mecanismo principal, que controla a liberação do fármaco no sistema é a difusão pura (difusão Fickiana clássica), quando o n assume o valor 0,89, a equação corresponde a cinética de liberação de ordem zero, sendo a liberação controlada por mecanismo de transporte de Caso II, ou seja, pelo fenômeno de intumescimento (relaxamento da matriz ou liberação mediante erosão). Outros valores de n ( $0,45 < n < 0,89$ ) indicam cinética de transporte anômalo, ou seja, uma combinação dos dois mecanismos de difusão e de transporte de Caso II, os valores de  $n > 0,89$  é referente mecanismo de transporte super caso-II, que consiste em fenômenos de inchamento/relaxamento da matriz, na qual envolve a transição de um estado semi-rígido a outro mais flexível, como processos determinantes na liberação do herbicida (ENSCORE; HOPFENBERG; STANNETT, 1977; KAHN, 2014; RITGER; PEPPAS, 1987).

Em nosso sistema o n estão entre 0,93 e 1,41, indicando que a liberação do ativo dentro dos CLNs foi governada pelo mecanismo de transporte super case-II, modificaram o perfil de liberação, retardando a sua liberação.

#### 4.6 EFEITO DOS CLNS EM PLANTAS AQUÁTICAS

O efeito dos CLNs foi estudado em macrófitas aquáticas neotropical de flutuação livre denominada Lemna valdiviana. Neste estudo CLNs foram incubadas em diferentes concentrações e parâmetros como superóxido dismutase, teor de pigmentos (clorofila a, b e carotenoides), peroxidação lipídica e eficiência quântica foram utilizados para medir a toxicidade, bem como a eficiência herbicida de cada CLNs nas macrófitas.

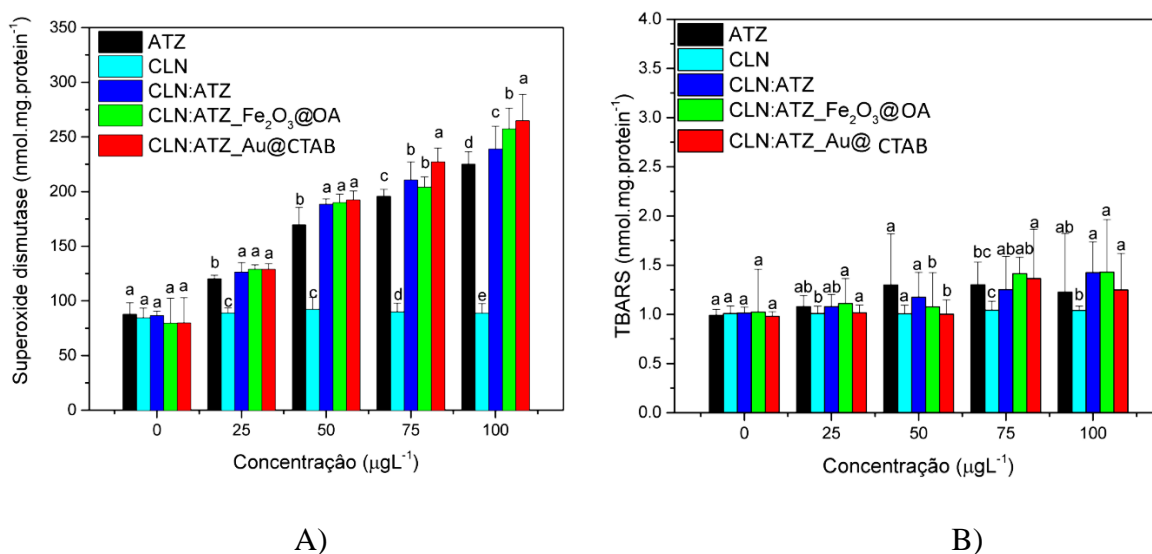
#### 4.6.1 Superóxido dismutase (SOD) e Peroxidação lipídica

Superóxido dismutase (SOD) é uma enzima antioxidante que previne a morte celular induzida por espécies reativas de oxigênio (ERO). A SOD catalisa a dismutação dos radicais superóxido, produzindo peróxido de hidrogênio. As folhas da macrófita *L. valdiviana* exibiram um aumento significativo na atividade da SOD quando comparada a atrazina em sua forma livre, e as nanoformulações contendo atrazina (Figura 24-A).

Porém, observa-se que em todos os tratamentos a atividade de SOD foi maior para os nanopesticidas. Já as formulações contendo NPs de Au@CTAB e Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@OA, para as plantas tratadas com 100 µg/L apresentaram os maiores valores de atividade da SOD. Este aumento pode estar possivelmente associado à geração de oxigênio singlete (COBB, 1992).

Embora a SOD remova os ânions superóxido, ela o faz convertendo um derivado tóxico de oxigênio (O<sup>2-</sup>) em outro (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Em conjunto, todas essas reações reduziram a formação de radicais hidroxila e oxigênio singlete, levando à peroxidação lipídica e à oxidação de proteínas. O aumento observado na atividade da SOD reflete que a enzima contribuiu para a eliminação de ERO induzida pelas nanoformulações. Para a peroxidação de lipídios, apenas as plantas tratadas com 50 e 75 µg L<sup>-1</sup> apresentaram diferenças considerando a atrazina em sua forma livre e nanoencapsulada (Figura 24-B). A peroxidação lipídica é o mecanismo mais importante envolvido na toxicidade induzida por pesticidas (NWANI et al., 2010) relacionado à degradação das membranas celulares induzidas por ERO.

**Figura 24.** Avaliação da concentração de superóxido dismutase (A) e peroxidação lipídica (B) em macrófita *L. valdiviana*

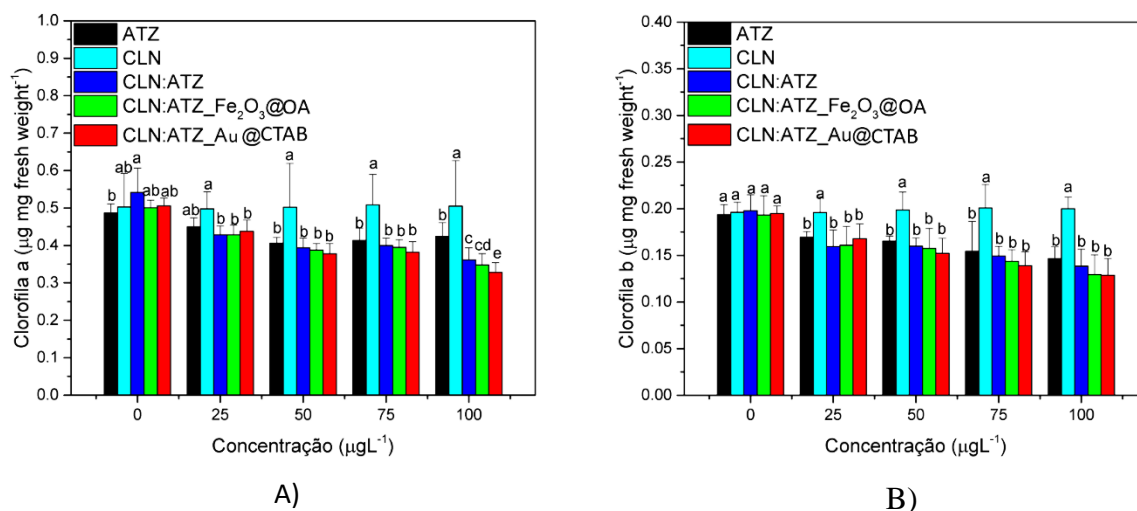


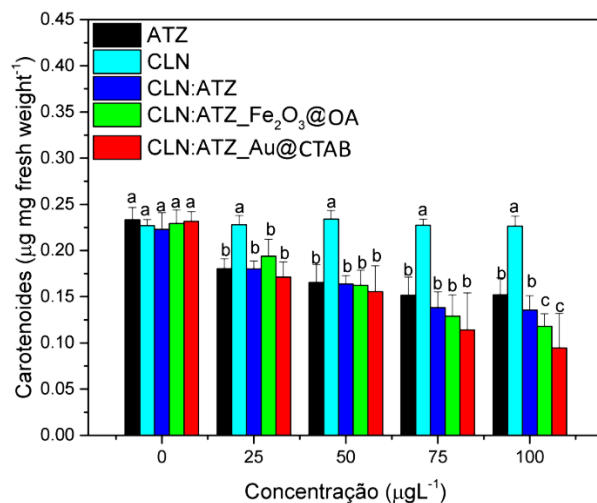
Fonte: Autoria própria

#### 4.6.2 Teor de pigmento

O dano induzido pelos CLNs híbridos sem e contendo ATZ também foram avaliados através da medição do teor de pigmentos fotossintéticos da clorofila-a (Chl-a), clorofila-b (Chl-b) e carotenoides (Car). A Chl-a é a molécula efetiva, tendo participação direta nas reações fotoquímicas, enquanto que a Chl-b e Car são pigmentos acessórios na captura e transferência de elétrons. Nota-se nas Figuras 25 que os nanocarreadores contendo atrazina apresentaram menor quantidade de pigmentos em relação ao controle (carreadores sem atrazina). Além disso, o teor de clorofila a (Chl a) foi significativamente reduzido, nas maiores concentrações do estudo, mostrando que os nanopesticidas reduziram a quantidade de Chl-a nas plantas, sugerindo danos estruturais induzidos no aparato fotossintético. Esta redução na Chl-a pode estar associada a diferentes vias: a) inibição de síntese devido a alterações induzidas na atividade de enzimas, ou regulação negativa de genes em resposta produção de espécies reativas de oxigênio (EROs); destruição da regulação positiva de Chl preexistentes em genes associados a enzimas catalíticas (clorofilase) e/ou síntese de ácido abscísico (ABA); c) outra possível via é a redução do tempo de vida das moléculas de Chl quando os níveis internos de poliaminas e citocininas também são reduzidos (HELDT; PIECHULLA 2014). No caso da atrazine, possivelmente temos uma resposta a geração de EROs, uma vez que os cloroplastos são um importante gerador de ERO, e esse efeito pode se manifestar por uma rápida diminuição na biossíntese de clorofila, induzindo sua degradação (LIOTENBERG et al., 2015).

**Figura 25.** Teor de pigmento da clorofila: A) clorofila *a*, B) clorofila *b* e C) carotenoides.





C)

Fonte: Autoria própria

Além disso, os resultados aqui apresentados mostraram que as CLNs contendo nanopartículas inorgânicas inibiram significativamente a biossíntese de Chl-a e, conseqüentemente, a quantidade total de clorofila, da biossíntese de Chl-b e Car conforme aumenta a concentração de ATZ, principalmente para as CLN:ATZ\_Au@CTAB.

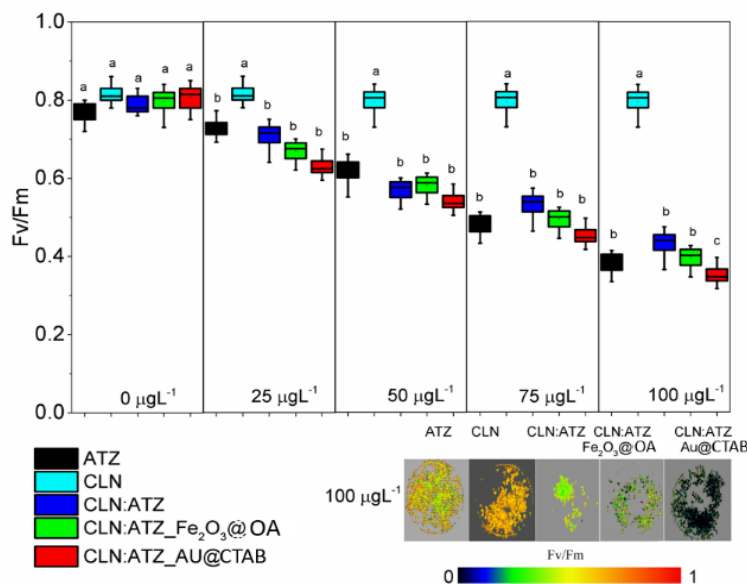
#### 4.6.4 Eficiência quântica

As respostas da eficiência quântica fotoquímica do fotossistema II (Fv/Fm) (Figura 26) apresenta um comportamento dose-resposta de inibição, e também diferem entre os nanossistemas híbridos. Observa-se um declínio significativo de Fv/Fm em função do aumento da concentração para todos os sistemas contendo ATZ. Estes resultados sugerem alterações estruturais e funcionais do fotossistema II (PSII) (LANNOYE, 1985), indicando danos da cadeia de transporte de elétrons (ETC).

O modo de ação da atrazina é relacionado a inibição da transferência de elétrons ao nível da quinona secundária (Q<sub>B</sub>) para espécies não tolerantes, as alterações em observadas em Fv/Fm confirmam que esta inibição afeta o fluxo de elétrons no PSII. Por outro lado, estes resultados nos fornecem uma evidência da maior eficiência do herbicida encapsulado na inibição do transporte de elétrons da fotossíntese como nos demais ensaios, apenas as CLN:ATZ\_Au@CTAB apresentaram menor eficiência quântica quando submetida a 100 µg/L em relação aos outros nanocarreadores e a atrazina não encapsulada. Portanto, tal resultado pode estar relacionado efeito de ressonância plasmônica, associado ao sequestro de elétrons das moléculas de clorofilas em seu estado excitado pela superfície das nanopartículas de ouro (Figura

25- C). Vale ressaltar, que tais resultados podem variar de acordo com a variabilidade genética de populações de plantas-alvo, dependendo do grau de tolerância ou susceptibilidade dos organismos a atrazina.

**Figura 26.** Fluorescência do rendimento quântico (Fv/Fm)



**Fonte:** Autoria própria

## 5 CONCLUSÃO

Neste estudo, foram desenvolvidos diferentes carreadores lipídicos nanoestruturados contendo nanopartículas magnéticas (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@OA) ou nanopartículas plasmônicas (Au@CTAB) e um sistema sem nanopartículas inorgânicas (CLNs) para o herbicida atrazina. Todas as nanoformulações foram preparadas pelo método de emulsificação evaporação do solvente e sua caracterização físico-química forneceu informações importantes sobre o perfil de cinética de liberação *in vitro* da atrazina nestes carreadores, bem como seu efeito herbicida em plantas aquáticas.

Desta maneira, todos CLNs tiveram alta eficiência de encapsulação com o herbicida (maior que 90%), indicando boa interação da atrazina com o sistema carreador, obteve-se um índice de polidispersão < 0,2 e potencial zeta negativo entre  $-5,38 \pm 0,27$  e  $-23,5 \pm 1,25$  mV. As análises de FTIR e DRX que confirmaram que a ATZ foi encapsulada nas nanopartículas, não havendo modificação na estrutura lipídica. Além disso, foi possível determinar que com a adição de ATZ às nanopartículas tiveram um aumento no tamanho médio dos CLNs, demonstrando que a encapsulação do herbicida foi bem-sucedida, verificada através de análises de NTA e DLS, que apresentaram um tamanho médio de partículas compreendido entre 215 e 427 nm com

morfologia esférica. Também, as análises térmicas DSC e TG, mostraram que com o acréscimo do ATZ, diminuiu a organização estrutural da matriz lipídica, evidenciado pela menor entalpia de transição. Durante um período 60 dias, a formulação foi estável e não houve formação de agregados durante esse período, apresentando valores de pH constantes.

Nos ensaios de cinética de liberação ficou evidente que houve um retardo na liberação dos sistemas contendo nanopartículas inorgânicas, e a aplicação do modelo matemático de Korsmeyer-Peppas mostrou que o processo de liberação da ATZ nestes CLNs é governado pelo mecanismo de transporte super caso-II. A avaliação da toxicidade do ATZ encapsulado em nanopartículas, realizado na lemna, mostrou que os diferentes sistemas de CLNs contendo ATZ foram mais efetivos na morte das plantas aquáticas, se comparado com a ATZ pura.

Portanto, pode-se concluir tais carreadores lipídicos nanoestruturado são promissores para controlar a liberação de ativos para agricultura, e conseqüentemente, podem diminuir a dose de herbicidas que causam impactos ambientais e afetam a saúde humana. Além disso, tais carreadores híbridos aqui desenvolvidos poderão ser uteis para rastrear tais nanopesticidas nas plantas, elucidando assim o porquê a ATZ encapsulada possui maior eficiência herbicida em relação a ATZ livre.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKTAR, W.; SENGUPTA, D.; CHOWDHURY, A. Impact of pesticides use in agriculture : their benefits and hazards. **Interdisciplinary Toxicol**, v. 2, n. 1, p. 1–12, 2009.

ANDROUTSOPOULOS, V. P.; Hernandez ,A. F.; Liesivuori, J.; Tsatsakis, A. M. A mechanistic overview of health associated effects of low levels of organochlorine and organophosphorous pesticides. **Toxicology**, v. 307, p. 89–94, 2013.

ANVISA, A. N. DE V. S. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos métodos analíticos**. 2003.

ARMBRUSTER, U. et al. ScienceDirect The regulation of the chloroplast proton motive force plays a key role for photosynthesis in fluctuating light. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 37, p. 56–62, 2017.

BABICK, F. et al. How reliably can a material be classified as a nanomaterial? Available particle-sizing techniques at work. **Springer Netherlands**, v. 18, 2016.

BROGAN, W. R.; RELYEA, R. A. Multiple mitigation mechanisms : Effects of submerged plants on the toxicity of nine insecticides to aquatic animals. **Environmental Pollution**, v. 220, p. 688–695, 2017.

PERLATTI, P. L. DE S. B.; SILVA, M. F. DAS G. F. DA; FORIM, J. B. F. AND M. R. Polymeric Nanoparticle-Based Insecticides: A Controlled Release Purpose for Agrochemicals. **Development of Safer and More Effective Technologies**, 2013.

BUNJES, H.; UNRUH, T. Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry , X-ray and neutron scattering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 379–402, 2007.

SANCHEZ, P.; BELLEVILLE, M. P.; AND L. N. Applications of advanced hybrid organic–inorganic nanomaterials: from laboratory to market. **Chemical Society Reviews.**, v. 40, n. 2, p.

453–1152, 2011.

CALLISTER, W. D. **Ciência e Engenharia dos Materiais: Uma Introdução**, 2008.

CAMARA, M. C. et al. Development of stimuli-responsive nano-based pesticides: Emerging opportunities for agriculture. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 17, n. 1, p. 1–19, 2019.

CAMPOS, E. V. R. et al. Polymeric and Solid Lipid Nanoparticles for Sustained Release of Carbendazim and Tebuconazole in Agricultural Applications. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–14, 2015.

CANEVALORO, S. Técnicas de Caracterização de Polímeros. **Artliber Editora**, 2004.

BRECKENRIDGE, C.B.; ELDRIDGE, C.; STEVENS, J. T. Chapter 79 - Symmetrical Triazine Herbicides: A Review of Regulatory Toxicity Endpoints. **Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology (Third Edition)**, p. 1711–1723, 2010.

Lopes, W. A.; Fascio, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**. v. 27, n. 4, p. 670–673, 2004.

CHAUDHRY, Q.; CASTLE, L. Food applications of nanotechnologies: An overview of opportunities and challenges for developing countries. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 11, p. 595–603, 2011.

CHEMISTRY, M. S. et al. Time resolved X-ray diffraction studies of the polymorphic behaviour of tripalmitin using synchrotron radiation. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 52, n. 2, p. 79–98, 1990.

CHEN, H.; YADA, R. Nanotechnologies in agriculture: New tools for sustainable development. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 11, p. 585–594, 2011.

CHENG, W.; DONG, S.; WANG, E. Synthesis and self-assembly of cetyltrimethylammonium bromide-capped gold nanoparticles. **Langmuir**, n. 19, p. 9434–9439, 2003.

CITY, I.; Sun ,Y.; Oberley L.W.; Li,Y. A simple method for clinical assay of superoxide

dismutase. **Clinical chemistry**, v. 34, n. 3, p. 497–500, 1988.

COBB, A. **Herbicides and Plant Physiology**. 2011.

COLA, D. F. et al. Sistemas carreadores lipídicos nanoestruturados para ivermectina e metopreno visando controle de parasitas. **Química Nova**, v. 39, n. 9, p. 1034–1043, 2016.

COOPER, E. R. Nanoparticles : A personal experience for formulating poorly water soluble drugs. **Journal of Controlled Release**, v. 141, n. 3, p. 300–302, 2010.

DAS, S. K.; MONDAL, T. Mode of action of herbicides and recent trends in development : A Reappraisal. **International Journal of Agricultural and Soil Science**, v. 2, n. 3, p. 27–32, 2014.

DIMKPA, C. O. et al. Recent advances in nano-enabled fertilizers and pesticides: a critical review of mechanisms of action. **Environmental Science Nano**, p. 2002–2030, 2019.

CAVALHEIRO, E. T. G.; MASSAO I.; BREVIGLIERI S. T. G. A influência de fatores experimentais nos resultados de análises termogravimétricas. **Química Nova**. p. 305–308, 1995.

ENSCORE, D. J.; HOPFENBERG, H. B.; STANNETT, V. T. Effect of particle size on the mechanism controlling n-hexane sorption in glassy polystyrene microspheres. **Polymer**, v. 18, p. 793–800, 1977.

EXTOXNET (EXTENSION TOXICOLOGY NETWORK). **Pesticides information profiles**. Disponível em: <<http://extoxnet.orst.edu/pips/ametryn.htm>>. Acesso em: 24 agosto 2019.

FARIA, D. et al. Sistemas carreadores lipídicos nanoestruturados para ivermectina e metopreno visando controle de parasitas. **Química Nova**, v. 39, n. 9, p. 1034–1043, 2016.

FILIFE, V.; HAWE, 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.

FRACETO, L. F. et al. Nanotechnology in agriculture : which innovation potential does it have ?

**Frontiers in Chemistry**, v. 4, p. 1–5, 2016.

FRACETO, L. F.; GRILLO, R. Poly (  $\epsilon$ -caprolactone ) nanocapsules carrying the herbicide atrazine : effect of chitosan-coating agent on physico-chemical stability and herbicide release profile. **Int. J. Environ. Sci. Technol.**, v. 11, p. 1691–1700, 2014.

FRANKART, C.; EULLAFFROY, P.; VERNET, G. Photosynthetic responses of Lemna minor exposed to xenobiotics, copper, and their combinations. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 53, n. 3, p. 439–445, 2002.

GAMISANS, F.; LACOULONCHE, F.; CHAUVET, A.; ESPINA, M.; GARCIA, M. L. .; EGEEA, M. A. Flurbiprofen-loaded nanospheres: analysis of the matrixstructure by thermal methods. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 179, p. 37–48, 1999.

GAO, Y. et al. Fabrication of a hollow mesoporous silica hybrid to improve the targeting of a pesticide. **Chemical Engineering Journal**, v. 364, p. 361–369, 2019.

GARCÍA, C. M. et al. Measurements of normal boiling points of fatty acid ethyl esters and triacylglycerols by thermogravimetric analysis. **Fuel**. v. 92, p. 158–161, 2012.

GEORGE, J.; SHUKLA, Y. Pesticides and cancer : Insights into toxicoproteomic-based findings. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 12, p. 2713–2722, 2011.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide Dismutases. **Plant Physiol.**, v. 59, p. 309–314, 1977.

GOHLA, S.; MA, K.; MU, R. H. Solid lipid nanoparticles ( SLN ) for controlled drug delivery  $\pm$  a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 161–177, 2000.

GOMES, S. I. L. et al. On the safety of nanoformulations to non-target soil invertebrates – an atrazine case study. **Environmental Science Nano**, p. 1950–1958, 2019.

GRILLO, R. et al. Poly (  $\epsilon$ -caprolactone ) nanocapsules as carrier systems for herbicides :

Physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 231–232, p. 1–9, 2012.

HONGDA, C.; SEIBER, J. N.; HOTZE, M. ACS Select on nanotechnology in food and agriculture: a perspective on implications and applications. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 1209–1212, 2014.

JADHAV, N. V.; PRASAD, A. I.; KUMAR, A.; MISHRA, R.; DHARA, S. .; BABU, K. R.; PRAJAPAT, C. L.; MISRA, N. L.; NINGTHOUJAM, R. S.; VATSA, R. K. Synthesis of oleic acid functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles and studying their interaction with tumor cells for potential hyperthermia applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 108, p. 158–168, 2013.

KAH, M. Nanopesticides and Nanofertilizers : Emerging contaminants or opportunities for risk mitigation ? **Frontiers in Chemistry**, v. 3, p. 1–6, 2015.

KAH, M. et al. Nanofertilizers against their conventional analogues. **Nature Nanotechnology**, v. 13, p. 677–684, 2018.

KAH, M.; TUFENKJI, N.; WHITE, J. C. Nano-enabled strategies to enhance crop nutrition and protection. **Nature Nanotechnology**, v. 14, p. 532 - 540, 2019.

KENNEDY, M. C. et al. A European model and case studies for aggregate exposure assessment of pesticides. **Food and Chemical Toxicology**, v. 79, p. 32–44, 2015.

KITAJIMA, M.; BUTLER, W. L. Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. **BBA - Bioenergetics**, v. 376, n. 1, p. 105–115, 1975.

KUCZYNSKA, P.; JEMIOLA-RZEMINSKA, M.; STRZALKA, K. Photosynthetic pigments in diatoms. **Marine drugs**, p. 5847–5881, 2015.

KUMAR, S. et al. Nano-based smart pesticide formulations: Emerging opportunities for agriculture. **Journal of Controlled Release**, v. 294, p. 131–153, 2019.

LAMBERTI, G.; GALDI, I.; ANGELA, A. Controlled release from hydrogel-based solid matrices . A model accounting for water up-take , swelling and erosion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 407, n. 1–2, p. 78–86, 2011.

LAMMOGLIA, S. et al. Assessing human health risks from pesticide use in conventional and innovative cropping systems with the BROWSE model. **Environment International**, v. 105, p. 66–78, 2017.

LANNOYE, R. Drought resistance of hard wheat cultivars measured by a rapid chlorophyll fluorescence test. **The Journal of Agricultural Science**, 1985.

LET, A.; ZAVAREZE, R. Review : Characteristics of nanoparticles and their potential applications in foods. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.15, p. 99–109, 2012.

LEUNG, M. H.; SHEN, A. Q. Microfluidic assisted nanoprecipitation of plga nanoparticles for curcumin delivery to leukemia jurkat cells. **Langmuir**, v. 34, p. 3961–3970, 2018.

LI, B.; GE, Z. Nanostructured lipid carriers improve skin permeation and chemical stability of idebenone. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 13, n. 1, p. 276–283, 2012.

LI, X. et al. A triple-stimuli responsive hormone delivery system equipped with pillararene magnetic nanovalves. **Materials Chemistry Frontiers**, v. 3, n. 1, p. 103–110, 2018.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls Carotenoids pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, p. 350–382, 1987.

LIOTENBERG, S. et al. Oxygen-dependent copper toxicity: Targets in the chlorophyll biosynthesis pathway identified in the copper efflux ATPase CopA deficient mutant. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 6, p. 1963–1976, 2015.

LOPES, E. et al. Polymeric colloidal systems containing ethionamide: preparation and physico-chemical characterization. **Die Pharmazie**, v. 55, n. 7, p. 527—530, 2000.

LU, W.; KELLY, A. L.; MIAO, S. Trends in Food Science & Technology Emulsion-based

encapsulation and delivery systems for polyphenols. **Trends in Food Science & Technology**, v. 47, p. 1–9, 2016.

GASGO, M. Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution. **EUA Patent**, US5250236A, 1993.

MAHDAVI, M. et al. Synthesis, surface modification and characterisation of biocompatible magnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Molecules**, v.18, p. 7533-7548, 2013.

MAKONI, P. A.; KASONGO, K. W.; WALKER, R. B. Short term stability testing of efavirenz-loaded solid lipid nanoparticle (SLN) and nanostructured lipid carrier (NLC) dispersions. **Pharmaceutics**, v.11, p. 397–418, 2019.

MAROOFPUR, N. et al. Relative toxicity and residual activity of nanocapsules and commercial formulations of pirimicarb and pymetrozine against *myzus persicae* (hemiptera: aphididae). **Journal of economic entomology**, v. 112, n. 6, p. 2670–2675, 2019.

JACQUESA, M. T.; OLIVEIRA, J. L.; ESTEFÂNIA V.R. CAMPOS, E. V.R.; FRACETO, L.F.; ÁVILAA, D. S. Safety assessment of nanopesticides using the roundworm *Caenorhabditis elegans*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 139, p. 245–253, 2017.

MOHD, H. H.; MOHD, F.; MOHD, S. P. A. Superolein based intravenous lipid emulsion 20 % w / w physicochemical characterization , stability and its effect on liver status. **Sains Malaysiana**, v. 48, n. 5, p. 1043–1054, 2019.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutical**, v. 385, p. 113–142, 2010.

MÜLLER, RAINER AND LUCKS, S. **Arzneistoffträger aus festen lipidteilchen (feste lipidnanosphären (SLN))**, 1996.

MÜLLER, R. H.; HARDEN, D.; KECK, C. M. Development of industrially feasible concentrated 30 % and 40 % nanoemulsions for intravenous drug delivery Development of

industrially feasible concentrated 30 % and 40 % nanoemulsions for intravenous drug delivery. **Journal Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.38, p. 420-430, 2012.

NAHAK, P.; KARMAKAR, G.; ROY, B. SAPKOTA, M.; SURAJ KOIRALA, S. Physicochemical studies on local anaesthetic loaded second generation nanolipid carriers. **Royal Society of Chemistry**, v. 5, p. 26051–26060, 2015.

NGUYEN, H. M. et al. Photoprotection for deltamethrin using chitosan-coated beeswax solid lipid nanoparticles. **Pest Manag Sci**, v. 68, p. 1062–1068, 2012a.

NGUYEN, H. M. et al. Enhanced payload and photo-protection for pesticides using nanostructured lipid carriers with corn oil as liquid lipid. **Journal of Microencapsulation**, v. 29, n. 6, p. 596–604, 2012b.

NWANI, C. D. et al. Toxicity of the herbicide atrazine: Effects on lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in the freshwater fish *Channa Punctatus* (Bloch). **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 8, p. 3298–3312, 2010.

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

PASQUOTO, T.; LIMA, R.; FRACETO, L. F. Solid lipid nanoparticles co-loaded with simazine and atrazine: preparation, characterization, and evaluation of herbicidal activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.63, p. 422 -432, 2015.

PHILIPUS, P. J.; FRISKEN, B. Direct determination of the number-weighted mean radius and polydispersity from dynamic light-scattering data. **Applied Optics**, v.45, n.10, p. 2209-2216, 2006.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. Introdução à espectroscopia. **São Paulo**, 2012.

PE,C. W.; SUCHORA, M. The influence of barley straw extract addition on the growth of

duckweed (*Lemna valdiviana* Phil.) under laboratory conditions. **Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems**, n.1, v. 415, p. 1–7, 2014.

PERDOMO, S.; BANGUESES, C.; FUENTES, J. Potential use of aquatic macrophytes to enhance the treatment of septic tank liquids. **Water Science and Technology**, v. 40, n. 3, p. 225–232, 1999.

PETEU, S. F. et al. Responsive polymers for crop protection. **Polymers**, v. 2, n. 3, p. 229–251, 2010.

PFISTER, K.; ARNTZEN, C. J. The Mode of Action of Photosystem II-Specific Inhibitors in Herbicide-Resistant Weed Biotypes. **Journal of Biosciences: Zeitschrift für Naturforschung C (ZNC)**, v. 34, n. 11 p. 996–1009, 1979.

POMPELLI, M. F. et al. Photosynthesis and photoprotection in coffee leaves is affected by nitrogen and light availabilities in winter conditions. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, p. 1052–1060, 2010.

PONTES, M. S. et al. In vitro and in vivo impact assessment of eco-designed CuO nanoparticles on non-target aquatic photoautotrophic organisms. **Journal of Hazardous Materials**, v. 396, p. 122484, 2020.

POTT, V. J.; REGO, S. C. D. A.; POTT, A. Plantas Uliginosas E Aquáticas Do Pantanal. Corumbá-MS. **Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal Embrapa**, n. 6, p. 1-12, 1986.

PRASANT, N.; GOURAB, K.; BIPLAB, R.; PRITAM, G.; MANISH, S.; SURAJ, K. C. Physicochemical studies on local anaesthetic loaded second generation nanolipid carriers. **Royal Society of Chemistry**, v. 5, p. 26061–26070, 2015.

RALIYA, R. et al. Nanofertilizer for precision and sustainable agriculture : current state and future perspectives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 6487–6503, 2017.

REZENDE, S. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

RIBEIRO, J.; FERREIRA, R. Q. **Química Analítica Experimental 2**. Vitória -ES, 2012.

RICHENDRER, H.; CRETON, R. Neurotoxicology chlorpyrifos and malathion have opposite effects on behaviors and brain size that are not correlated to changes in AChE activity. **Neurotoxicology**, v. 49, p. 50–58, 2015.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release. **Journal of Controlled Release**, v. 5, p. 37–42, 1987.

ROCHA, M. N.; FUJIMOTO, T. G. O azul do céu e o vermelho do pôr-do-sol. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v.32, n. 3, 3501-3503, 2010.

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

SCHUSTER, B. Characterization of submicron-sized drug carrier systems based on solid lipids by synchrotron radiation x-ray diffraction. **Progress in Colloid & Polymer Science**, v. 356, p. 36106, 1993.

SHAH, R. M. et al. Microwave-assisted microemulsion technique for production of miconazole nitrate- and econazole nitrate-loaded solid lipid nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 117, p. 141–150, 2017.

SHI, H. et al. 1-Laurin-3-palmitin as a novel matrix of solid lipid particles : higher loading capacity of thymol and better stability of dispersions than those of glyceryl monostearate and glyceryl tripalmitate. **Nanomaterials**, p. 1–12, 2019.

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

SJSTRM, B.; BERGENSTFIHL, B. Preparation of submicron drug particles in lecithin-stabilized

o / w emulsions I . Model studies of the precipitation of cholesteryl acetate. **Internanonal Journal of Pharmaceuncs**, v. 88, p. 53–62, 1992.

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.

STAVEN, V. et al. Development and evaluation of a test program for Y-site compatibility testing of total parenteral nutrition and intravenous drugs. **Nutrition Journal**, p. 1–18, 2016.

VALCKE, M. et al. Human health risk assessment on the consumption of fruits and vegetables containing residual pesticides: A cancer and non-cancer risk/benefit perspective. **Environment International**, v. 108, p. 63–74, 2017.

VITORINO, C. et al. The size of solid lipid nanoparticles: An interpretation from experimental design. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, n. 1, p. 117–130, 2011.

GROENEWOUD, W.M **Characterisation of polyketone polymer systems by thermal analysis techniques**.2001.

WALSBY, A. E. The extracellular products of *Anabaena cylindrica* Lemm . II . Fluorescent substances containing serine and threonine , and their role in extracellular pigment formation. **British Phycology Journal**., v. 9, p. 371–381, 1974.

WENG, Y. et al. Nanotechnology-based strategies for treatment of ocular disease. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 7, n. 3, p. 281–291, 2017.

WILSON, A. J. C. Seherrer after Sixty Years: A Survey and Some New Results in the Determination of Crystallite Size. **Journal of Applied Crystallografhy**,v. 11, n.2 p. 102–113, 1978.

WU, T. et al. Preparation, physicochemical characterization, and antioxidant effects of quercetin nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 346, p. 160–168, 2008.

XU, X. et al. A near-infrared and temperature-responsive pesticide release platform through core – shell polydopamine@pnipam nanocomposites. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v.9, n.7, p. 6424–6432, 2017.

ZHANG, S. et al. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Hydrophobic fractal surface from glycerol tripalmitate and the effects on C6 glioma cell growth. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 142, p. 377–384, 2016.

ZHAO, X. et al. Development strategies and prospects of nano-based smart pesticide formulation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 26, 2017.

## ANEXO 1



**Ministério do Meio Ambiente**  
**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**  
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO  
**Comprovante de Cadastro de Acesso**  
**Cadastro nº A754D47**

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

Número do cadastro: **A754D47**  
Usuário: **Etenaldo Felipe Santiago**  
CPF/CNPJ: **436.268.741-68**  
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**  
Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

### **Espécie**

**Lemna valdiviana**  
**Salvinia auriculata**  
**Arthrospira platensis**

Título da Atividade: **Monitoramento das alterações induzidas em organismos fotossintéticos por nanopartículas via técnicas de fluorescência da clorofila-a e espectroscopia óptica**

### **Equipe**

<b>Etenaldo Felipe Santiago</b>	<b>UEMS</b>
<b>Montcharles da Silva Pontes</b>	<b>UEMS</b>
<b>Luis Humberto da Cunha Andrade</b>	<b>UEMS</b>
<b>Anderson Rodrigues Lima Caires</b>	<b>UFMS</b>
<b>Renato Grillo</b>	<b>UNESP</b>