

RENATA APARECIDA MONTEIRO

**EFEITO DA ENZIMA PROTEOLÍTICA TRIPSINA SOBRE LIBERAÇÃO DE
COMPOSTOS BOTÂNICOS DE NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA**

Sorocaba
2020

RENATA APARECIDA MONTEIRO

**EFEITO DA ENZIMA PROTEOLÍTICA TRIPSINA SOBRE LIBERAÇÃO DE
COMPOSTOS BOTÂNICOS DE NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA**

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

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Fernandes
Fraceto

Sorocaba
2020

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Roberto e Sueli.

Aos meus irmãos Reginaldo, William e ao meu amado irmão Renato (*in memoriam*).

Ao meu noivo Bruno.

Ao meu orientador Leonardo

AGRADECIMENTOS

À Deus por permitir as inúmeras possibilidades de continuar a vida, os sonhos, e viver intensamente e por diariamente me abençoar com oportunidades e pessoas, que somatizam em minha vida.

A Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) e ao programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais.

Ao professor Dr. Leonardo, por conceder essa oportunidade, pela credibilidade, pelo auxílio e incentivo. Pela orientação, pela bolsa, que possibilitou minha permanência no curso, pelo conhecimento transmitido, aumentando minha bagagem profissional e pessoal, meu muito obrigada! Que Deus conceda a você inúmeras conquistas!

Aos meus pais Roberto e Sueli, por acreditarem em mim, por todo amor, carinho e educação, por me auxiliarem sempre, amo vocês mais que tudo nesse mundo.

Ao meu noivo Bruno, que junto a mim resolveu encarar mais esse desafio em mais uma etapa de nossas vidas. Obrigada por me dar a mão, me acompanhar, auxiliar, aconselhar em todas decisões e que venham os novos desafios. Te amo!

Aos meus irmãos Reginaldo e William, que caminham comigo nessa vida. E ao meu amado irmão Renato que sempre esteve ao meu lado e sempre acreditou em mim, e que hoje do céu acompanha cada conquista. Fisicamente não te tenho, mas mentalmente te mantenho, sei que onde quer que você esteja, estará “Sempre Comigo”!

À Estefânia, Marcela, Lucas (mineiro), Anderson, Patrícia, Jhones que nunca mediram esforços para me ajudar, da teoria à prática, pelo conhecimento transmitido, por toda paciência sempre.

Aos amigos Daniele, Cintia, Angélica, Carol, Mônica, Lucas, por toda ajuda e pelas risadas enfim todos os momentos obrigada!

Ao Sr. José e Dona Zilda, por disponibilizar do espaço na casa deles para o experimento com as plantas, por me receber tão bem, que DEUS os abençoe.

Ao professor Dr. Nilson e os auxiliares, do laboratório LaPtec, por ceder o espaço e pela disposição em auxiliar na realização dos experimentos.

A professora Dr^a Renata Lima, obrigada por ceder o laboratório para realização das análises e à Mariana Guilger por me auxiliar na realização do experimento, obrigada pela disposição e por toda ajuda!

Aos auxiliares docentes, Suzan, Leticia e Sandra pela disposição e auxílio, ao pessoal da limpeza, da portaria e secretária, que desenvolvem um papel essencial na Instituição.

Aos que diretamente e indiretamente contribuíram para que mais essa etapa se concretizasse, em minha vida por todo sentimento bom e energia, obrigada!

A vida já é curta, que ela não seja também pequena.
Mário Sérgio Cortella

RESUMO

Com o crescimento populacional, há o desafio criar métodos mais eficientes para aumentar a produção de alimentos sem esgotar os recursos naturais. Mitigando o uso de agrotóxicos e geração de resíduos no ambiente, novas tecnologias e produtos têm sido desenvolvidos, como: biopesticidas, obtidos a partir de extratos e óleos essenciais de plantas, esses componentes são menos tóxicos para o ambiente e para a saúde humana. Compostos botânicos apresentam limitações, como: baixa solubilidade aquosa, fotossensibilidade e alta volatilidade, limitando ampla aplicação. A nanotecnologia tem se mostrado importante, no melhoramento da estabilidade físico-química e eficácia dos inseticidas botânicos, por proporcionar o desenvolvimento sistemas carreadores que promovem a liberação sustentada do ativo e de sistemas estímulos responsivos capazes de responder a fatores bióticos e abióticos, quando estimulados, otimizando a ação e minimizando sua degradação prematura. Neste trabalho foram produzidas nanopartículas de zeína com compostos botânicos, carvacrol e limoneno e estudado o potencial estímulo responsivo à enzima tripsina, a fim de que liberem os ativos somente quando degradadas, ou seja quando em contato com a enzima. As ZNP foram obtidas pelo método de precipitação com antissolvente e suas propriedades e estabilidade avaliadas através da caracterização, exibindo em ZNP CTL o diâmetro inicial de 117 ± 1 nm, e ZNP LIM+CVC 111 ± 1 nm com PdI de $0,180 \pm 0,013$ para ZNP CTL e $0,139 \pm 0,012$ para ZNP LIM+CVC o potencial zeta de -30 ± 2 mV para ZNP L CTL e ZNP LIM+CVC foi de $-25 \pm 1,5$ mV para eficiência de encapsulação de $99,9 \% \pm 0,004\%$ para o LIM e $99,8 \% \pm 0,9\%$ para o CVC, já o pH em ZNP CTL foi de 8,27 e para ZNP LIM+CVC 8,30, análise de ângulo de contato obtivemos o valor do ângulo em 64° apresentando caráter hidrofílico para as ZNP LIM+CVC. Em análise de DSC e FTIR revelaram boas interações entre os ativos nanopartículas, análise de AFM foi possível observar que as nanopartículas apresentam morfologia esférica. A fitotoxicidade das ZNP foi avaliada em sementes e plantas onde para sementes apresentou um perfil dose-dependente para as concentrações maiores, e em plantas não foi observado alterações significativas no desenvolvimento da área foliar e raiz. Através das técnicas DLS e NTA e do ensaio de eletroforese foi possível verificar a degradação das nanopartículas, quando expostas à enzima tripsina em função do tempo. Resultados obtidos nos ensaios sugerem que o sistema apresenta boas perspectivas para ser utilizado como sistema de liberação baseado em degradação enzimática, e possivelmente um sistema promissor para a agricultura.

Palavras-chave: Biopesticidas, nanopartículas, zeína, limoneno, carvacrol, tripsina.

ABSTRACT

With population growth, there is the challenge of creating methods that are more efficient to increase food production without depleting natural resources. Mitigating the use of pesticides and generating waste in the environment, new technologies and products have been developed, such as: biopesticides, obtained from extracts and essential oils from plants, these components are less toxic to the environment and to human health. Botanical compounds have limitations, such as low aqueous solubility, photosensitivity and high volatility, limiting wide application. Nanotechnology has been shown to be important in improving the physical-chemical stability and effectiveness of botanical insecticides, by providing the development of carrier systems that promote the sustained release of the active and responsive stimulus systems capable of minimizing its premature degradation. In this work zein nanoparticles were produced with botanical compounds, carvacrol and limonene and studied the potential stimulus responsive to enzyme trypsin, so that the release the assets only when degraded, that is, when in contact with enzyme. The ZNP were obtained by the antisolvent precipitation method and their properties and stability were evaluated through characterization, showing in ZNP CTL the initial diameter of 117 ± 1 nm and ZNP LIM+CVC 111 ± 1 nm with PDI of $0,180 \pm 0,013$ for ZNP CTL and $0,139 \pm 0,012$ for ZNP LIM+CVC the zeta potential of -30 ± 2 mV for ZNP CTL and ZNP LIM+CVC was -25 ± 1 mV for encapsulation efficiency $99,9\% \pm 0,004$ for LIM and $99,8\% \pm 0,9\%$ for CVC the pH in ZNP CTL was 8,27 and for ZNP LIM+CVC 8,30 and contact angle analysis obtained the angle value in 64° showing hydrophilic character of ZNP LIM+CVC. In DSC and FTIR analysis revealed good interactions between active nanoparticles, AFM analysis was possible to observe that the nanoparticles have spherical morphology. Through the DLS and NTA techniques and the electrophoresis assay, it was possible to verify the degradation of nanoparticles when exposed to the enzyme trypsin as a function of time. The Phytotoxicity of ZNP was evaluated in seeds and plants where for seeds it presented a dose-dependent profile for the highest concentrations, and in plants, no significant changes were observed in the development of leaf area and root. Results obtained in the teste suggest that the system has good prospects to be used as a release system based on enzymatic degradation, and possibly a promising system for agriculture.

Keywords: Biopesticides, nanoparticles, zein, limonene, carvacrol, trypsin.

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES DE FIGURAS

FIGURA 1: Estrutura química do limoneno. Na figura pode se observar as formas enantioméricas R e S.	19
FIGURA 2: Estrutura química do carvacrol.....	20
FIGURA 3: Curva analítica obtida para A) LIM e B) CVC. Valores representam a média de três curvas realizadas.....	40
FIGURA 4: A) Caracterização do diâmetro médio das nanopartículas sem (ZNP CTL) e com os ativos (ZNP LIM + CVC), B) Índice de polidispersão das nanopartículas ZNP CTL E ZNP LIM + CVC ambos em função do tempo de armazenamento. Variações significativas entre os grupos são representados como: a – comparação com o tempo zero, b – comparação com 7 dias, c- comparação com 14 dias, d – comparação com 21 dias, e – comparação com 30 dias após esse período não houve variação significativa. Os valores representam média de três determinações. Para os gráficos C) e D) representam a intensidade do tamanho em relação ao tempo de armazenamento de 0 à 120 dias para ambas (NP CTL e NP LIM + CVC). Foi considerado significância de $p < 0,05$ (ANOVA).....	43
FIGURA 5: Avaliação do diâmetro médio pela técnica de NTA em função do tempo de armazenamento para ambas nanopartículas sem o ativos (ZNP CTL) e com os ativos (ZNP LIM + CVC). A variação significativa entre os grupos em função do tempo está representada pela letras: a - comparação com o tempo zero, b - comparação com 7 dias, c - comparação com 14 dias, d - comparação com 21 dias, e - comparação com 30 dias, f- comparação com 60 dias para 90 e 120 não houve variação significativa. Os valores representam média de três determinações. Foi considerado significância de $p < 0,05$ (ANOVA).	45
FIGURA 6: Análise da concentração de nanopartículas, em NTA em função do tempo de armazenamento para ambas nanopartículas (ZNP CTL e ZNP LIM + CVC). A variação significativa em função do tempo está representada pela letras: a- comparação com o tempo zero, b -comparação com 7 dias, c- comparação com 14 dias, d- comparação com 30 dias, para 60 dias , 90 e 120 dias não houve diferença significativa entre as formulações. Os valores representam média de três determinações. Foi considerado significância de $p < 0,05$ (ANOVA).	45
FIGURA 7: Micrografia das nanopartículas de zeína com LIM + CVC, realizadas pelo AFM. A) imagem topográfica e a imagem B) imagem em 3D das nanopartículas C) gráfico de tamanho médio das nanopartículas, tratado pelo software Gwyddion.....	48

FIGURA 8: Potencial zeta de ZNP CTL e ZNP LIM + CVC em relação ao tempo de armazenamento. A variação significativa entre os grupos em função do tempo são representados pelas letras: a-comparação com o tempo zero, para os demais dias e ambas formulações não houve uma variação significativa. Os valores representam média de três determinações. Foi considerado significância de $p < 0,05$ (ANOVA).....	49
FIGURA 9: Avaliação do pH das nanopartículas de zeína sem ativos ZNP CTL e com ativos ZNP LIM + CVC em função do tempo de armazenamento. A variação entre os grupos são representados pelas letras: a - comparação com o tempo zero, b – comparação com 7 dias, c – comparação com 14 dias, d – comparação com 21 dias, e - comparação 30 dias, f- comparação 60 dias, g- comparação 90 dias, análises realizadas até o período de 120 dias de armazenamento. Os valores representam média de três determinações. Foi considerado significância de $p < 0,05$ (ANOVA).....	50
FIGURA 10: Avaliação da eficiência de encapsulação das nanopartículas contendo os ativos limoneno (LIM) e carvacrol (CVC) durante 120 dias. Considerando a significância de $p < 0,05$ (ANOVA).....	51
FIGURA 11: Análise de ângulo de contato, realizada em superfície de feijão (<i>P. vulgaris</i>) com amostra de controle de gota d'água deionizada e gota de NP LIM + CVC	53
FIGURA 12: Termogramas de Calorimetria Diferencial Exploratória para o surfactante Pluronic, Zeína pura, ZNP CTL e ZNP LIM + CVC	54
FIGURA 13: Espectros de infravermelho para as amostras de zeína, pluronic F-68, óleo essencial de carvacrol (CVC), óleo essencial de limoneno (LIM), nanopartículas controle (ZNP CTL) e nanopartículas carregadas com limoneno e carvacrol (ZNP LIM+ CVC). ..	57
FIGURA 14 : Perfil de liberação do CVC em nanopartículas de zeína, em temperatura de 25°C, onde foram realizadas as médias das triplicatas do ensaio realizado (n=3).	58
FIGURA 15: Placas de Petri com as sementes de feijão nas diferentes soluções A) Pluronic, B) Água, C) Zeína. D) Sementes tratadas com nanopartículas sem ativos; D-1 : 0,25 µg/mL; D-2 1,25 µg/mL; D-3 : a 2,5 µg/mL; D-4: 3,75 µg/mL; D-5: 5 µg/mL. E) Sementes tratadas com ZNP LIM CVC E-1 0,25 µg/mL; E-2: 1,25 µg/mL; E-3: a 2,5 µg/mL; E-4: a 3,75 µg/mL; E-5: 5 µg/mL. Tratamentos feitos em ágar-ágar, pH 8 e temperatura ambiente. ...	60
FIGURA 16: Índice de germinação em sementes de feijão (<i>P. vulgaris</i>), tratadas em diferentes concentrações de nanopartículas. Realizados com água; surfactante Pluronic, formulação hidroetanólica de zeína e com ZNP LIM + CVC em concentrações de 0,25 ,	

1,25, 2,5, 3,75 e 5 $\mu\text{g/mL}$ com análise de variância ANOVA, com significancia estatística de $p < 0,05\%$	60
FIGURA 17: Desenvolvimento de raiz A) massa úmida B) massa seca C) das sementes de feijão (P. Vulgaris). Realizados em diferentes concentrações de ZNP LIM + CVC nas concentrações de 0,25 , 1,25, 2,5, 3,75 e 5 $\mu\text{g/mL}$ e com testemunhas em: água, surfactante Pluronic F-68 e formulação hidroetanólica de zeína.	61
FIGURA 18 : Vasos com as plantas de feijão nos tratamentos: A) Pluronic, B) Água, C) Zeína. D) Plantas tratadas com ZNP CTL; D-1 : 0,25 $\mu\text{g/mL}$; D-2 1,25 $\mu\text{g/mL}$; D-3 : a 2,5 $\mu\text{g/mL}$; D-4: 3,75 $\mu\text{g/mL}$; D-5: 5 $\mu\text{g/mL}$. E) Plantas tratadas com ZNP LIM + CVC E-1 0,25 $\mu\text{g/mL}$; E-2: 1,25 $\mu\text{g/mL}$; E-3: a 2,5 $\mu\text{g/mL}$; E-4: a 3,75 $\mu\text{g/mL}$; E-5: 5 $\mu\text{g/mL}$. Considerando a significância de $p < 0,05$ (ANOVA).....	64
FIGURA 19 : Gráfico das medições de feijão da parte aérea e da raiz das plântulas. Considerando a significância de $p < 0,05$ (ANOVA).....	65
FIGURA 20: A) Análise de clorofila a B) Análise clorofila b C) Caratenóides em plantas de feijão. Foram realizadas análises de significancia através da ANOVA $p > 0,5 \%$..	65 e 65
FIGURA 21: Efeito de diferentes pH na atividade da tripsina em temperatura de 37°C. ...	68
FIGURA 22: A) Análise do tamanho das ZNP LIM + CVC, B) Polidispersão das ZNP LIM + CVC C) Potencial zeta das ZNP LIM + CVC pela técnica de DLS D) Análise de tamanho e concentração das ZNP LIM + CVC através da técnica de NTA (para ambos gráficos). Análises em função do tempo de contato com a enzima , sem adição e com a enzima nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 minutos.....	69 e 68
FIGURA 23: SDS-PAGE em gel poliacrilamida, iniciando com o marcador de peso molecular seguindo com as formulações : Tripsina; zeína; ZNP LIM + CVC (sem a enzima); formulação de ZNP LIM + CVC + tripsina incubada nos tempos 0; 15; 30; 60 e 120 minutos.	72
FIGURA 24: Resumo dos resultados obtidos nas análises realizadas, para produção e caracterização das nanopartículas de zeína carregadas com ativos botânicos LIM + CVC e a a degradação enzimática sobre as nanopartículas.....	74

Erro! Indicador não definido.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Condições cromatográficas dos compostos utilizados neste estudo.....	29
TABELA 2: Coeficiente de correlação (r) das curvas de calibração dos compostos obtidos em três dias consecutivos e a média entre as curvas.	41
TABELA 3: Valores do desvio padrão relativo (DPR) das concentrações dos compostos LIM e CVC, determinados pela análise da precisão.....	41
TABELA 4:Valores da concentração do LIM determinado por CLAE para análise da exatidão do método analítico.....	42
TABELA 5:Valores da concentração do CVC determinado por CLAE para análise da exatidão do método analítico.....	42
TABELA 6: Valores de limite de detecção e quantificação obtidos para os compostos através da regressão das curvas analíticas (n=9).	43

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES.

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BAPNA: Benzoilarginina-p-nitroanilida

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

CTL: Controle

CVC: Carvacrol

DLS: Dynamic Light Scattering

FTIR: Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

HCl: Ácido clorídrico

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

LD: Limite de Detecção

LQ: Limite de Quantificação

NTA: Nanoparticle tracking analysis ou Rastreamento de Nanopartículas

ZNP: Nanopartículas de zeína

LIM: Limoneno

PLU: Pluronic F-68

PDI: índice de polidispersão;

pH: Potencial hidrogeniônico;

ZP: Potencial zeta.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 BIOPESTICIDAS	17
1.2 NANOTECNOLOGIA APLICADA A AGRICULTURA.....	21
1.2.1 Nanopartículas de zeína.....	23
1.2.2 Nanopartículas responsivas a enzimas	24
2 OBJETIVOS.....	26
2.1 OBJETIVOS GERAIS	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	27
3.2 MÉTODOS	29
3.2.1 Metodologia analítica para quantificação dos ativos.....	29
3.2.2 Curvas analíticas.....	30
3.2.3 Seletividade	30
3.2.4 Linearidade	31
3.2.5 Precisão.....	31
3.2.6 Limite de detecção.....	32
3.2.7 Exatidão	32
3.2.8 Preparo das nanopartículas de zeína.....	33
3.2.9 Caracterização físico-química das nanopartículas.....	33
3.2.10 Análise da estabilidade química dos componentes	34
3.2.11 Eficiência de encapsulação	34
3.2.12 Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	35
3.2.13 Ângulo de contato.....	35
3.2.14 Caracterização por calorimetria diferencial exploratória	35
3.2.15 Cinética de liberação	36
3.2.16 Avaliação da atividade enzimática	36
3.2.17 Análise morfológica das nanopartículas.....	36
3.2.18 Efeito da fitotoxicidade da formulação em germinação de sementes	37
3.2.19 Ensaio de fitotoxicidade em plantas	37

4 ANÁLISE DE DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA ATRAVÉS DE DLS, NTA E SDS - PAGE.....	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DOS ATIVOS.	40
5.1.1 Curvas analíticas.....	40
5.2 CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DA ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS	43
5.2.1 Diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão	43
5.2.2 Concentração e tamanho das nanopartículas	45
5.2.3 Análise por microscopia de força atômica	47
5.2.4 Potencial zeta.....	48
5.2.5 Eficiência de encapsulação	51
5.3 ANÁLISE DE ÂNGULO DE CONTATO SEGUNDO NORONHA ET AL. (2014) O ÂNGULO DE CONTATO PODE SER DEFINIDO COMO ÂNGULO DA SUPERFÍCIE E A LINHA TANGENTE NO PONTO DE CONTATO DA GOTA COM A SUPERFÍCIE. O ÂNGULO DE CONTATO MENOR QUE 90° INDICA QUE O MATERIAL POSSUI CARACTERÍSTICA HIDROFÍLICA, E QUANDO O θ FOR MAIOR A SUPERFÍCIE É CONSIDERADA HIDROFÓBICA (RANGEL; RANGEL; CRUZ, 2004). O MÉTODO MAIS COMUM É O MÉTODO DE GOTA SÉSSIL, ONDE A MEDIÇÃO É REALIZADAS POR UM GONIOMETRO DE ÂNGULO DE CONTATO USANDO UM SUBSISTEMA ÓPTICO PARA CAPTURAR O PERFIL DE UM LÍQUIDO PURO EM UM SUBSTRATO SÓLIDO, ATUALMENTE É UTILIZADO SISTEMAS QUAL TEM CAMERAS E SOFTWARES QUE SÃO EMPREGADOS PARA ASSIM REALIZAR A CAPTURA E ENTÃO A PARTIR DA AMOSTRA SÃO UTILIZADAS GOTÍCULAS NO TAMANHO DE 0,2 À 15 μ L PARA ASSIM ANALISAR O ÂNGULO DE CONTATO (WANG; SHI; WANG, 2015). A MOLHABILIDADE E O ACUMULO DOS PESTICIDAS NA SUPERFÍCIE DA FOLHA DE CULTURAS SÃO CONSIDERADAS IMPORTANTES, PARA AUXILIAR NA ABSORÇÃO E ADESÃO DOS ATIVOS PRESENTES NAS FORMULAÇÕES (YU ET AL., 2019). PARA O ENSAIO DE MOLHABILIDADE NA PLANTA DE FEIJÃO, FOI REALIZADO COM BASE NO ÂNGULO DE CONTATO OBTIDO.	52
5.3.1 Análise de calorimetria diferencial exploratória	54
5.4 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO	55
5.5 CINÉTICA DE LIBERAÇÃO.....	58
5.6 ENSAIO DE FITOTOXICIDADE.....	59
5.6.1 Em sementes	59

5.6.2	Efeito fitotóxicos em plantas	64
5.7	ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA TRIPSINA	68
5.8	DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DAS NANOPARTÍCULAS	PARA O ENSAIO DE
	DEGRADAÇÃO DAS ZNP LIM+CVC COM A ADIÇÃO DA ENZIMA TRIPSINA, FORAM	
	REALIZADOS ANÁLISES DO DIÂMETRO MÉDIO E POLIDISPERSÃO E TAMBÉM	
	CONCENTRAÇÃO E DIÂMETRO MÉDIO (NTA). OS ENSAIOS FORAM REALIZADOS COM 950	
	µL DA FORMULAÇÃO ZNP LIM + CVC SEM A ENZIMA ADICIONANDO 50 µL DE ÁGUA	
	(AMOSTRA DE CONTROLE), PARA A AMOSTRA COM ADIÇÃO DA ENZIMA TRIPSINA, FORAM	
	UTILIZADOS 950 µL DE ZNP LIM + CVC E 50 µL DE ENZIMA, EM FUNÇÃO DO TEMPO	
	0, 15, 30, 60, 90 E 120 MINUTOS, APRESENTADOS NA FIGURA 22.....	69
6	CONCLUSÃO	73
7	REFERÊNCIAS	75

1. INTRODUÇÃO

Com o crescimento contínuo da população mundial, ocorre também o aumento da demanda por alimentos. Entretanto, um dos principais fatores que limitam a produção agrícola são as perdas devido a doenças e a presença de pragas que acometem as culturas de importância (CERDA et al., 2017). Dentre as pragas agrícolas, os insetos são conhecidos por gerarem as maiores perdas econômicas, o que exige um controle fitossanitário mais eficiente através da utilização de produtos químicos, intensificado no início com a Revolução Verde (PINGALI, 2012).

A Revolução Verde se iniciou no Brasil, na década de 60-70, com a promessa de modernização no campo, de erradicação da fome, de aumento da produção, e sobretudo, com a nova era da agricultura e a promessa de desenvolvimento aos países subdesenvolvidos. Assim começaram a ser delineados os traços do agronegócio com a difusão de tecnologias agrícolas que, procuravam espaço no mercado de consumo como os agrotóxicos e fertilizantes químicos (LAZZARI; SOUZA, 2017).

O Brasil tem sido apontado como grande consumidor de agrotóxicos para produção de alimentos (PIGNATI et al., 2017) entretanto dados da FAO (2017) contradiz essas pesquisas e apresenta o Brasil em 7ª lugar no ranking mundial de consumo de agroquímicos, mesmo estando em uma colocação considerável o Brasil é o que mais produz e exporta grãos no mundo.

E uma das causas dessa produção em massa tem sido crescimento da população que também ocasiona o aumento do uso e a ocupação de áreas agriculturáveis sem a devida preocupação ambiental. E em razão disso o uso de agrotóxicos torna-se elevado em sistemas de produção intensivos, acarretando o aumento de concentrações residuais e da deriva de agrotóxicos ocorridas durante o processo de aplicação dos produtos, gerando assim grandes problemas ambientais, relacionados até mesmo com custo sociais do trabalho agrícola (ALBUQUERQUE et al., 2016).

Diante dos problemas supracitados, relacionados ao uso indiscriminado dos agrotóxicos, há a necessidade de uma nova revolução na agricultura por meio da implementação da agricultura sustentável (CAIRA; FERRANTI, 2016). Neste modelo agrícola é priorizado a diminuição do uso de agrotóxicos e o emprego de métodos menos tóxicos a organismos não alvo para o controle de pragas, como por exemplo o uso de

compostos naturais, dentro do qual podemos destacar o uso dos pesticidas botânicos (DAR et al., 2014; CAMPOS et al., 2016) e ainda a continuação de diferentes abordagens, como por exemplo, a união dos pesticidas botânicos com inimigos naturais a fim de controlar de forma mais eficaz uma determinada praga (CAMPOS et al., 2018b). Além disso, a nanotecnologia tem se mostrado uma ferramenta potencial para revolucionar a agricultura e os sistemas alimentares (PRASAD; BHATTACHARYYA; NGUYEN, 2017) pois é capaz de reduzir a utilização de agrotóxicos, melhora a performance dos biopesticidas e ainda permite a elaboração de carreadores responsivos a estímulos pré-determinados.

Com isso empresas tem buscado parcerias em meio científico para o desenvolvimento de nanopesticidas, que sejam capazes de manter a estabilidade de ingredientes ativos quando expostas ao meio ambiente, alcançando com eficiência a entrega do ativo ao organismo alvo, além de reduzir a dispersão no ambiente. Esses sistemas considerados inteligentes ainda dispõe de algumas limitações na área agrícola, entretanto essa tecnologia tem sido aplicada na área da medicina com ênfase. Por essa razão se faz necessário o desenvolvimento de formulações que sejam capazes de responder a fatores bióticos e abióticos (CAMARA et al., 2019).

1.1 Biopesticidas

De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA, 2015) biopesticidas são agentes de proteção de culturas provenientes de fontes naturais, como por exemplo, animais, plantas, microrganismos e alguns minerais (US EPA, 2015). Dentre as vantagens do emprego dos biopesticidas no controle de pragas, podemos destacar, novos mecanismos de ação que diminuem a velocidade do desenvolvimento de pragas resistentes, e também a toxicidade para organismos não-alvo, bem como para o ambiente e saúde humana. Além disso, a maioria dos biopesticidas apresentam amplo espectro de ação fazendo com que estes sejam empregados de forma generalizada no controle de pragas (VILLAVERDE et al., 2014)

Os pesticidas botânicos são em sua maioria óleos essenciais produzidos como metabólitos secundários pelas plantas aromáticas. Estes óleos desempenham um papel importante no ciclo de vida das plantas, atuando como sistema de defesa contra aos ataques de patógenos e herbívoros, ou atraindo polinizadores e disseminadores de sementes (REGNAULT-ROGER, 1997; ISMAN, 2000; REGNAULT-ROGER; VINCENT;

ARNASON, 2012). Os óleos essenciais são responsáveis pelos diferentes sabores e aromas das plantas aromáticas (NAGEGOWDA, 2010). Estes óleos consistem em misturas complexas de compostos voláteis e lipofílicos, com tipicamente cerca de 20-60 substâncias, das quais duas ou três são consideradas como compostos principais pois estão presentes em concentrações elevadas, enquanto as outras substâncias se encontram em níveis residuais.(GUIMARÃES et al., 2015).

Os óleos essenciais podem exibir diferentes propriedades dos seus compostos majoritários. Muitos compostos como óleo de NIM tem apresentado efeitos inseticidas. Cepeda-Palacios et al., (2014), testaram o óleo de NIM para o controle de pragas e verificaram a mortalidade larval de *Ostrus ovis* (Oestridae). Tomazelli Júnior et al. (2017), através do spray dryer, encapsulou óleo de tomilho, para analisar o potencial bactericida contra *V. alginolyticus* e *V. parahaemolyticus*, e o processo de secagem por pulverização não afetou atividade antimicrobiana, nos organismos testados. Enquanto outros estudos encapsularam os óleos de hortelã-pimenta e limoneno em zeína, sendo avaliada a liberação do ativo desses sistemas (CHEN et al., 2018).

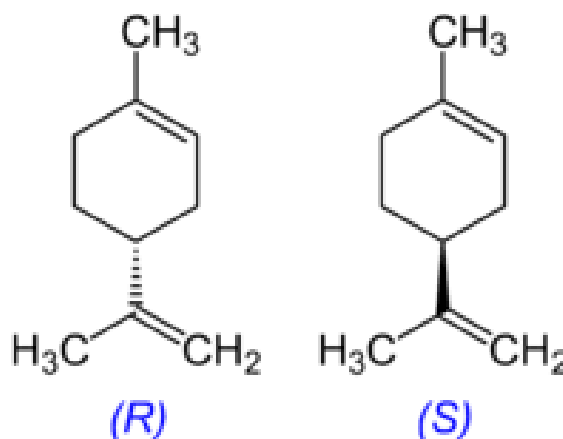
Com alto poder inseticida, o limoneno tem sido muito utilizado na fabricação de diversos produtos com essa finalidade, por apresentar baixa toxicidade a organismos não-alvo, além do mais pode ser utilizado em várias de substâncias como tolueno, xileno, éteres, solventes clorados e fluorados (PIRES; RIBEIRO; MACHADO, 2017).

O limoneno (LIM) definido pela IUPAC como: 1-metil-4- (prop-1-en- 2-il) ciclohex-1-eno é um composto orgânico monoterpene, o qual possui a fórmula molecular $C_{10}H_{16}$. Está presente nas cascas de frutas cítricas como, a laranja e o limão, além de outras plantas e ervas. É considerado um composto altamente volátil, tendo assim seu odor uma característica marcante. Por ser facilmente encontrado na natureza, além de ser considerado renovável e de baixo custo, tem sido muito utilizado em cosméticos, produtos de limpeza, agroquímicos, produtos alimentícios e medicamentos (WRÓBLEWSKA, 2014). Entretanto o limoneno apresenta baixa solubilidade em água, sendo 0,65 a 2,1 $mg.L^{-1}$ (PUBCHEM, 2019).

Sua estrutura apresenta dois enantiômeros (Figura 1), sendo esses os mais abundantes monoterpeneos na natureza. O (S)-(-)-Limoneno, conhecido também como L-limoneno, pode ser facilmente encontrado em plantas e ervas como a *Mentha ssp.*, enquanto que o (R)-(+)-Limoneno, também conhecido como D-limoneno, é encontrado em cascas de frutas

cítricas como laranja e limão e é o componente majoritário, atingindo concentrações de 90 a 96% (BICAS; PASTORE, 2007).

FIGURA 1: Estrutura química do limoneno. Na figura pode se observar as formas enantioméricas R e S.



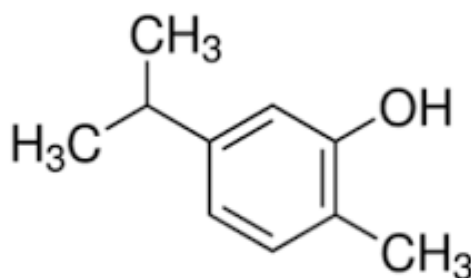
Ensaio *in vitro* utilizando peritonite induzida por zymosan, foram realizados por (KUMMER et al., 2013) para averiguar propriedades anti-inflamatórias do limoneno a partir da casca de *Citrus latifolia* Tanaka. Os autores confirmaram a diminuição de neutrófilos quando formil-Met-Leu-Phe e o leucotrieno B4 foram empregados como quimioatraente.

Estudos realizados por Rehman et al. (2014), propuseram que o limoneno poderia ser utilizado para preservar os rins de efeitos colaterais do agente quimioterápico doxorrubicina. Autores relataram que uma dieta com limoneno foi oferecida a ratos Wistar pelo período de 20 dias antes da administração de doxorrubicina. Os resultados apresentados mostraram aumento de TNF- α , do fator nuclear Kappa B (NF- κ B), iNOS e COX-2. Tais marcadores inflamatórios foram restaurados no grupo tratado com limoneno. Análises histológicas realizadas, apresentaram a preservação dos rins e baixa infiltração de neutrófilos no grupo tratado com o limoneno.

Além dos estudos na área da saúde o limoneno tem também sido alvo de estudos na área agrícola, com destaque para a atividade inseticida contra espécies de pulgões *A. pisum*, *A. fabae*, *M. euphorbiae* e *R. padi* (CHAIEB et al., 2017).

Outro composto que merece destaque é o carvacrol (CVC). O carvacrol (2-metil-5-[1-metil-etil] fenol) (Figura 2) é um monoterpreno fenólico encontrado no óleo essencial de plantas aromáticas dos gêneros *Origanum*, *Thymus*, *Tymbra*, entre outros. Esse composto é conhecido por suas propriedades tóxicas sobre muitos invertebrados, tais como, ácaros, insetos e nematoides (ENAN, 2001; E ENAN, 2005; CETIN et al., 2010).

FIGURA 2: Estrutura química do carvacrol.



Dentre as vantagens da utilização deste composto estão a baixa toxicidade para peixes, organismos aquáticos e espécies não-alvo, bem como sua rápida biodegradação no ambiente, tendo a solubilidade em água de $1,25 \text{ mg.mL}^{-1}$ a 25°C . Nos insetos o mecanismo de ação deste composto se dá pela inibição não competitiva da acetilcolinesterase (AChE) através da ligação em receptores nicotínicos, em um local diferente do sítio de ligação da acetilcolina (CAMPOS et al., 2018b).

Um recente estudo publicado por Damalas et al. (2018) estima-se que em 2050 o uso dos biopesticidas se igualarão aos pesticidas sintéticos em relação ao tamanho de mercado. Entretanto, para que este objetivo seja atingido devem ser superadas algumas barreiras da utilização dos biopesticidas, tais como, melhor controle de pragas, diminuição nos custos de produção, aumento da vida de prateleira e criação de regulamentação específica para estes compostos.

Algumas espécies de plantas com propriedades botânicas e que são utilizadas para o manejo de pragas, foram consideradas os primeiros inseticidas botânicos. Nesse viés tem-se a nicotina extraída do *Nicotiana tabacum* L, a piretrina extraída de *Chrysanthemum cinerifolium* Calli, a rotenona obtida de *Derris* spp. e de *Lonchocarpus* spp., a sabadina extraída da sabadila, *Schoenocaulon officiale* Lind, e a rianodina obtida de *Rhyania* sp. (ISMAN, 2006; ISMAN; GRIENEISEN, 2014) as quais tornaram-se muito populares e importantes entre as décadas de 30 e 40. O Brasil foi um grande produtor e exportador de

piretro, rotenona e nicotina (MENEZES, 2005). Entretanto devido à problemas como a eficiência, a grande variabilidade na concentração dos ingredientes ativos nos óleos e entre os diferentes cultivos, eles foram gradativamente sendo substituídos por pesticidas sintéticos (DAR et al., 2014).

O uso indiscriminado das substâncias sintéticas trouxe inúmeras preocupações quanto aos impactos negativos, tanto para saúde humana e animal, quanto para o ambiente. Estas preocupações trouxeram à tona novamente a questão da utilização dos inseticidas botânicos, no controle de pragas, porém agora de uma forma mais eficiente, através da associação com outras tecnologias, visando não só o aumento da eficiência, mas também a diminuição do impacto ambiental negativo (OLIVEIRA et al., 2014; CAMPOS et al., 2016; GABRIEL PAULRAJ et al., 2017).

1.2 Nanotecnologia aplicada a agricultura

A união da biotecnologia com a nanotecnologia tem resultado no desenvolvimento de sensores com alta sensibilidade, resultando em uma resposta mais rápida às alterações ambientais (PRASAD; BHATTACHARYYA; NGUYEN, 2017). Esses dispositivos viabilizarão cada vez mais uma agricultura científica. A "agricultura inteligente" é o produto dos atuais aperfeiçoamentos científicos e tecnológicos, com base em um conjunto de tecnologias formados pela biotecnologia, informação e comunicação tecnológica e a nanotecnologia. Esta "agricultura inteligente" pode inovar a agricultura no século 21, de maneira mais brusca que a Revolução Verde, que gerou grandes modificações no século passado (CHAUDHARY; MISRA, 2016).

Na literatura, podemos verificar que ainda muitos são os obstáculos encontrados, para aplicabilidade da nanotecnologia na área agrícola, o que tem auxiliado nessa limitação no crescimento do setor agroindustrial, cerca de 1% de trabalhos estão relacionados (KAH; WALCH; HOFMANN, 2018b).

A implantação de uma agricultura sustentável, que garanta a preservação do ambiente e a segurança alimentar, é um aspecto crucial para a evolução da humanidade frente as mudanças climáticas e a redução das fontes de reservas energéticas não renováveis. Perante os prognósticos de crescimento populacional mundial, que deverá atingir 9 bilhões de habitantes em 2050 (FAO, 2017), há um obstáculo em gerar metodologias mais

desenvolvidas e eficientes capaz de otimizar a produção de alimentos e energia renovável sem esgotar os recursos naturais. Desta forma, a associação da nanotecnologia com os pesticidas botânicos tem sido uma ferramenta potencial para o desenvolvimento da agricultura sustentável (CERDA et al., 2017). Mas faz-se necessário saber se os benefícios apresentados são satisfatórios em práticas agrícolas, associadas ao crescimento e a eficácia dos custos (KAH; WALCH; HOFMANN, 2018a).

De acordo com a União Européia dentre as ferramentas chaves para o desenvolvimento global sustentável encontra-se a nanotecnologia. Esta tecnologia está sendo amplamente estudada e empregada em muitas áreas da ciência, inclusive no ramo agrícola. Na agricultura, a nanotecnologia oferece avanços na pecuária, controle de insetos e tratamento de solos (CHEN; YADA, 2011), bem como na produção, armazenamento, processamento, embalagem e transporte de produtos agrícolas (FRACETO et al., 2016; DASGUPTA; RANJAN; RAMALINGAM, 2017; PRASAD; BHATTACHARYYA; NGUYEN, 2017; SADEGHI et al., 2017).

Os benefícios da nanotecnologia para a agricultura podem ser destacados; como exemplo: *i) o controle de pragas e doenças usando nanoformulações que permitam a liberação sustentada de agroquímicos, melhorando sua eficácia e diminuindo as concentrações necessárias para alcançar os efeitos desejados; ii) liberação sustentada de fertilizantes para aumentar o crescimento das plantas, reduzindo as perdas no escoamento e diminuindo os problemas de poluição da água, como a eutrofização; iii) transferência de genes ou DNA mediada por nanopartículas, auxiliando no desenvolvimento de espécies resistentes a pragas e/ou doenças; iv) uso de nanomateriais para o desenvolvimento de biossensores capazes de detectar sinais de doenças e/ou predadores, bem como identificação de falta de nutrientes e água; e v) novos métodos economicamente viáveis para a remoção de poluentes do solo e para tratamento de água* (FRACETO et al., 2016; DASGUPTA; RANJAN; RAMALINGAM, 2017; SADEGHI et al., 2017).

A nanotecnologia aplicada como desenvolvimento de carreadores auxilia nas limitações dos inseticidas, herbicidas naturais que são utilizados muitas vezes para controlar doenças e pragas. Utilizando esses sistemas juntamente aos produtos sintéticos, esses podem superar os problemas relatados, além de auxiliar no controle de danos causados no meio ambiente (ROY et al., 2014).

Os objetivos da utilização das formulações de nanopartículas são: ampliar a solubilidade e estabilidade dos compostos, liberação de maneira sustentada, protegendo assim a deterioração precocemente. Assim permitirá que o composto ativo mantenha-se por um período maior no ambiente e que possam alcançar o organismo alvo, diminuindo a manifestação em organismos não alvos (OLIVEIRA et al., 2014).

A produção de nanomateriais deve ser fundamentada na nanotecnologia verde, por meio da aplicação de solventes seguros e polímeros biodegradáveis, biocompatíveis e de baixa toxicidade (LUO; WANG, 2014).

Lowry et al. (2019) descreveram que a nanotecnologia poderá auxiliar na utilização de matérias-primas como: luz, água e solo, proporcionando um controle no estresse abiótico e biótico para a agricultura. Além dos benefícios supracitados, através da nanotecnologia é possível o desenvolvimento de sistemas “inteligentes” que ao receberem estímulos apresentam uma resposta ativa e liberam a molécula carreada para o meio circundante (KAMALY et al., 2016a). Dentre os estímulos empregados para induzir a liberação da molécula do interior dessas nanopartículas, existem as alterações de parâmetros bioquímicos, como por exemplo a modulação da concentração e/ou a presença de uma enzima. As enzimas têm se tornado ferramentas chaves para o desenvolvimento da nanobiotecnologia devido as suas capacidades excepcionais de reconhecimento biológico e excelentes propriedades catalíticas (KAMALY et al., 2016a; CALLMANN; GIANNESCHI, 2017).

1.2.1 Nanopartículas de zeína

Uma das principais proteínas presente no milho, a zeína apresenta cerca de 50% do teor total de proteínas. Esta proteína apresenta caráter hidrofóbico devido à composição de aminoácidos, com alto conteúdo de leucina, prolina e alanina (PENALVA et al., 2017; CAMPOS et al., 2018b). Além disso, a zeína é conhecida por sua alta resistência térmica e ótimas propriedades de barreira ao oxigênio, o que a torna interessante para o encapsulamento de compostos sensíveis à oxidação e/ou temperatura (ANDERSON; LAMSAL, 2011; PENALVA et al., 2017).

A composição de partículas coloidais acontece, facilmente com a alteração da possibilidade de solubilizar o solvente primário por diluição em um não solvente, método conhecido como precipitação anti-solvente ou dispersão líquido-líquido (PATEL;

VELIKOV, 2014). Com esse procedimento, a zeína é primeiramente dissolvida em uma solução hidroetanólica (55-90%) posteriormente a solução é injetada em uma solução aquosa, no qual um tensoativo pode ser incluso, assim ocorrerá a divisão em fases e como consequência ocorrerá a formação de partículas por precipitação (ZHANG; LUO; WANG, 2010).

Atualmente, a zeína é amplamente utilizada pelas indústrias alimentícia e farmacêutica devido à sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, boa biodisponibilidade e baixo custo (LUO et al., 2011a).

Há poucos estudos aplicados a agricultura, entretanto alguns pesquisadores têm trabalhado no desenvolvimento de biopesticidas biodegradáveis visando diminuir o uso de pesticidas sintéticos. Oliveira et al. (2018) produziram nanopartículas de zeína carregadas com geraniol e R-citronelal para demonstrar a repelência contra *T. urticae*, onde obtiveram resultados promissores em relação a repelência e também comprovaram que as nanopartículas recobertas de zeína são capazes de promover volatilização mais lenta dos ativos botânicos.

Zhang et al. (2014) desenvolveram nanopartículas de zeína carregadas com timol e estabilizadas com caseinato de sódio, visando aprimorar as propriedades antimicrobianas e físico-químicas das nanopartículas.

1.2.2 Nanopartículas responsivas a enzimas

Os sistemas de liberação de compostos de interesse agrícola são desenvolvidos no intuito de modular a taxa de liberação do ingrediente ativo de maneira controlada, porém, em geral, não ocorre o controle espaço-temporal dos compostos ativos. Desta forma, o desenvolvimento de formulações “inteligentes” tem ganhado atenção especial nas últimas décadas, onde é possível regular a liberação do ingrediente ativo conforme a necessidade, através de um mecanismo de acionamento por estímulos endógenos e/ou exógenos (KAMALY et al., 2016a).

Esse tipo de nanoformulação ganhou interesse considerável na ciência farmacêutica, onde estudos conseguiram desenvolver formulações em que a liberação do fármaco no local de ação foi alcançada através de diferentes estímulos, além da tensão de tração, pH,

temperatura desencadeado por proteases (LALÉ; KOUL, 2018) esses sistemas são capazes de responder a fatores bióticos e abióticos. Embora muito desses mecanismos de estímulo possam ser empregados no ramo agrícola, estudos acerca do desenvolvimento desses sistemas para aplicações agrícolas são pouco explorados (KAMALY et al., 2016b; HUANG et al., 2018).

As proteases desempenham um papel importante no metabolismo de todas as formas de vida, incluindo procariotos, fungos, animais e plantas (WILKINS, 2017a). As serino proteases, como tripsinas e quimotripsinas são enzimas proteolíticas dominantes no intestino de insetos (LIU et al., 2017; WILKINS, 2017b), são provenientes de insetos e apresentam atividade ótima em pH altamente alcalino. Assim, as enzimas podem ser consideradas fortes candidatas a serem empregadas como agentes desencadeadores de liberação para a produção de formulações inteligentes para a liberação de pesticidas naturais e/ou sintéticos na agricultura (AKBAR; SHARMA, 2017b).

Um papel importante desempenhado pelas nanopartículas estímulo responsivas tem sido esse controle espaço-temporal, podendo dispor de sistemas on/off, ou seja as nanopartículas liberam os ativos quando estimuladas, durante um determinado tempo e sistemas com indução de liberação ocorrendo em pequenas proporções, entretanto quando estimulada ocorre um aumento (GAO et al., 2017).

Um sistema de liberação de um inseticida fotocontrolado foi descrito por Gao et al. (2017), onde estabeleceram uma ligação covalente entre cumarina e fipronil, obtendo dessa forma um sistema on/off, onde a liberação ocorreu com estímulo da luz.

Alguns pesquisadores têm sido atraídos pelos materiais responsivos a enzimas no campo de farmacológicos, devido a particularidade e seletividade na qual tem apresentado resultados aos estímulos biológicos internos (CAMARA et al., 2019), porém na área da agricultura estudos voltados a esse tipo de estímulo ainda são escassos. As enzimas atuam especificamente em todo processo biológico e metabólicos, com isso as investigações com enzimas têm sido apresentadas como sistemas de gatilhos biológicos promissores para o mecanismo de entrega de agroquímico, pois enzimas catalisam reações químicas em baixa temperatura, pH neutro e soluções aquosas tamponadas, além apresentar alguns benefícios como especificidade, precisão e eficiência (HU; KATTI; GU, 2014).

Kaziem et al. (2018) desenvolveram um sistema com nanopartículas de silício de ciclodextrina contendo avermectina, que teve liberação estimulada por enzima α -amilase,

além disso foi responsiva ao pH alcalino, apresentando cerca de 40% da liberação após 17 dias, em pH ácido e neutro a liberação é de apenas 6% para o mesmo tempo. E em pesquisas na literatura e em patentes não foram encontradas informações de produtos comerciais estímulos responsivos à enzima tripsina.

1.2.2.1 Tripsina

Serino proteases estão envolvidas em processos digestivos, destacando-se entre essas, a tripsina e a quimiotripsina, as quais possuem a função de digestão, podendo realizar a quebra de ligações peptídicas de proteínas grandes para gerar peptídeos menores (ZHAO et al., 2019). Desde que foi descrita pela primeira vez no final do século XIX, a tripsina tem sido identificada em todos os animais, englobando insetos, mamíferos e peixes, ela possui a atividade proteolítica presente nas secreções pancreáticas. Devido a sua especificidade, possibilita que atenda as funções digestivas e regulatórias, e assim como agente digestivo degrada polipeptídeos grandes em fragmentos menores (BAIRD, 2017).

A atividade ótima da tripsina encontra-se entre os pH 7,5 e 8,5 (KOUTSOPOULOS et al., 2007) e segundo o Enzyme Manual: Trypsin disponível no site WBC (2019) a temperatura para uma melhor atividade enzimática é 25°C. Analisando a atividade no sistema digestivo das lagartas *Helicoverpa armigera* Patankar et al. (2001) revelam que a existência de diversas especificidades de enzimas proteolíticas no intestino do inseto, e que a tripsina compõe o trato digestivo sendo responsável pela degradação de proteínas. Podendo assim, ser considerado uma vantagem a utilização da enzima tripsina por apresentar baixo custo a utilização da tripsina, já que a mesma compõe o trato digestivo do inseto. E a hipótese deste trabalho é saber se as nanopartículas carregadas com os ativos atendem ao sistema estímulo responsivo à enzima tripsina.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O presente trabalho tem como objetivo principal o preparo e a caracterização de nanopartículas de zeína carregadas com limoneno e carvacrol, como sistema responsivo à enzima tripsina a fim de desenvolver um sistema de liberação modulado por ação enzimática visando aplicações no controle de pragas agrícolas.

2.2 Objetivos específicos

- Preparar formulações de nanopartículas de zeína contendo inseticidas botânicos;
- Avaliar a estabilidade físico-química das formulações através de medidas de tamanho de partículas, potencial zeta e eficiência de encapsulação dos inseticidas nas nanopartículas;
- Avaliar a morfologia das nanopartículas através de microscopia de força atômica;
- Estudar a interação do sistema carreador com os inseticidas botânicos através de espectroscopia na região do infravermelho e medidas de ângulo de contato;
- Avaliar o perfil de liberação dos inseticidas botânicos carvacrol e limoneno nas nanopartículas;
- Avaliar a fitotoxicidade das formulações em sementes e plantas de feijão;
- Avaliar a degradação das nanopartículas na presença da enzima tripsina, através dos ensaios de eletroforese NTA e DLS.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais e equipamentos

- Acetonitrila (grau HPLC) – JT Baker®
- Ácido clorídrico – HCl - Anidrol

- Agitador magnético - Tecnal®
- Álcool etílico - Merck®.
- Analisador de partículas Zetasizer Nano ZS 90 - Malvern®
- Analisador de partículas NanoSight LM10 - Malvern®
- Azul de bromofenol - Merck®
- Na- Benzoyl-arginine 4-nitroanilide hydrochloride - BApNA
- Blueye protein ladder - Sigma ®
- β -mercaptoetanol - Sigma ®
- Bomba à vácuo A12 - Symbol®
- Carvacrol - Sigma ®
- Coomassie Blue - Sigma ®
- Dispositivos de ultrafiltração de celulose regenerada de 30 kDa-Milipore®
- DCS Q20 – TA Instruments®
- Filtros de 45 μ m - Millipore®
- Limoneno - Sigma ®
- Metanol (grau HPLC) – JT Baker®
- Microcentrífuga - MiniStar®
- pHmetro – MS Technopon®
- Tensoativo - Pluronic F-68 – Sigma®
- Ramé – Hart 100-00

- Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - UltiMate™ 3000 RSLC nano LC System - ThermoScience®
 - Coluna: Phenomenex® C18 fase reversa 216 m 110 A ,100 x 4,60 mm;
 - Coluna: Phenomenex® 5 m BDS C18 130 A 250 x 4,60 mm 5 micron;
 - Software Chromaleon
- Tampão glicina
- Termo bloco Al 1210
- Tripsina – Inlab (250 U/mL)
- Trizma base - Sigma ®
- Zeína - Sigma®

3.2 Métodos

3.2.1 Metodologia analítica para quantificação dos ativos

O R-limoneno e o carvacrol, foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para construção da curva analítica de cada ativo, foi necessário chegar às condições cromatográficas ideais para que as quantificações pudessem ser feitas com eficácia, e a eficiência de encapsulação das nanopartículas também fossem determinadas com segurança. As condições cromatográficas para os ativos estão descritas na Tabela 1.

TABELA 1: Condições cromatográficas dos compostos utilizados neste estudo.

R - LIMONENO	
Fase móvel	Metanol/Água (90:10) (v/v)
Volume de injeção	100 µL
Fluxo	1,0 mL/ min
Temperatura	Ambiente 25°C
Detector	Ultravioleta (uV) λ =198 nm
Coluna Cromatográfica	Phenomenex®5 m BDS - C18 - 130 A 250x 4,60 mm 5 micron
CARVACROL	
Fase móvel	Acetonitrila/Água (50:50) (v/v)
Volume de injeção	100 µL
Fluxo	1,0 mL/ min
Temperatura	Ambiente 25°C
Detector	Ultravioleta (uV) λ = 210 nm
Coluna Cromatográfica	Phenomenex® - C18 fase reversa - 216 m 110 A , 100 x 4,60 mm

Fonte: autoria própria

Com o propósito de que o método seja confiável e eficaz, foram determinados os parâmetros: limite de quantificação (LQ), limite de detecção (LD), linearidade, exatidão e precisão (ANVISA, 2017; INMETRO, 2016).

3.2.2 Curvas analíticas

As soluções com as concentrações na faixa de 2 a 12 µg/mL foram preparadas para ambos ativos (limoneno e carvacrol), a fim de elaborar a curva analítica. As amostras foram analisadas por CLAE e em triplicata, conforme condições analíticas apresentadas na Tabela 1. Foram analisadas três curvas em três dias consecutivos, e a curva final utilizada para as quantificações foi a média dessas três curvas (n=9).

3.2.3 Seletividade

O termo seletividade é a definido como a capacidade que o método analítico tem em detectar e quantificar o analito de interesse, na presença de outros componentes, dos componentes da matriz, ou mesmo as impurezas presentes e diluentes (HU; MCCLEMENTS, 2014).

3.2.4 Linearidade

A linearidade de um método é demonstrada através da capacidade de alcançar respostas analíticas, exatamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra. Para a determinação da linearidade, deve-se aplicar pelo menos 5 concentrações diferentes para a realização da curva e também para demonstração da linearidade, onde usa-se métodos estatísticos para determinação da associação linear entre as variáveis pelo método de coeficiente de correlação (r) e de determinação (r^2) que deve estar acima de 0,99, onde o coeficiente angular deve ser significativamente diferente de zero (ANVISA, 2017). Foram efetuadas 3 curvas analíticas em 3 dias consecutivos, cada uma com seis concentrações diferentes. Para o limoneno, foram utilizadas as concentrações 2,4,6,8,10 e 12 $\mu\text{g/mL}$, sendo a solução estoque preparada com metanol. Para o carvacrol as concentrações foram de 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 $\mu\text{g/mL}$, sendo que a solução estoque foi preparada com Acetonitrila.

3.2.5 Precisão

A precisão do método está associada a avaliação da proximidade entre os resultados das amostras, conforme o método analítico aplicado e apresentado, que será apresentar o quão próximo estão as medidas realizadas, devendo ser expressa em repetibilidade.

Contudo, a precisão deve ser apresentada pela dispersão dos resultados em cálculos de desvio padrão relativo (DPR), conforme a equação 1. Considerando assim que a determinação da repetição dos ensaios deve seguir os critérios das mesmas condições, sendo o analisador e o instrumento utilizado o mesmo, aplicando no mínimo 9 determinações, observando o intervalo linear do método (ANVISA, 2017; INMETRO, 2016).

A precisão deve ser demonstrada pela dispersão dos resultados, calculando-se o desvio padrão relativo (DPR) da série de medições conforme a fórmula "DPR= (DP/CMD) X100", em que DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada. A precisão encontra-se segundo a equação 1.

$$\mathbf{DPR} = \frac{\mathbf{DP}}{\mathbf{CMD}} \times 100 \quad (\text{equação 1}).$$

A precisão é a correlação inversamente proporcional entre o desvio padrão (DP) das leituras e a concentração média determinada (CMD) e tem seu resultado expresso em porcentagem, não podendo desta maneira, ultrapassar a margem de 5% (cinco por cento) para que então, o método possa ser estimado.

3.2.6 Limite de detecção

Limite de detecção (LD) deve ser demonstrado pela obtenção da menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado por um método, porém, não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser definida com precisão e exatidão aceitáveis perante as condições experimentais determinadas.

Ambos são calculados a partir de dados logrados da regressão linear da curva analítica e a lógica dos cálculos dos utilizados (LD e LQ) estão apresentados abaixo nas equações 2 e 3 (ANVISA, 2017).

$$LD = \frac{DP \times 3}{IC} \quad (\text{equação 2})$$

$$LQ = \frac{DP \times 10}{IC} \quad (\text{equação 3})$$

onde DP é o desvio padrão do coeficiente linear com o eixo y e IC é o coeficiente angular da curva analítica (ANVISA, 2017).

3.2.7 Exatidão

A exatidão de um método analítico deve ser adquirida pela resposta da análise, a qual deve estar entre os resultados individuais do método em estudo, e o valor aceito como verdadeiro. Assim para que seja considerado aceito, são necessárias 3 análises de concentrações diferentes entre os pontos da curva, feitas em réplicas, onde os pontos sejam: baixo, médio e alto.

A exatidão (%) pode ser calculada através da relação entre a concentração média

determinada (CMD) e a concentração teórica (CT), como representado pela equação 4. (ANVISA, 2017).

$$Exatidão = \frac{CMD}{CT} \times 100 \quad (\text{equação 4}).$$

3.2.8 Preparo das nanopartículas de zeína

As nanopartículas de zeína foram preparadas pelo método de precipitação por antissolvente descrito por Hu e Mc Clements (2014). A zeína (2% m/v) foi dissolvida overnight (durante o período de 24 horas) numa solução hidroetanólica (85:15, v/v). Na sequência essa solução, foi submetida a centrifugação à 4500 rpm por 30 minutos, seguido de tratamento térmico a 75°C por 15 minutos e filtração em filtros de seringa (0,45 µm - Millipore). Separadamente foi preparada uma solução aquosa de Pluronic F-68 (2% m/v) e o pH da solução ajustado para 8. Com a solução de zeína previamente tratada (10 mL) foram adicionados 150 mg dos ativos, limoneno e carvacrol até a dissolução dos óleos, posteriormente a solução foi injetada ao surfactante (30 mL) sob agitação magnética. A dispersão coloidal resultante foi rotaevaporada para evaporação do etanol. Quando o volume foi rotaevaporado em excesso, ele foi compensado com adição de água a pH 8. Uma partícula controle foi preparada sem a adição dos ativos. A solução final de cada formulação contém a concentração de 0,005 g/mL de ambos ativos.

3.2.9 Caracterização físico-química das nanopartículas

3.2.9.1 Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta

A técnica de espectroscopia de correlação de fótons (espalhamento de luz) foi empregada para a determinação do diâmetro hidrodinâmico e o índice de polidispersão (PDI). O PDI representa a variabilidade do tamanho das nanopartículas, com valores que vão de 0 a 1, de totalmente monodispersas a totalmente polidispersas. A técnica de microeletroforese foi realizada para as medidas de potencial zeta das nanopartículas. Para realização dessas medidas, as nanopartículas foram diluídas (1:200, v:v) com água

deionizada sem ajuste de pH e analisadas utilizando o ZetaSizer ZS 90 (Malvern®). Os resultados foram expressos como médias de três determinações.

3.2.9.2 Rastreamento de nanopartículas por NTA

O método de rastreamento de nanopartículas foi empregado para estabelecer a concentração e também o tamanho das nanopartículas. Para realização desta análise utilizou-se uma célula NanoSight LM 10 (laser verde, 532 nm), uma câmera sCMOS e software NanoSight (versão 3.2). A diluição das suspensões de nanopartículas foram realizadas em água deionizada (1:6000, v:v). Onde foram realizados 5 vídeos de 60 segundos em temperatura ambiente (25°C).

3.2.10 Análise da estabilidade química dos componentes

A estabilidade química das nanopartículas, presentes nas formulações pode ser realizada através do monitoramento do pH, em que tais alterações podem indicar um processo de degradação de componentes presentes nas formulações. O pH foi avaliado pelo período de 120 dias e foi utilizado um potenciômetro (OHAUS®), calibrado com soluções tampão em pH 4,0 e 7,0 e controle de temperatura. Para cada amostra foram realizadas 3 medidas e o resultado foi expresso como média dessas determinações.

3.2.11 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação do limoneno (LIM) e carvacrol (CVC) nas nanopartículas de zeína foi determinada pelo método de ultrafiltração/centrifugação, o qual foi submetida a suspensão de nanopartículas a centrifugação utilizando dispositivos de celulose regenerada com poro de exclusão 10 kDa (Microcon-Millipore®) em uma centrífuga (NT 805) por 15 minutos à 24.0000 g. Os componentes da nanopartícula como possuem massa maior que 10 kDa ficam retidas no filtro, sendo o filtrado composto por água e os ativos não encapsulados. Este filtrado foi então quantificado por CLAE (SCHAFFAZICK et al., 2003). Com isso é possível determinação da quantidade de ativo não encapsulado e por

meio da diferença da quantidade total adicionada ao sistema, determinou-se a quantidade de ativo encapsulado nas nanopartículas (PEREIRA et al., 2014).

3.2.12 Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier pode ser usada para caracterizar polímeros funcionalizados, por meio da detecção de bandas rotacionais e espectrais através da absorção de radiação específica pelas ligações químicas das substâncias. As frequências de vibrações podem ser observadas devido à geometria e o arranjo molecular, que absorvem a energia em um determinado comprimento de onda e assim, pela comparação dos valores de energia da radiação, é possível identificar a partir das ligações e grupos funcionais, as moléculas ou tipos de moléculas que estão presentes nas amostras (SOLOMONS et. al, 2001).

Para as análises foram utilizadas Nanopartículas sem os ativos (ZNP CTL), as nanopartículas carregadas com os ativos (ZNP LIM + CVC) e os ativos limoneno e carvacrol. As nanopartículas foram centrifugadas para formação de pellets e posteriormente secas em dessecador. A análise foi feita em pastilhas de KBr, produzidas pela prensagem do macerado de KBr contendo 1,5% de amostra. Para obtenção dos espectros foi utilizado um equipamento FTIR-410 equipado com acessórios para medidas de transmitância, onde foi utilizado o método de reflexão difusa por KBr, em faixa de 400 a 4000 cm^{-1} , empregando 64 varreduras por amostra com resolução de 8 cm^{-1} .

3.2.13 Ângulo de contato

A análise de ângulo de contato, foi realizada no Laboratório de Plasmas Tecnológicos (LaPTec), UNESP campus Sorocaba, foi utilizado o goniômetro (Ramé-Hart 100-00; Ramé-Hart Instrument Co., Succasunna, NJ, USA), equipado com uma micro ponteira para produzir gotas de 0,2 μL , as análises foram realizadas em superfície da folha de feijão, como controle foi utilizado água e com as ZNP LIM+CVC, através de uma câmera CCD conectada a um microcomputador a imagem da gota sobre a amostra é digitalizada. Esta imagem foi analisada por um programa de processamento de imagens RHI 2001, Imaging onde traça o perfil da gota e determina o ângulo.

3.2.14 Caracterização por calorimetria diferencial exploratória

A suspensão de nanopartícula foi centrifugada por 15 minutos à 24.000 g por 3 vezes, para a formação do pellet, e posteriormente foram colocadas para secagem em um

dessecador pelo período de 7 dias. Assim, as análises foram feitas utilizando um calorímetro TA Instruments DSC Q20 equipado com sistema de refrigeração. Além do pellet das nanopartículas, foram analisados os ativos em pó. As amostras foram inseridas em recipiente de alumínio apropriado. Para a análise foi utilizado o fluxo de nitrogênio de 50 mL/min, com variação de temperatura 0 °C com uma rampa de 10 °C à 300 °C/min. Os resultados foram expressos em forma de termogramas.

3.2.15 Cinética de liberação

Foram realizados os ensaios de liberação *in vitro* para avaliar os perfis de liberação das nanopartículas carregadas com os ativos CVC LIM na condição de diluição *sink*, por meio da técnica de diálise. O volume de 1 mL da suspensão de nanopartículas com concentração de 43,5 µg/mL foi adicionado ao saco de diálise (compartimento doador), acoplada a um béquer contendo 110 mL de água em pH 8 (compartimento receptor), e submetidos a agitação por meio de um agitador magnético, incubados a 25°C. Em tempos pré-determinados, alíquotas de 1 mL foram retiradas e o volume retirado foi repostado com água pH 8 (WANG et al., 2017).

3.2.16 Avaliação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi medida usando BApNA (Na-Benzoil-L-arginina-p-nitroanilida) como substrato específico para tripsina, de acordo com Patankar et al. (2001) com pequenas modificações. O ensaio foi realizado com a adição de 300 µL da solução de enzima, preparada em HCL 0,001 M, em 2 mL de BApNA e 700 µL de tampão Tris HCL pH 8 para solução final de 3 mL. A reação foi mantida em banho à 37°C por 20 minutos. A reação foi pausada com ácido acético à 30%, e a formação de p-nitroanilina, que é o produto da reação, foi quantificado por espectrofotômetro (Varian Cary 50) a 410 nm. Como controle foi preparada uma amostra substituindo a enzima por Tris HCl 0,001 M, pH 8,0. A análise os dados foi realizada utilizando metodologia descrita por Akbar et al. (2017b).

3.2.17 Análise morfológica das nanopartículas

Através da técnica de microscopia de força atômica (AFM), obtivemos uma imagem topográfica e assim pode-se analisar a morfologia dessas nanopartículas, além do tamanho. As análises morfológicas das ZNP LIM+CVC foram feitas por um microscópio de força atômica (MFA, Agilent 5500 AFM/SPM), onde as suspensões das nanopartículas foram diluídas e gotejadas em um GRID (placa de silício), no qual permaneceram por 2 semanas

em um dessecador para secagem das amostras. As análises foram realizadas operando-se em modo de não-contato, com cantilever TapAl-G (BudgetSensors®, Bulgária) com uma taxa de varredura de 90 Hz. As imagens foram tratadas pelo software Gwyddion e o ImageJ (NEČAS; KLAPETEK, 2011). Sendo realizado a contagem e medições de 150 nanopartículas para determinação da média apresentada no gráfico de distribuição.

3.2.18 Efeito da fitotoxicidade da formulação em germinação de sementes

Os efeitos da fitotoxicidade das nanopartículas foram realizados em sementes de feijão (*P. vulgaris*) e em plantas pós emergentes. As sementes foram previamente higienizadas, com etanol 70% por 1 minuto, seguida de uma lavagem com hipoclorito à 2,5% (comercial) por 20 minutos, e depois lavadas três vezes em água autoclavada durante 1 minuto cada. O ensaio com as sementes, foi utilizado um frasco erlenmeyer onde foram colocadas 10 sementes contendo 10 mL de solução nas concentrações de 0,250, 1,25, 2,5, 3,75 e 5 µL, para ambos tratamentos (ZNP CTL e ZNP LIM + CVC) e mantidas em agitação a 160 rpm por 1 h. Após esse período, as sementes foram transferidas para placas de Petri (100 mm x 15 mm), contendo uma camada de ágar (1,5%, m/v), posteriormente armazenada em um local escuro para germinação durante cinco dias (PEREIRA et al., 2017).

3.2.19 Ensaio de fitotoxicidade em plantas

Para o ensaio com plantas, sementes foram plantadas em vasos de 9,3 cm preenchidos com 600 g de substrato Carolina Soil (turfa sphagnum, vermiculita expandida, calcário dolomítico, giz agrícola e fertilizante NPK). Os tratamentos realizados foram: i) pluronic; ii) água; iii) zeína; iv) nanopartículas de zeína sem os compostos ativos (ZNP CTL) e com as ZNP LIM+CVC, ambos em diferentes concentrações (0,250, 1,25, 2,5, 3,75 e 5 µL).

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

Além disso, foi realizado a determinação das clorofilas A e B e carotenóides, para cada um dos tratamentos. Foram coletados dois discos de 5 mm das folhas das plantas e inseridas em ependorff contendo 1 mL de DMSO, os frascos foram envolvidos com papel alumínio para que desta forma estivessem protegidos da luz e foram então armazenados na geladeira pelo período de 24 horas. As medidas foram feitas em espectrofotômetro UV-Vis (Cary 50, Varian) nos comprimentos de onda de 665 (equação 5), 649 nm (equação 6) e 480 nm (equação 7) para determinar a clorofila A, clorofila B e carotenóides, respectivamente (WELLBURN, 1994). Onde Chl a é a “clorofila a”, Chl b é a “clorofila b” e Ax o valor de absorção obtido para os determinados comprimentos de onda (WELLBURN, 1994).

$$Chl\ a = 12,19 \times A_{665} - 3,45 \times A_{649} \quad (\text{equação 5})$$

$$Chl\ b = 21,99 \times A_{649} - 5,32 \times A_{665} \quad (\text{equação 6})$$

$$\text{Carotenóides} = \frac{100 \times A_{480} - 2,14 \times Chl\ a - 70,16 \times Chl\ b}{220} \quad (\text{equação 7})$$

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

Através da técnica de espectroscopia de correlação de fótons, foi realizado a determinação do diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta, em amostras de 950 µL de ZNP LIM + CVC (em concentração de 5 g/mL) em 50 µL de água, como controle sem a adição da enzima e amostra de 950 µL de ZNP LIM + CVC em 50 µL de enzima tripsina (com a concentração de 0,20 g/mL) em tempos de 0, 15, 30, 60, 120 minutos de contato com a enzima. Os resultados foram determinados a partir de uma média de três resultados obtidos na técnica. Com as mesmas amostras foi possível determinar a polidispersão e o potencial zeta das nanopartículas.

Também foi realizada análises de degradação das ZNP LIM + CVC em contato com a enzima pela técnica de NTA, onde as 1750 μL da amostra das nanopartículas foram previamente diluídas em 250 μL da enzima tripsina e posteriormente foram retiradas 10 μL dessa amostra e foi diluída em 20 mL de água. Para o controle foi utilizada a mesma proporção de nanopartícula em 250 μL de água e posteriormente diluídas em 20 mL de água. Foram realizados 5 vídeos de 60 segundos em temperatura ambiente (25°C).

Para realizar a comparação entre os resultados, também foi aplicada a técnica de SDS-PAGE, onde o ensaio foi realizado em unidade eletroforese vertical (Bio-Rad Mini-Protean® Tetra System), no laboratório de Biotecnologia e Bioprocessos da professora Dra Renata de Lima na Universidade de Sorocaba, onde primeiramente foram preparados os géis de concentração com: 6,06 g Trizma base em 100 mL H_2O ultrapura, preparado em pH 6,8 e 0,4 g de SDS em seguida os géis de separação: 18,17g de Trizma base em 100 mL H_2O ultrapura, em pH 8,8 adicionando 0,4 g SDS para ambos géis foi adicionado a solução de persulfato de amônio 0,500 μL e 0,05 g de PSA, também foi preparado o tampão de amostra (1,5 mL) 0,05M Tris-HCl pH 6,8 em 50% Glicerol, 1% de azul de Bromofenol, 10% SDS completando a solução com H_2O . Para amostras foram preparada, tripsina diluídas em tampão glicina HCl pH 8 0,2 M (1:2), zeína diluída em solução hidroetanólica (1:3 v:v) e formulação da ZNP LIM + CVC sem a enzima diluída também em tampão glicina HCl pH 8. Também foram preparadas amostras com a formulação sendo adicionada a enzima tripsina, essas amostras com a enzima foram preparadas em tempo decrescente 120, 60, 30, 15, 0 minutos, para que as nanopartículas pudessem interagir com a enzima, foi utilizado uma solução de 100 μL de cada amostra, sendo 50 μL da amostra (ZNP LIM + CVC) em 47,5 μL de tampão da amostra e 2,5 μL de β -mercaptoetanol, o qual foi inserido por último, para a paralização da reação. Posteriormente as amostras foram levados para aquecimento no aquecedor (Termo Bloco AL 1210) por 10 minutos em 95° C para realização da desnaturação, em seguida foi realizada a centrifugação das amostras em 14.000 rpm por 1 minuto.

Após a centrifugação, foram colocadas nos poços do gel 10 μL das amostras para a realização da corrida de eletroforese, durante o período de 2 horas em 40 mA/200 V, e foi utilizado o marcador de peso molecular: Blueye protein ladder SIGMA®, ao término da eletroforese, os géis foram lavados em água, em seguida colocados em uma solução fixadora 45 % metanol e 10% ácido acético em 35 mL de água, permanecendo por 15 minutos. Então foram colocados no corante coomassie blue, deixando o gel na solução overnight. A

revelação dos géis foi feita em uma solução descorante 5% ácido acético 10% de metanol, completando a solução com 85 mL de água.

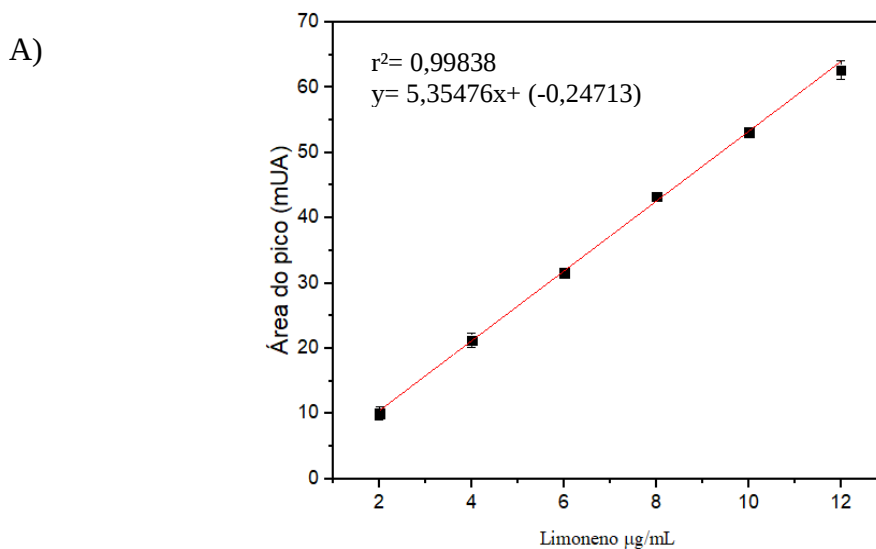
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Metodologia analítica para quantificação dos ativos.

5.1.1 Curvas analíticas

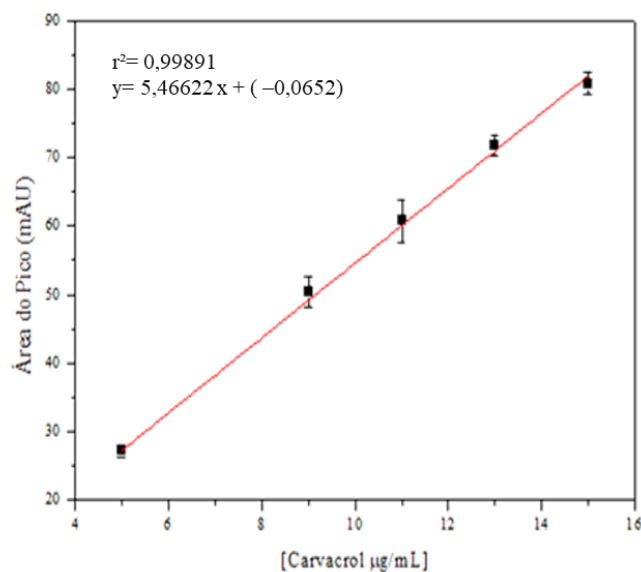
Os gráficos correspondentes as curvas analíticas seguem apresentados na Figura 3 A e B, sendo representado pela média de três curvas analíticas construídas em três dias consecutivos para cada composto.

FIGURA 3: Curva analítica obtida para A) LIM e B) CVC. Valores representam a média de três curvas realizadas.



Fontes: autoria própria

B)



Fonte: (CAMPOS et al., 2018a)

O coeficiente de correlação (r) demonstra a linearidade da curva de calibração. Segundo o INMETRO e ANVISA o r deve ser maior ou igual a 0,99. A tabela 2 apresenta os valores do coeficiente de correlação obtido para cada curva realizada e para a curva final.

TABELA 2: Coeficiente de correlação (r) das curvas de calibração dos compostos obtidos em três dias consecutivos e a média entre as curvas.

	r^2		
	Dia 1 (n=3)	Dia 2 (n=3)	Dia 3 (n=3)
LIM	0,99946	0,99535	0,99862
CVC	0,99658	0,99454	0,99881

Fonte: autoria própria

O cálculo do desvio padrão relativo (DPR) intra-dia permitiu estabelecer-se reprodutibilidade e a precisão intermediária foi calculada a partir do DPR inter-dias. Onde valores dos DPR encontram-se sumarizados na tabela 3. Os resultados estão dentro do que é preconizado para validação, segundo os órgãos regulatórios onde o DPR deve ser menor que 5%, desta forma considerou-se o método validado e preciso.

TABELA 3: Valores do desvio padrão relativo (DPR) das concentrações dos compostos LIM e CVC, determinados pela análise da precisão.

LIM			
Concentração			
mg/mL	DPR dia 1 (%)	DPR dia 2 (%)	DPR inter -dias (%)
3	2,45	1,25	1,91
5	1,2	2,218	1,91
7	0,34	2,25	1,99
		2,31	
CVC			
Concentração			
mg/mL	DPR dia 1 (%)	DPR dia 2 (%)	DPR inter -dias (%)
6	1,14	2,82	1,98
10	2,04	2,18	2,11
14	0,33	1,48	0,91

Fonte: autoria própria

Através da comparação dos valores da concentração determinada empiricamente e dos valores teóricos, também foi analisada a exatidão do método analítico. Onde os dados estão apresentados nas tabelas 4 e 5. Os resultados encontram-se dentro dos critérios de aceitação estabelecidos para as concentrações que foram analisadas (95 a 105%), o que também garante a exatidão dos métodos utilizados.

TABELA 4: Valores da concentração do LIM determinado por CLAE para análise da exatidão do método analítico.

[LIM] Téorica (mg/mL)	[LIM] Obtida (mg/mL)	% de Recuperação	[LIM] Obtida (mg/mL)	% de Recuperação
3	3,15	104,93	3,01	100,16
3	3,06	102,04	3,07	102,06
3	3,00	100,10	3,00	100,35
5	5,14	102,71	5,05	104,91
5	5,10	102,06	5,28	105,61
5	5,02	100,35	5,07	101,37
7	7,22	103,23	7,13	101,95
7	7,17	102,26	6,82	97,45
7	7,20	97,45	6,93	99,01
Média		101,71		101,43
DP		2,03		2,46

Fonte: autoria própria

TABELA 5: Valores da concentração do CVC determinado por CLAE para análise da exatidão do método analítico.

[CVC] Téorica (µg/mL)	[CVC] Obtida (µg/mL)	% de Recuperação	[CVC] Obtida (µg/mL)	% de Recuperação
6	5,83	97,26	6,21	103,51
6	5,81	96,80	6,03	100,57
6	5,93	98,99	5,86	98,73
10	10,3	103,38	9,98	99,83
10	9,98	99,89	10,36	103,65
10	10,3	103,38	9,98	99,83
12	14,21	101,50	14,10	100,73
12	14,24	101,74	13,74	98,16
12	14,14	101,07	14,10	100,73
Média		100,49		100,54
DP		2,43		2,01
Média (n=18)		100,73		
DPR (n= 18)		2,16		

Fonte: autoria própria

Os resultados obtidos para o limite de detecção e limite de quantificação são mostrados na tabela 6.

TABELA 6: Valores de limite de detecção e quantificação obtidos para os compostos através da regressão das curvas analíticas (n=9).

	Limite de Detecção (µg/mL)	Limite de Quantificação (µg/mL)
LIM	0,42	1,41
CVC	0,72	2,42

Fonte: autoria própria

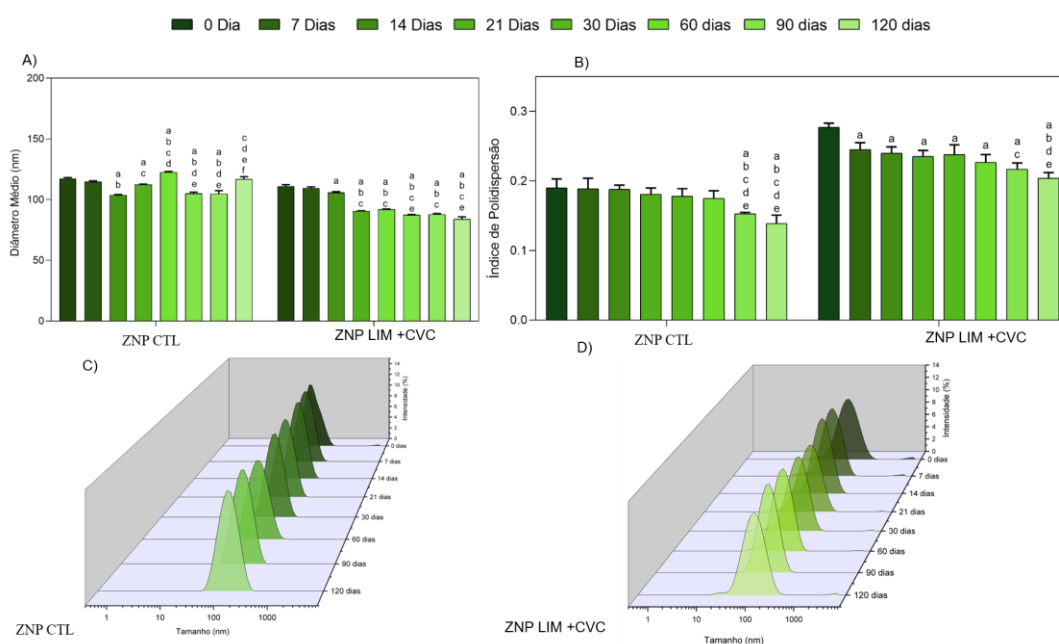
5.2 Caracterização e estudo da estabilidade físico-química das nanopartículas

5.2.1 Diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão

Para análise de caracterização das nanopartículas de zeína sem os ativos (ZNP CTL), que apresentaram diâmetro médio inicial de 117 ± 1 nm (Figura 4), após 7 dias de armazenamento observou-se que o diâmetro médio permaneceu estável durante todo o período de armazenamento até os 120 dias, em que foram analisadas, obtendo assim o diâmetro médio de 116 ± 2 nm, onde apresentou uma diminuição não significativa. Para as

nanopartículas contendo os ativos LIM + CVC inicialmente o diâmetro médio foi encontrado em 111 ± 1 nm e permanecendo estáveis também e em 120 dias apresentaram o tamanho médio de $87 \pm 0,4$ nm permanecendo estáveis durante todo o período de armazenamento apresentando diminuições significativas como observado na figura 4.

FIGURA 4: A) Caracterização do diâmetro médio das nanopartículas sem (ZNP CTL) e com os ativos (ZNP LIM + CVC), B) Índice de polidispersão das nanopartículas ZNP CTL E ZNP LIM + CVC ambos em função do tempo de armazenamento. Variações significativas entre os grupos são representados como: a – comparação com o tempo zero, b – comparação com 7 dias, c- comparação com 14 dias, d – comparação com 21 dias, e – comparação com 30 dias após esse período não houve variação significativa. Os valores representam média de três determinações. Para os gráficos C) e D) representam a intensidade do tamanho em relação ao tempo de armazenamento de 0 à 120 dias para ambas (NP CTL e NP LIM + CVC). Foi considerado significância de $p < 0,05$ (ANOVA).



Fonte: autoria própria

Para Davidov-Pardo et al., (2015), as nanopartículas de zeína possuem uma grande desvantagem, pois em soluções aquosa facilitam a formação de agregados devido à alta hidrofobicidade superficial. Uma possibilidade de diminuir a atração hidrofóbica seria através do recobrimento das partículas com materiais que aumentem a repulsão eletrostática ou estérica destas nanopartículas, como por exemplo com o tensoativo Pluronic F68. Este surfactante já é utilizado no recobrimento dessas partículas e pode-se

observar seu efeito positivo pois as nanopartículas carregadas não precipitaram ao longo do tempo de estudo, o que se pode inferir é que provavelmente a presença dos ativos promovam interações mais fortes e estáveis entre os aminoácidos presentes na proteína zeína, fato este que fez com que grupamentos hidrofílicos permanecessem expostos na superfície melhorando a estabilidade do sistema em solução.

A Figura 4 B) apresenta o índice de polidispersão, para ambas formulações com e sem ativos. As ZNP CTL mostraram um índice de polidispersão inicial de $0,180 \pm 0,013$, após 120 dias foi observado uma diminuição no índice de polidispersão $0,139 \pm 0,012$. Para a formulação de ZNP LIM + CVC foi observado um valor inicial de índice de polidispersão de $0,277 \pm 0,006$, após os 120 dias de armazenamento houve uma diminuição no índice, mas sem alterações significativas, o valor encontrado foi de $0,234 \pm 0,008$. A estabilidade das nanopartículas pode ter ocorrido pela presença de aminoácidos presente na zeína, permitindo que os grupamentos hidrofílicos ficassem expostos na superfície aumentando a estabilidade do sistema em solução. Ainda na figura 4 C) apresenta-se a intensidade das nanopartículas sem adição dos ativos, e na figura 4 D) as nanopartículas com os ativos LIM + CVC, onde os resultados corroboram com os demais gráficos apresentados na figura 4.

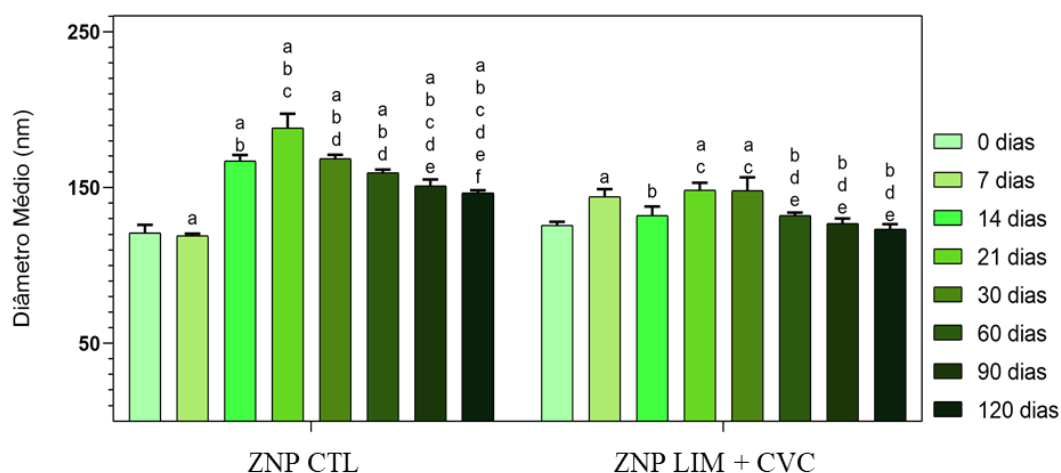
5.2.2 Concentração e tamanho das nanopartículas

Outra técnica utilizada para avaliar o diâmetro médio e a concentração das nanopartículas, foi a Nanoparticles Tracking Analysis (NTA). As nanopartículas sem ativos (ZNP CTL) apresentaram um diâmetro inicial de 120 ± 5 nm, após 120 dias apresentaram um aumento não significativo de 146 ± 1 nm. Já para a formulação com os ativos (ZNP LIM + CVC) apresentaram um diâmetro inicial de 125 ± 2 nm, após 120 dias de armazenamento não houve diferença estatística no diâmetro apresentando 123 ± 3 nm (Figura 5).

Pode-se observar ainda na figura 5, que através dessa técnica obtivemos um aumento no diâmetro médio para as nanopartículas sem os ativos. Já para as nanopartículas com ativo não foram observadas diferenças estatísticas em função do tempo de armazenamento, corroborando assim os dados obtidos por DLS.

FIGURA 5: Avaliação do diâmetro médio pela técnica de NTA em função do tempo de armazenamento para ambas nanopartículas sem o ativos (ZNP CTL) e com os ativos (ZNP LIM + CVC). A variação significativa entre os grupos em função do tempo está representada pela letras: a - comparação com o tempo zero, b - comparação com 7 dias, c - comparação com 14 dias, d - comparação com 21 dias, e -

comparação com 30 dias, f- comparação com 60 dias para 90 e 120 não houve variação significativa. Os valores representam média de três determinações. Foi considerado significância de $p < 0,05$ (ANOVA).

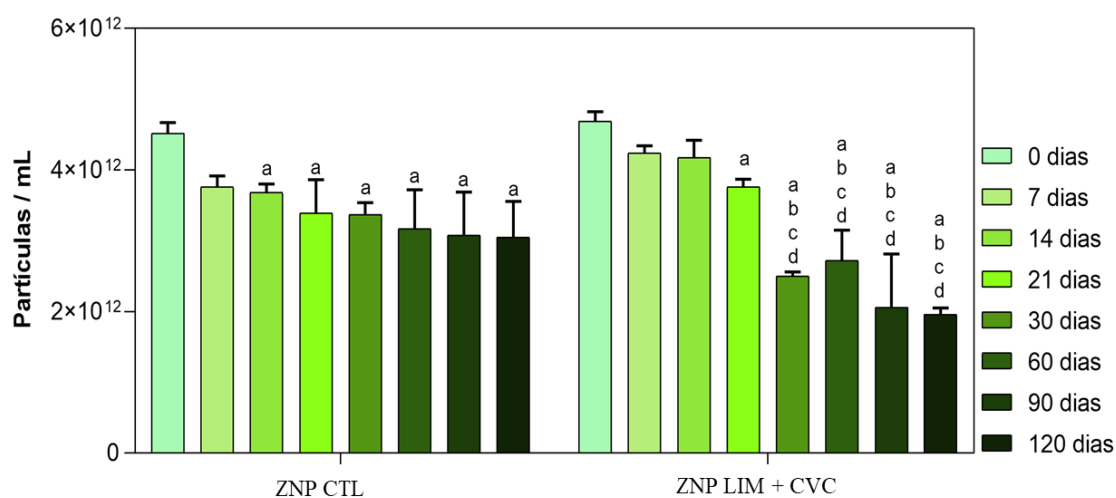


Fonte: autoria própria

As diferenças entre as análises de DLS e NTA em relação ao diâmetro médio das nanopartículas são previstas, devido a especificidade de cada técnica. Pelo DLS a análise das nanopartículas ocorrem pela dispersão de luz, assim quando essas passam pelo feixe de luz, os tamanhos individuais de cada nanopartícula pode influenciar na dispersão de luz ocultando desta forma as contribuições das nanopartículas menores na distribuição de tamanho. Com a técnica de NTA o rastreamento ocorre separadamente, cada partícula é rastreada e assim avalia-se o coeficiente de difusão no meio e na sequência, então calcula-se a distribuição de tamanho de cada partícula. Mas para a técnica do NTA é necessário que as amostras estejam mais diluídas do que as amostras das análises do DLS, o que permite fragmentar possíveis agregados devido a diluição. A diminuição da concentração de nanopartículas e o aumento no tamanho médio das partículas visto pela técnica de DLS podem ser considerados indicativos do processo de formação de agregados, visto que quando as nanopartículas se juntam, formam aglomerados, diminuindo assim a concentração.

A técnica de NTA, além da análise de diâmetro médio, pode-se ainda estimar a concentração das nanopartículas na solução. A figura 6 mostra a concentração de partículas encontradas nas formulações. As ZNP CTL apresentaram concentração inicial de $3,52 \times 10^{12} \pm 1,51 \times 10^{11}$ partículas/mL, após 120 dias $5,05 \times 10^{12} \pm 1,07 \times 10^{11}$ e para ZNP LIM+CVC apresentaram concentração inicial de $4,69 \times 10^{12} \pm 1,32 \times 10^{11}$ partículas/mL, em 120 as ZNP LIM+CVC, apresentou a concentração de $4,73 \times 10^{12} \pm 9,08 \times 10^{11}$ partículas/mL.

FIGURA 6: Análise da concentração de nanopartículas, em NTA em função do tempo de armazenamento para ambas nanopartículas (ZNP CTL e ZNP LIM+CVC). A variação significativa em função do tempo está representada pela letras: a- comparação com o tempo zero, b -comparação com 7 dias, c- comparação com 14 dias, d- comparação com 30 dias, para 60 dias , 90 e 120 dias não houve diferença significativa entre as formulações. Os valores representam média de três determinações. Foi considerado significância de $p < 0,05$ (ANOVA).



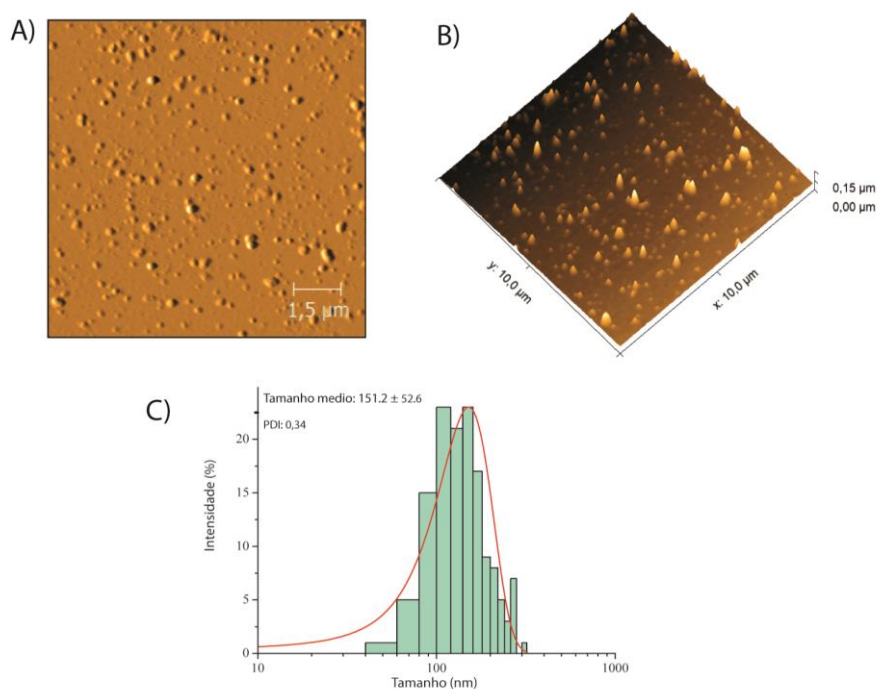
Fonte: própria autoria

5.2.3 Análise por microscopia de força atômica

Foram analisadas através da técnica de microscopia de força atômica a morfologia e o tamanho das nanopartículas. Através da análise de imagem topográfica das nanopartículas, analisamos morfologicamente as nanopartículas de zeína carregadas com os ativos LIM + CVC, pode-se verificar que todas as nanopartículas se apresentam esféricas. O gráfico de tamanho médio das nanopartículas foi obtido pelo tratamento da imagem topográfica pelo software Gwyddion no qual apresenta um tamanho médio em torno de 151 ± 52 nm corroborando com outras técnicas.

A figura 7 A) apresenta a topografia para análise da morfologia, B) imagem em 3D das nanopartículas com os ativos, C) gráfico de tamanho médio das nanopartículas.

FIGURA 7: Micrografia das nanopartículas de zeína com LIM + CVC, realizadas pelo AFM. A) imagem topográfica e a imagem B) imagem em 3D das nanopartículas C) gráfico de tamanho médio das nanopartículas, tratado pelo software Gwyddion.



Fonte: autoria própria

Indicativos de precipitação, como o aumento do tamanho médio e a diminuição na concentração também foram verificados por Proença (2018) no estudo de nanopartículas de zeína carregadas com óleo de menta e uma combinação de ativos com efeito carrapaticida.

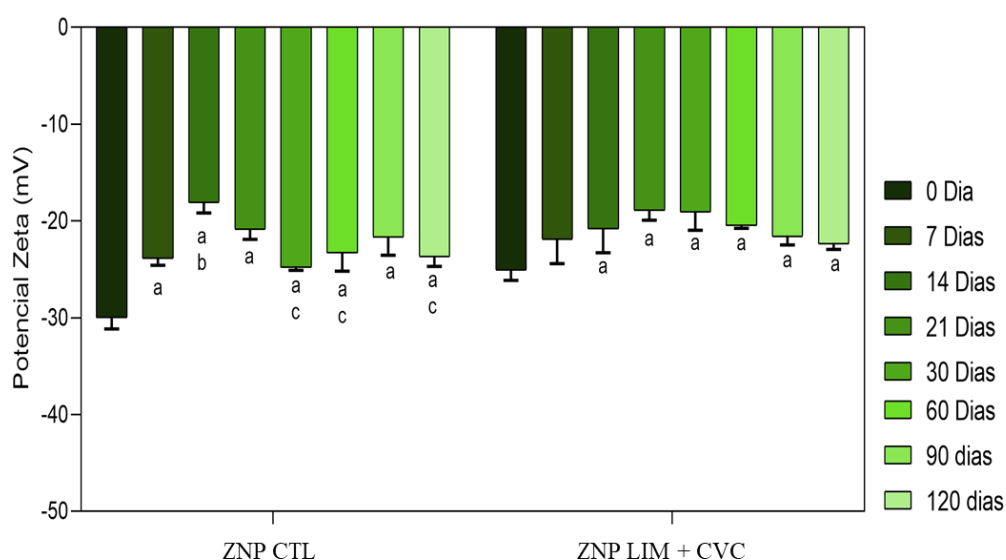
Nanopartículas de zeína contendo 6,7-di-hidroxicumarina apresentaram tamanho médio em torno de 120 nm, resultado muito semelhante ao mostrado neste estudo (PODARALLA; PERUMAL, 2012).

5.2.4 Potencial zeta

O potencial zeta das nanopartículas em função do tempo carregadas ou não com ativos está representado na figura 8. As ZNP CTL apresentaram um potencial zeta inicial de -30 ± 1 mV e até a leitura de 120 dias onde apresentou o potencial zeta de -24 ± 1 mV não houve alterações significativas em seu valor. Para a ZNP LIM+CVC, apresentaram o potencial zeta inicial de -25 ± 2 mV, que permaneceu relativamente estável, sem grandes

alterações significativas pelo período de tempo acompanhado, apresentando o valor de -22 ± 1 mV em 120 dias de armazenamento.

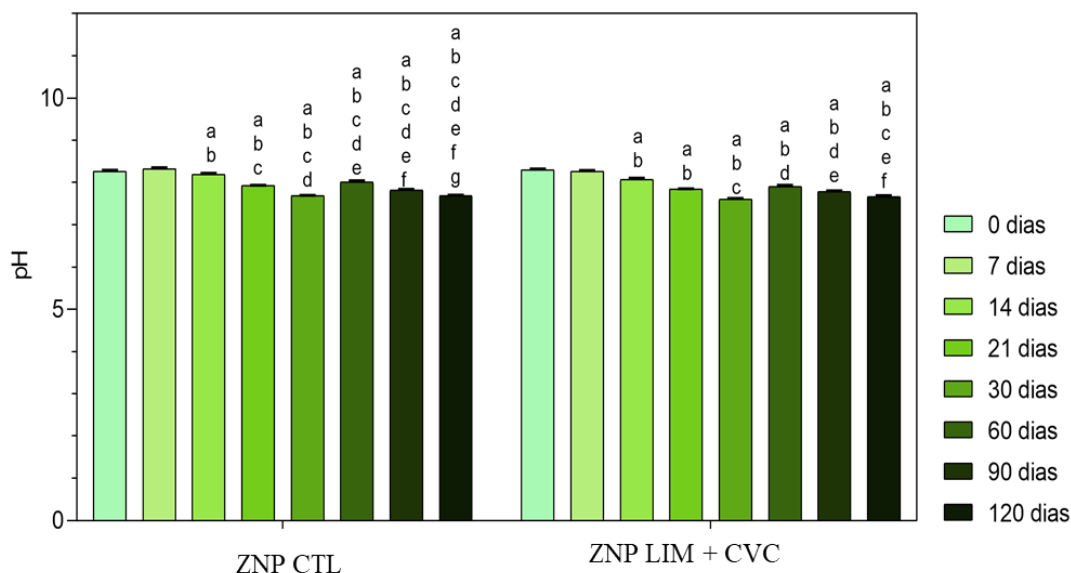
FIGURA 8: Potencial zeta de ZNP CTL e ZNP LIM + CVC em relação ao tempo de armazenamento. A variação significativa entre os grupos em função do tempo são representados pelas letras: a-comparação com o tempo zero, para os demais dias e ambas formulações não houve uma variação significativa. Os valores representam média de três determinações. Foi considerado significância de $p < 0,05$ (ANOVA).



Fonte: autoria própria

O pH das nanopartículas foi monitorado durante 120 dias (Figura 9). O processo de degradação na nanopartícula também pode ser indicado pelas alterações nos valores de pH. A formulação de nanopartículas sem ativos apresentaram pH inicial de $8,27 \pm 0,02$, e com 120 dias de armazenamento o pH reduziu para $7,69 \pm 0,01$. As nanopartículas com os ativos apresentou pH inicial de $8,30 \pm 0,02$, sem alterações significativas até os 120 dias, entre os valores iniciais e finais, mantendo o pH em torno de $7,66 \pm 0,02$. Para Tao et al. (2019) as alterações de pH em sistemas de liberação de nanocarreadores podem ser estar relacionadas à presença de grupos funcionais ionizáveis, presentes na estrutura carreadora como pirimidinas, carboxilatos, aminas, fosfatos. Já, Camara et al., (2019) relatam que alguns nanocarreadores são sensíveis ao pH, que esse tipo de sistema, um pesticida pode ser encapsulado possivelmente pelas interações químicas, que uma molécula específica tem.

FIGURA 9: Avaliação do pH das nanopartículas de zeína sem ativos ZNP CTL e com ativos ZNP LIM + CVC em função do tempo de armazenamento. A variação entre os grupos são representados pelas letras: a - comparação com o tempo zero, b – comparação com 7 dias, c – comparação com 14 dias, d – comparação com 21 dias, e - comparação 30 dias, f-comparação 60 dias, g- comparação 90 dias, análises realizadas até o período de 120 dias de armazenamento. Os valores representam média de três determinações. Foi considerado significância de $p < 0,05$ (ANOVA).



Fonte: autoria própria.

As nanopartículas deste estudo foram produzidas com todos os produtos envolvidos em pH 8, para que resultasse em uma formulação já no pH estipulado para o trabalho e não fosse necessário fazer ajustes de pH na suspensão pronta. Com a realização deste ensaio mostrou-se que os resultados se assemelham aos obtidos por outros autores quando se trata do pH e temperatura para atividade ótima da enzima. Também foram testadas outras temperaturas (25, 30, 35 - 37 e 40°C) onde foi observada atividade máxima em temperatura de 37°C.

Alterações de pH em partículas de zeína podem resultar em diferentes tamanhos de partículas e também interfere no potencial zeta. Partículas de zeína com pH acima de 10 podem se tornar instáveis pois a zeína é solúvel em soluções alcalinas (pH acima de 11) (SPASOJEVIĆ et al., 2019)

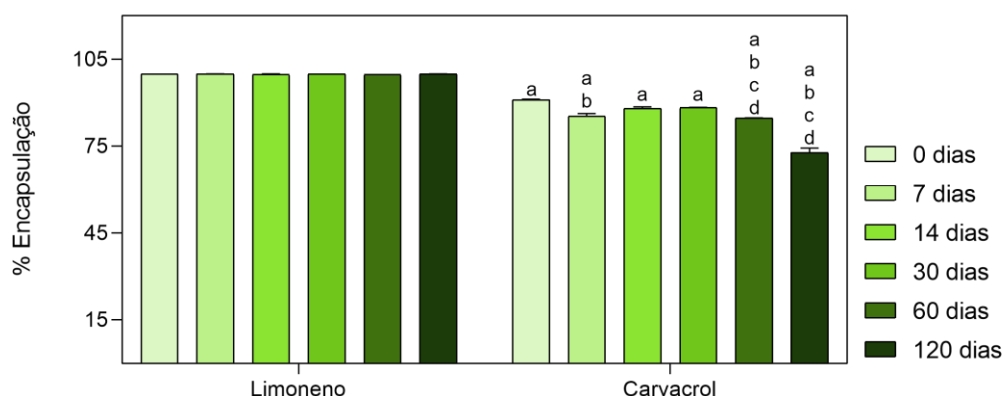
5.2.5 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação dos ativos e LIM e CVC foi analisada e está representada na figura 10. O limoneno apresentou eficiência de encapsulação de $99,9 \pm 0,004$ %, sendo que após 120 dias de armazenamento a eficiência foi de 99,8 % aproximadamente 0,9 % de redução para o limoneno. O carvacrol no tempo inicial teve eficiência de $91,0 \pm 0,14$ %, e após 120 dias de armazenamento a eficiência foi de 72,8%, redução de 20,0 %.

O aumento da temperatura pode interferir na liberação dos ativos e nas características físico-química como por exemplo a volatilidade e a solubilidade do ativo. Com isso a predisposição na evaporação do ativo encapsulado, está relacionada com o vapor de pressão, onde o indicativo é a volatilidade, ou seja quanto maior a pressão de vapor maior será a volatilidade do composto, neste trabalho apresentamos o composto limoneno a pressão de valor de 1,98 mm Hg a 25°C, e o carvacrol 0,029 mm Hg a 25°C (PUBCHEM, 2019).

De Oliveira et al. (2019) também observou diferenças na eficiência de encapsulação dos ativos geraniol e cinamaldeído, onde as nanopartículas encapsuladas com cinamaldeído apresentaram 80% de liberação nas primeiras 5 horas e o eugenol apresentou 45%. Para esse trabalho, podemos dizer que ambos os ativos apresentaram alta eficiência de encapsulação inicialmente, sendo 99% para o limoneno e 90% para o carvacrol, devido à baixa hidrofilicidade das moléculas presentes na formulação.

FIGURA 10: Avaliação da eficiência de encapsulação das nanopartículas contendo os ativos limoneno (LIM) e carvacrol (CVC) durante 120 dias. Considerando a significância de $p < 0,05$ (ANOVA).



Fonte: autoria própria

A zeína é um polímero que tem sido muito utilizado por ser capaz de possibilitar liberação controlada dos compostos encapsulados (LUO; WANG, 2014). Campos et al. (2018) funcionalizaram nanopartículas de quitosana com β ciclodextrina contendo carvacrol e linalol, e realizaram a caracterização, toxicidade, atividades repelentes, estabilidade das nanopartículas e verificaram também a eficiência de encapsulação dos ativos, onde obteve $90\% \pm 0,6\%$ de eficiência de encapsulação para o carvacrol e boas características coloidais e para o linalol $86,9 \pm 0,9\%$ de eficiência de encapsulação.

Já, Luo e colaboradores (2014) relataram que as propriedades de suspensões coloidais formadas pela zeína podem ser melhoradas com a utilização de um polímero associado, porém o encapsulante pode afetar diretamente a eficiência de encapsulação, por essa razão deve ser escolhido cautelosamente (SILVA-BUZANELLO et al., 2015).

Nos trabalhos de Zhang et al. (2014) e (Chen & Zhong (2015), mostraram que estudos com nanopartículas de zeína com tamanho e eficiência de encapsulação próximo aos determinados neste estudo, alcançando eficiência de encapsulação de 83% e 89%, para timol e óleo de menta, respectivamente.

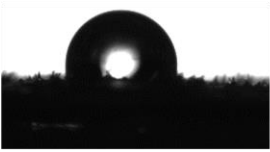
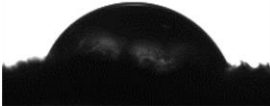
5.3 Análise de ângulo de contato

Segundo Noronha et al. (2014) o ângulo de contato pode ser definido como ângulo da superfície e a linha tangente no ponto de contato da gota com a superfície. O ângulo de contato menor que 90° indica que o material possui característica hidrofílica, e quando o θ for maior a superfície é considerada hidrofóbica (RANGEL; RANGEL; CRUZ, 2004). O método mais comum é o método de gota séssil, onde a medição é realizada por um goniometro de ângulo de contato usando um subsistema óptico para capturar o perfil de um líquido puro em um substrato sólido, atualmente é utilizado sistemas qual tem cameras e softwares que são empregados para assim realizar a captura e então a partir da amostra são utilizadas gotículas no tamanho de 0,2 à 15 μL para assim analisar o ângulo de contato (WANG; SHI; WANG, 2015). A molhabilidade e o acumulo dos pesticidas na superfície da folha de culturas são consideradas importantes, para auxiliar na absorção e adesão dos ativos presentes nas formulações (YU et al., 2019). Para o ensaio de molhabilidade na planta de feijão, foi realizado com base no ângulo de contato obtido.

A composição química e a estrutura da superfície das folhas podem influenciar na molhabilidade, onde a microestrutura, os tricomas, densidade dos estômatos e células

epidérmicas podem apresentar caracter hidrofóbico ou hidrofílico (IOST; RAETANO, 2010). Para a análise realizada, podemos observar que a superfície do feijão uma superfície ondulada sem cera, se mostrou hidrofílica como apresentado na figura 11.

FIGURA 11: Análise de ângulo de contato, realizada em superfície de feijão (*P. vulgaris*) com amostra de controle de gota d'água deionizada e gota de NP LIM + CVC .

	Ângulo de Contato Desvio Padrão (°)	Imagem
Água	$90 \pm 0,05$	
NP LIM + CVC	$64 \pm 0,05$	

Fonte: autoria própria.

Análise foi realizada em duplicata, e como parâmetro de controle foi utilizado uma gota de d'água deionizada para a comparação com a amostra de nanopartícula com os ativos LIM+CVC, nota-se que a gota da suspensão de nanopartículas teve uma molhabilidade maior apresentando o ângulo de contato de 64° , o que pode indicar que quando depositada a formulação dos ativos na superfície, a amostra com os ativos torna-se hidrofílica comparada a amostra d' água. As superfícies foliares representam as conexões das plantas e do meio ambiente, a molhabilidade indica a compatibilidade da superfície com a água ou com a formulação, além do efeito de controle do pesticida está à disposição de pragas e doenças e o período e a capacidade em que o pesticida está acumulado nas folhas está relacionado ao ângulo de contato e é considerado relevante para expandir a eficiência do uso (WANG; SHI; WANG, 2015; SHEN et al., 2018).

Pesquisas realizadas por Yu et al. (2019) onde aplicaram ácido tânico em uma molécula natural bioadesiva, para criar um nanopesticidas de abamectina, e azoxistrobina, com alto potencial de adesão em folhagem de pepino encontraram ângulo de contato em $93,3$; 91 ;

94 e 91,5° respectivamente, sugerindo que a presença de ácido tânico na superfície da folhagem poderia melhorar a molhabilidade na área foliar das culturas.

5.3.1 Análise de calorimetria diferencial exploratória

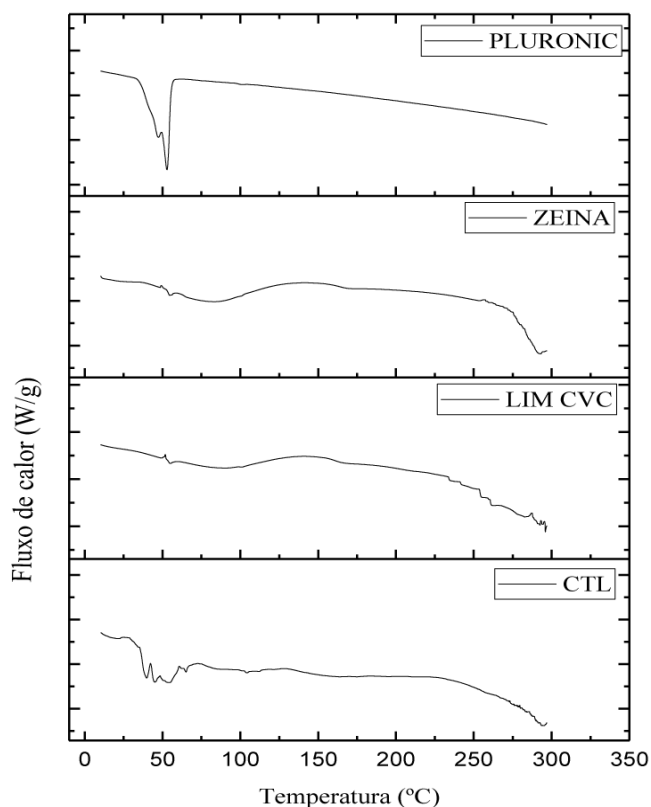
A análise de calorimetria exploratória diferencial, pode também ser aplicada para comprovar a encapsulação de um composto, pelas modificações em picos de fusão, cristalização, deslocamento entre outras transições térmicas, podendo mostrar interações que ocorreram entre os diferentes compostos. A análise também teve a finalidade de observar a interação dos ativos e da zeína do tensoativo Pluronic.

Para a apresentação dos termogramas utilizou-se o fluxo de calor (W/g) em função da temperatura (°C). O surfactante Pluronic, por ser composto de estruturas cristalinas, apresentou um pico endotérmico em 52 °C correspondente ao ponto de fusão. Karolewicz et al. (2017) em suas pesquisas com imatinib e pluronic determinou o ponto de fusão da amostra em 52,5 °C, indicando assim a formação de mistura eutética entre os componentes.

As proteínas apresentam características relacionadas às suas diferentes estruturas tridimensionais, como o processo de desnaturação, sendo avaliada sua temperatura através de análises térmicas como apresenta a literatura (MOTHÉ; et. al., 2005). O pico endotérmico da zeína foi apresentado em 83 °C podendo estar relacionada a evaporação da água presente no polímero, assim como relatado na literatura descrita por Luo et al. (2011b) onde o termograma apresentou o pico endotérmico de 73,2 °C.

Para as ZNP LIM+CVC o apresentaram o mesmo perfil do termograma obtido para as nanopartículas de zeína. Tal fato demonstra uma provável interação entre os ativos e a proteína, que por serem interações hidrofóbicas reduz o teor da água (PROENÇA, 2018). As nanopartículas sem ativo (ZNP CTL), um pico endotérmico em torno de 40 °C a 70 °C, provavelmente devido a interação com o pluronic e suas propriedades cristalinas, demonstrando que a mesma não possui uma boa composição o que faz com que esta seja menos estável que as contendo os ativos (PROENÇA, 2018).

FIGURA 12: Termogramas de Calorimetria Diferencial Exploratória para o surfactante Pluronic, Zeína pura, ZNP CTL e ZNP LIM + CVC .



Fonte: autoria própria

5.4 Espectroscopia de Infravermelho

Com o intuito de verificar as interações entre as nanopartículas e os ativos LIM + CVC, espectros na região do infravermelho foram obtidos e analisados, e as principais bandas de absorção estão indicadas pelas setas na figura 13 .

A figura 13 apresenta os espectros de absorção da ZNP LIM + CVC, além disso foram comparadas com as bandas características de zeína e o surfactante pluronic, encontrados na literatura (SEEMA, DATTA, 2014; TORKAMANI et al., 2018).

Para o espectro de zeína destaca-se cinco bandas de proteínas características, a primeira banda é correspondente ao alongamento de ligações O-H e N-H que aparecem em 3324 cm^{-1} chamada de amida I. A banda em 2961 cm^{-1} é característica de C-H pertencente aos carbonos primários e secundários, e em 1653 cm^{-1} referente ao estiramento do grupamento carbonil (C = O) da amida I. A banda em 1529 cm^{-1} , conhecida como amida II, corresponde às vibrações de deformação angular da ligação N-H e a banda em 1248 cm^{-1} corresponde às deformações axiais das vibrações C-N alifáticos.

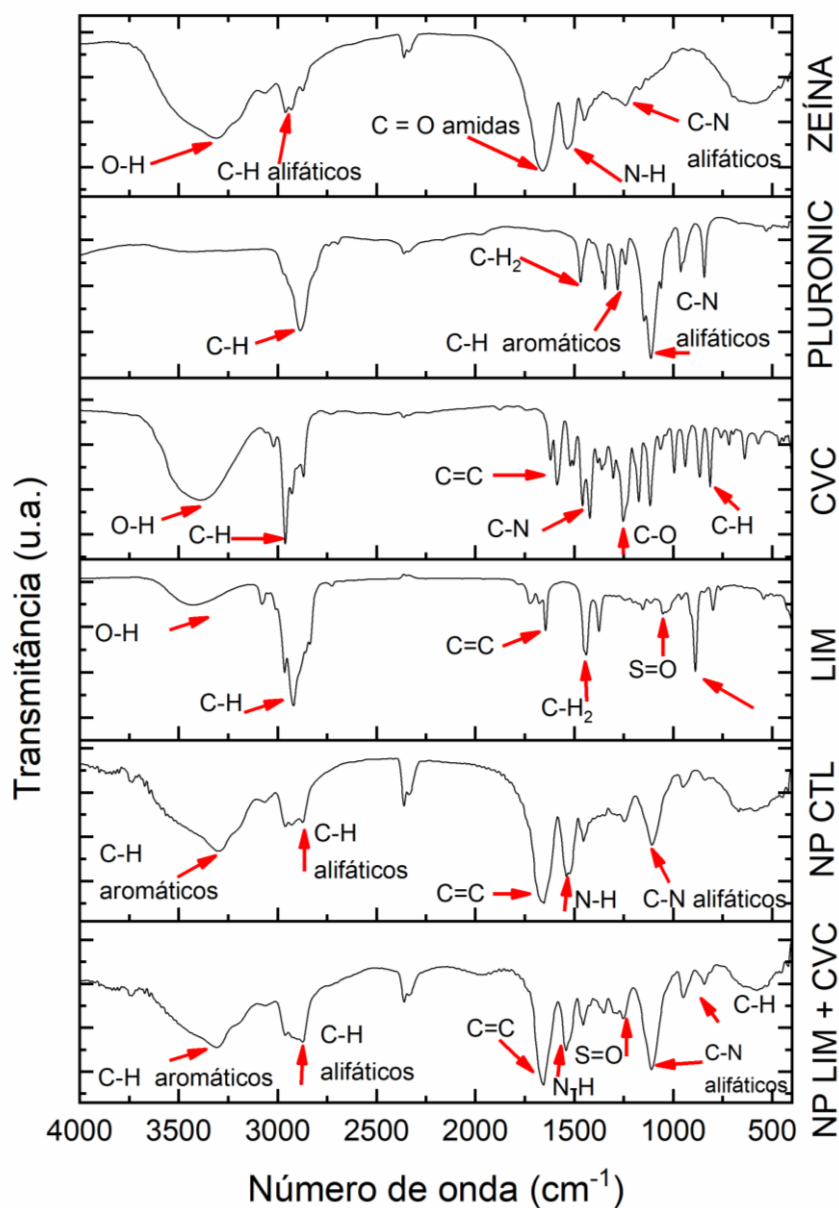
Para o espectro do pluronic as principais bandas características foram em 2881 cm^{-1} , correspondente às vibrações das ligações C-H de aldeídos, a banda em 1470 cm^{-1} que correspondente a deformação angular de CH_2 , e a banda em $1348\text{-}1107\text{ cm}^{-1}$ atribuída às ligações C-N de aromáticos e alifáticos.

No carvacrol encontramos cinco bandas, iniciando em 3387 cm^{-1} formadas por ligação poliméricas, em banda 2956 cm^{-1} há alongamento de ligações simétricas e assimétricas das ligações de C-H alifáticos, em bandas de 1580 cm^{-1} ocorre deformação angular do C=C aromáticos, para a banda 1249 cm^{-1} apresenta alongamento para o grupo C-N aromáticos, em bandas de 988 cm^{-1} com alongamentos fora do plano devido a ligações C-H aromáticas e anéis aromáticos.

Para o limoneno foram encontradas seis bandas características. A banda em 3443 cm^{-1} apresenta é correspondente ao estiramento O-H livre em aminas, enquanto que a banda presente 2937 cm^{-1} é atribuída a C-H de carbonos alifáticos primários e secundários. A banda em 1637 cm^{-1} refere-se à deformação C=C de aromáticos, em 1436 cm^{-1} corresponde à deformação angular de CH_2 e a banda em 1043 cm^{-1} correspondente a C-H que está fora do plano, e a última banda encontra-se em 884 cm^{-1} é característico da presença de anéis aromáticos na amostra.

Observa-se que para ambas nanopartículas se verifica que os espectros apresentaram bandas características da zeína estão também presentes nas ZNP CTL e ZNP LIM+CVC sendo: bandas de C-H pertencentes aos carbonos primários e secundários, N-H da região amida II, e o C-N alifáticos, assim como para o Pluronic o C-H de aldeídos e C-N alifáticos, além disso podemos observar bandas que são características do limoneno S=O presentes no espectro porém com um deslocamento para frequências mais baixas por efeito de conjugação. Foram também observadas as bandas C-H fora do plano presentes no carvacrol.

FIGURA 13: Espectros de infravermelho para as amostras de zeína, pluronic F-68, óleo essencial de carvacrol (CVC), óleo essencial de limoneno (LIM), nanopartículas controle (ZNP CTL) e nanopartículas carregadas com limoneno e carvacrol (ZNP LIM+ CVC).



Fonte: autoria própria

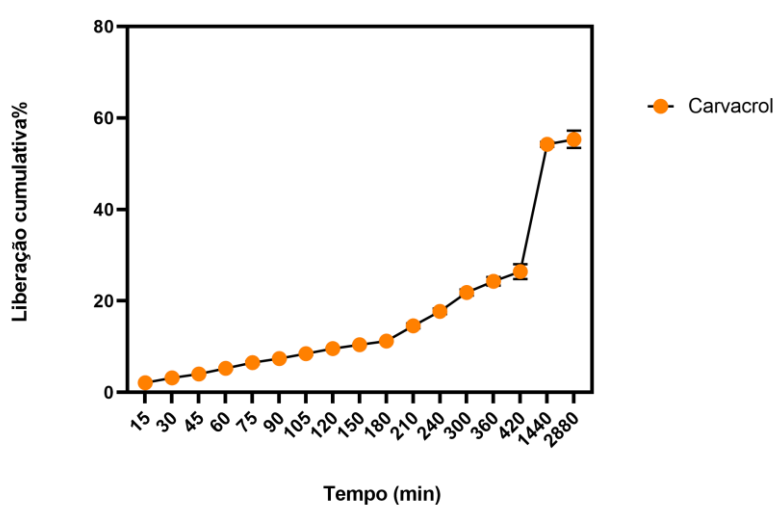
Autores apresentaram em seus trabalhos, espectros de infravermelho de zeína e de nanopartículas de zeína contendo curcumina, esses picos porém não são evidenciados, pois os deslocamentos mínimos ocorrem devido apenas à sobreposição das bandas dos espectros individuais dos compostos, indicando assim a não interação dessa molécula (DAI et al., 2017).

Aqui, observou-se que as ZNP LIM + CVC tem características semelhantes as que estão presentes nos compostos não encapsulados evidenciando as interações entre os componentes e a matriz, que corroboram aos resultados encontrados na literatura por outros autores (BOUGHENDJIOUA et al., 2017; ELZEY, et. al., 2016) .

5.5 Cinética de liberação

A cinética de liberação das ZNP LIM + CVC foram analisadas por CLAE, realizadas a fim de compreender o perfil de liberação de ambos os ativos, em função do tempo (minutos), acompanhadas por um total de 2880 minutos (48 horas). O perfil de liberação está apresentado na Figura 14. Neste período de tempo, foi observado que o carvacrol liberou nos primeiros 15 minutos um total de $2,1 \pm 0,04$ %, equivalente a $0,9 \pm 0,02$ µg/mL, e ao final de 48 horas um total de $55,3 \pm 1,8$ %, o que representa $24,1 \pm 0,8$ µg/mL. Já o LIM apresentou concentrações extremamente baixas durante o tempo de ensaio, por essa razão não foi possível quantificar a liberação do ativo nas análises realizadas por CLAE. Tais aspectos são interessantes do ponto de vista do uso destes sistemas como sistema baseado na liberação por degradação enzimática, uma vez que os ativos não são liberados de forma rápida em condições de diluição sink.

FIGURA 14 : Perfil de liberação do CVC em nanopartículas de zeína, em temperatura de 25°C, onde foram realizadas as médias das triplicatas do ensaio realizado (n=3).



Fonte: autoria própria

Campos et al. (2018) prepararam nanopartículas de quitosana funcionalizadas com β - ciclodextrina carregadas com CVC e linalol. Os autores relatam que a liberação do CVC já no início do ensaio, pode ser pela perda das moléculas, infiltradas na superfície das nanopartículas ou que estavam encapsuladas próximas a superfície. Os autores obtiveram $49,2 \pm 0,45\%$ de liberação do CVC após 600 minutos. Outros autores relatam que encapsularam o carvacrol através do polímero sintético D, L-lactídeo-co-glicolídeo (PLGA), qual apresentou uma liberação rápida inicial (efeito de explosão), seguindo de uma liberação mais lenta. Depois de três horas, 60% do carvacrol incluso nas nanoesferas foi liberado, após 24 horas praticamente quase todo o composto (95%) presente da nanopartícula foi liberado (IANNITELLI et al., 2011).

Já, Ganje et al. (2019) encapsularam óleo da casca de laranja contendo 92% de limoneno em nanopartículas de amilose através de métodos combinados, mecânicos (sonicação) e térmicos. E realizaram as análises de estabilidade e a liberação do limoneno por meio de sacos de diálise. E notaram que os nanocarreadores de amilose carregados com limoneno apresentam alta estabilidade contra os ácidos extra-ácidos, obtiveram a liberação após 2 horas de incubação a 37 °C um valor inferior a 5% do limoneno encapsulado.

Desta forma, verifica-se aqui que a cinética de liberação do carvacrol corrobora com o de outros autores, possivelmente por ser um ativo mais solúvel e desta forma sofre mais influência do processo de liberação por difusão do interior da partícula para o meio aceptor. Entretanto para o limoneno a liberação foi extremamente baixa possivelmente pela alta hidrofobicidade do composto e forte interação com a matriz proteica das nanopartículas.

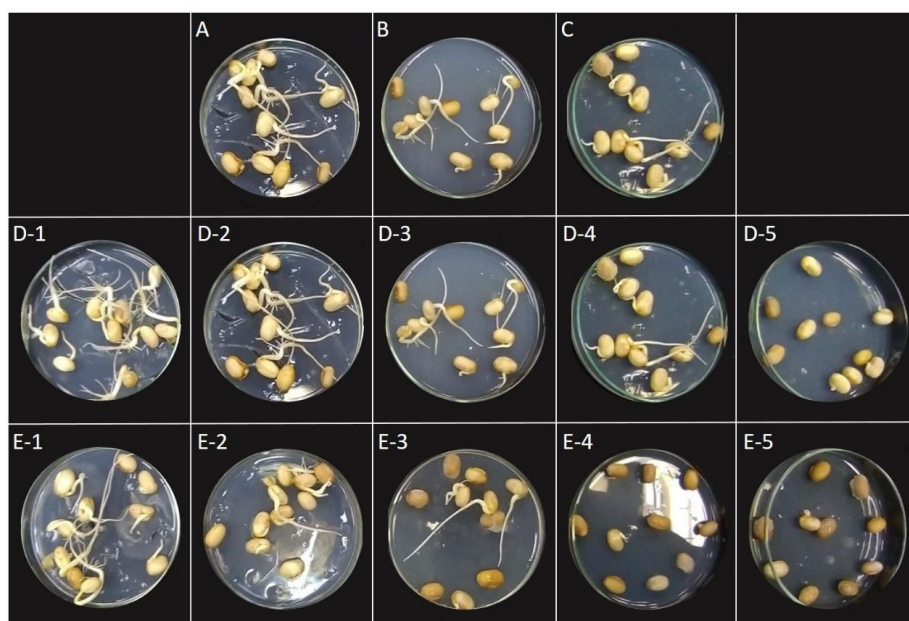
5.6 Ensaio de Fitotoxicidade

5.6.1 Em sementes

O efeito fitotóxico das nanopartículas foram avaliados em sementes de feijão. O menor índice de germinação foi observado nos tratamentos com a solução hidroetanólica de zeína e a nanopartícula sem ativos na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$. Os tratamentos Pluronic e água, apresentaram germinação superior a 70%, não apresentando efeitos fitotóxicos significativos, em comparação ao controle zeína, a qual apresentou germinação de 20%. As sementes tratadas com formulação de ZNP sem ativos a 0,25 , 1,25, 2,5, 3,75 e 5 $\mu\text{g/mL}$

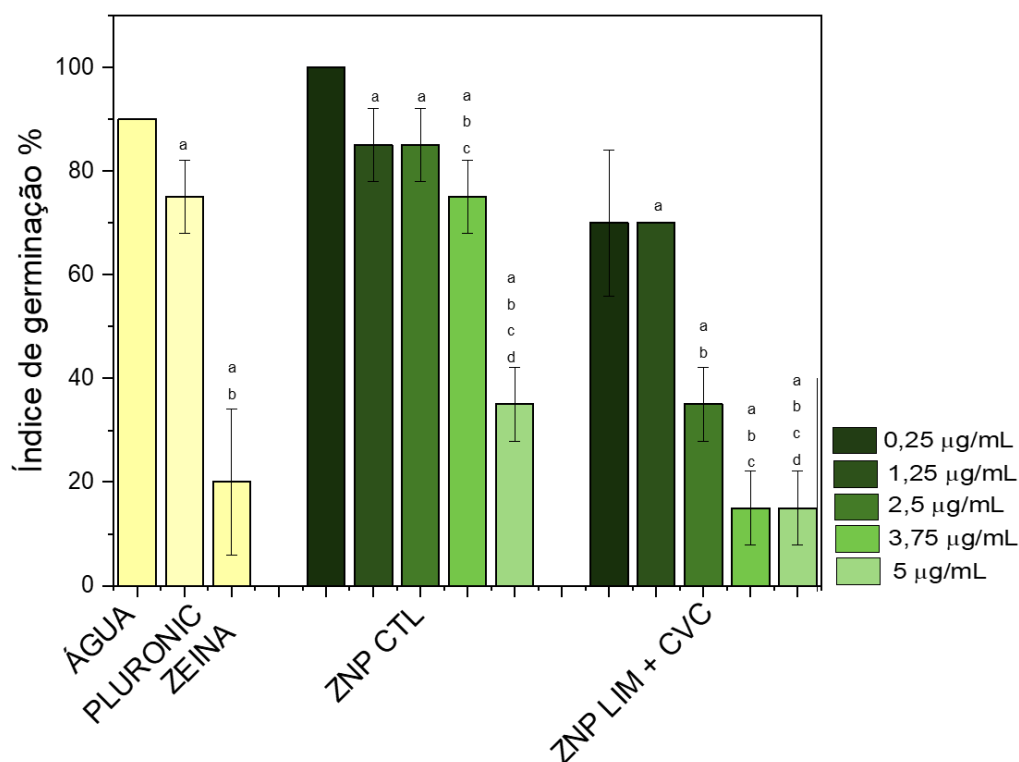
apresentaram índice de germinação de 100%, 85%, 85%, 75% e 35% $\pm$ 0,7%, respectivamente. As sementes tratadas com formulação de ZNP com ativos a , 0,25 , 1,25, 2,5, 3,75 e 5 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram índice de germinação de 70%, 70% $\pm$ 1,4%, 35%, 15% e 15% $\pm$ 0,7%, respectivamente. As Figuras 15 e 16 apresentam as placas de Petri com as sementes tratadas e o índice de germinação obtidos.

FIGURA 15: Placas de Petri com as sementes de feijão nas diferentes soluções A) Pluronic, B) Água, C) Zeína. D) Sementes tratadas com nanopartículas sem ativos; D-1 : 0,25 $\mu\text{g/mL}$; D-2 1,25 $\mu\text{g/mL}$; D-3 : a 2,5 $\mu\text{g/mL}$; D-4: 3,75 $\mu\text{g/mL}$; D-5: 5 $\mu\text{g/mL}$. E) Sementes tratadas com ZNP LIM CVC E-1 0,25 $\mu\text{g/mL}$; E-2: 1,25 $\mu\text{g/mL}$; E-3: a 2,5 $\mu\text{g/mL}$; E-4: a 3,75 $\mu\text{g/mL}$; E-5: 5 $\mu\text{g/mL}$. Tratamentos feitos em ágar-ágar, pH 8 e temperatura ambiente.



Fonte: autoria própria

FIGURA 16: Índice de germinação em sementes de feijão (*P. vulgaris*), tratadas em diferentes concentrações de nanopartículas. Realizados com água; surfactante Pluronic, formulação hidroetanólica de zeína e com ZNP LIM + CVC em concentrações de 0,25 , 1,25, 2,5, 3,75 e 5 $\mu\text{g/mL}$ com análise de variância ANOVA, com significância estatística de $p < 0,05\%$



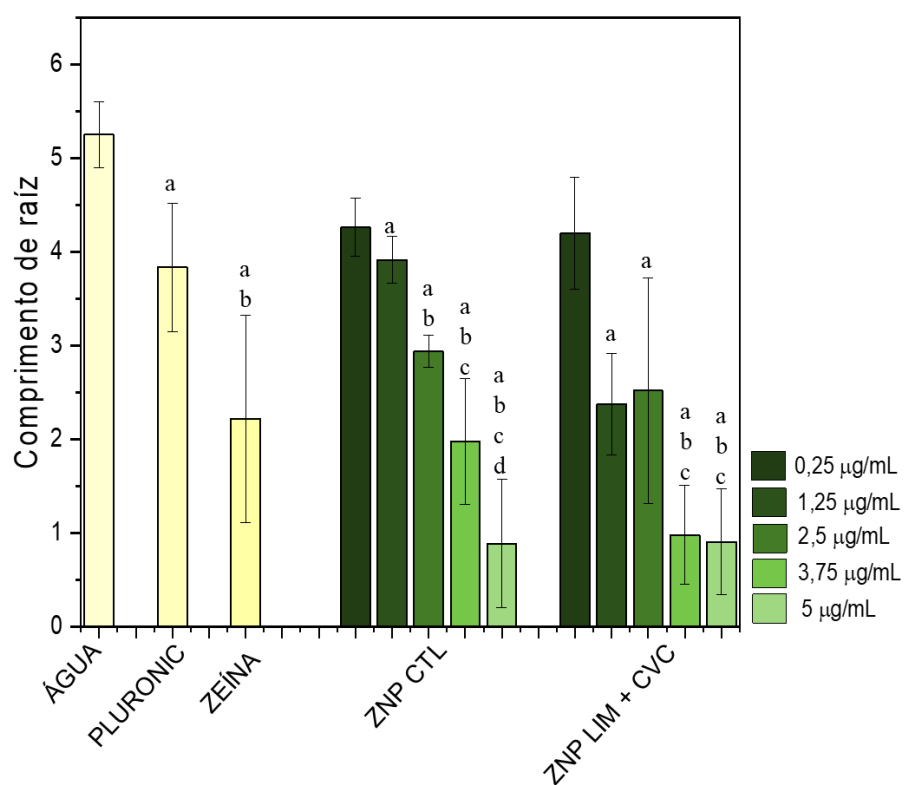
Fonte: Autoria própria

Em estudos realizados com óleos essenciais, foi identificado que os componentes químicos presentes podem apresentar efeitos fitotóxicos, além de demonstrar que são passíveis de efeitos alelopáticos, interferindo assim na germinação, crescimento e até mesmo no desenvolvimento de outras plantas (MOURA et. al, 2013). A solução hidroetanólica de zeína mostrou um baixo índice de germinação e isso pode ser atribuído ao álcool presente na solução, pois quando a zeína está em forma de nanopartícula em suspensão aquosa o índice de germinação, mesmo na maior concentração, não se mostra tão baixo.

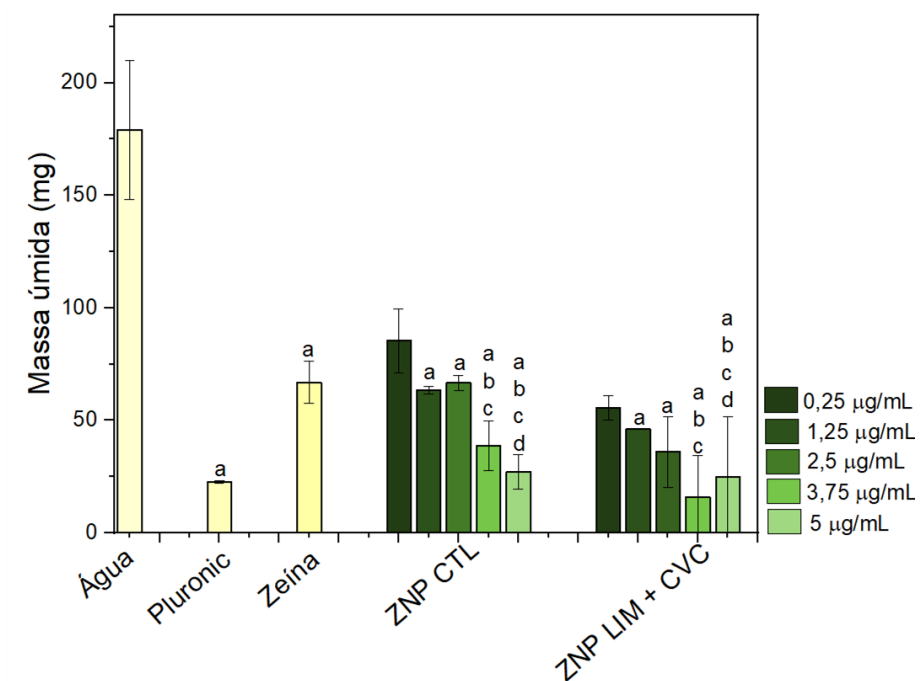
As sementes tratadas com as formulações sem e com os ativos nas concentrações de 3,75 e 5 µg/mL foram as que apresentaram maior toxicidade, como apresentadas na Figura 17. Para o tratamento com as testemunhas a diferença não foi significativa, análise realizada pela (ANOVA) $p < 0,5\%$ determinados através do software GraphPad Prism 7. Entretanto, dependendo das concentrações aplicadas, os ativos podem potencializar a toxicidade nos organismos alvos ou não alvos.

FIGURA 17: Desenvolvimento de raiz A) massa úmida B) massa seca C) das sementes de feijão (*P. Vulgaris*). Realizados em diferentes concentrações de ZNP LIM + CVC nas concentrações de 0,25 , 1,25, 2,5, 3,75 e 5 µg/mL e com testemunhas em: água, surfactante Pluronic F-68 e formulação hidroetanólica de zeína.

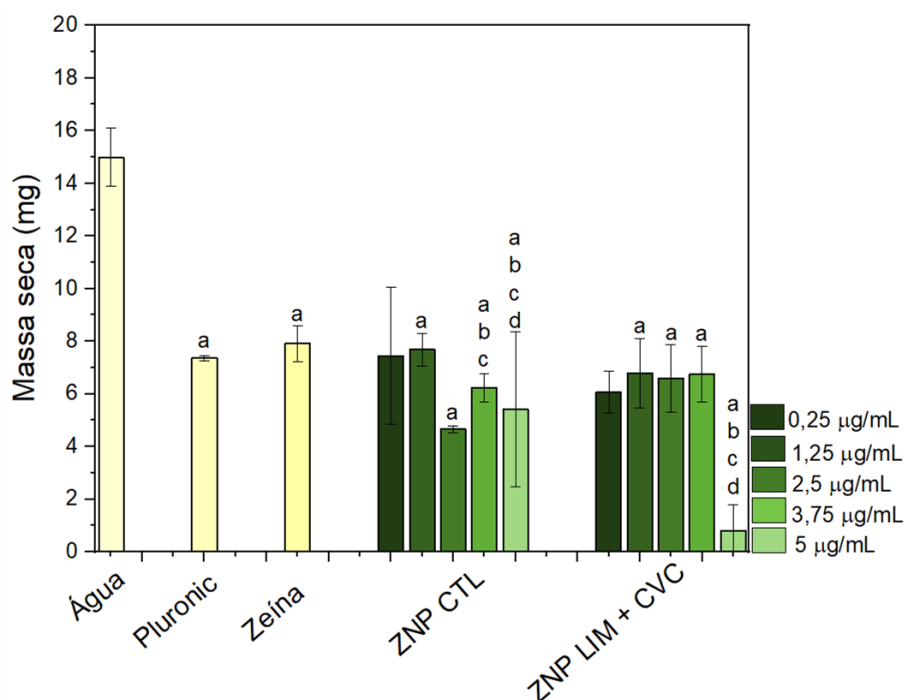
A)



B)



C)



Fonte: autoria própria

As nanopartículas de zeína podem potencialmente serem absorvidas pelas raízes, e assim transportadas por vias apoplásticas e simplásticas, quais estão envolvidas na absorção de água e nutrientes (PRASAD et al., 2018).

Desta forma, foram avaliadas a massa úmida e massa seca das raízes nas concentrações de 0,0375 e 0,0500 µg/mL das formulações com e sem os ativos. Os resultados não demonstraram diferenças estatísticas significativas.

Ambas formulações (com e sem os ativos) demonstraram redução na massa úmida das raízes, comparada as testemunhas, embora os efeitos tenham sido menores em maiores concentrações das formulações. Em peso úmido da raiz a diferença não foi relevante para ambos tratamentos e suas concentrações.

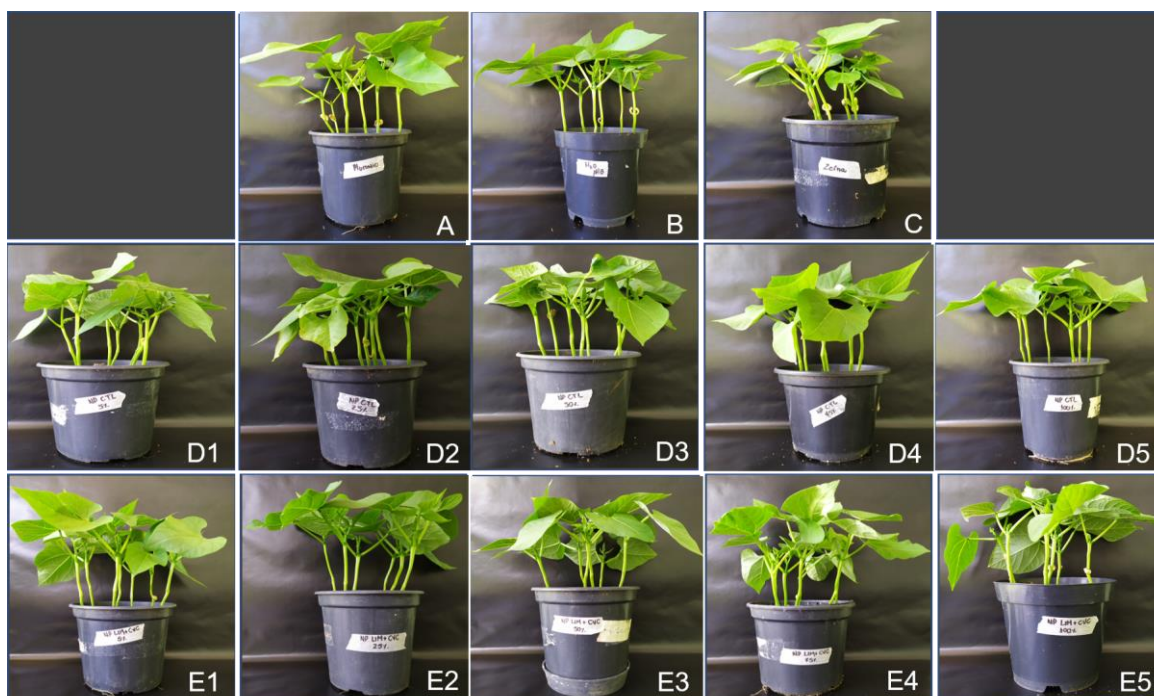
Oliveira et al. (2018) relatam que em seus experimentos os resultados indicaram que o processo de nanoencapsulação fornece proteção contra a fitotoxicidade para as sementes. Outros autores investigaram a aplicação pré-emergente do óleo essencial de orégano a

tomateiros, e demonstraram que os efeitos fitotóxicos eram reduzidos quando o óleo essencial estava encapsulado em filmes de quitosana e nanopartículas poliméricas (PERDONES et al., 2016).

5.6.2 Efeito fitotóxicos em plantas

Para os tratamentos em plantas, também foram avaliados o efeito fitotóxico das nanopartículas com feijão *P. vulgaris* L. (Figura 18), onde foram realizados os tratamentos: pluronic, água e zeína e com ZNP CTL E ZNP LIM + CVC nas concentrações de 0,25 , 1,25, 2,5, 3,75 e 5 $\mu\text{g/mL}$. Para os vasos tratados com as nanopartículas sem e com os ativos, pode-se verificar que não ocorreu diferença desenvolvimento das plantas na parte aérea e folhas, também não ocorreu alterações na coloração das folhas.

FIGURA 18 : Vasos com as plantas de feijão nos tratamentos: A) Pluronic, B) Água, C) Zeína. D) Plantas tratadas com ZNP CTL; D-1 : 0,25 $\mu\text{g/mL}$; D-2 1,25 $\mu\text{g/mL}$; D-3 : a 2,5 $\mu\text{g/mL}$; D-4: 3,75 $\mu\text{g/mL}$; D-5: 5 $\mu\text{g/mL}$. E) Plantas tratadas com ZNP LIM + CVC E-1 0,25 $\mu\text{g/mL}$; E-2: 1,25 $\mu\text{g/mL}$; E-3: a 2,5 $\mu\text{g/mL}$; E-4: a 3,75 $\mu\text{g/mL}$; E-5: 5 $\mu\text{g/mL}$. Considerando a significância de $p < 0,05$ (ANOVA).

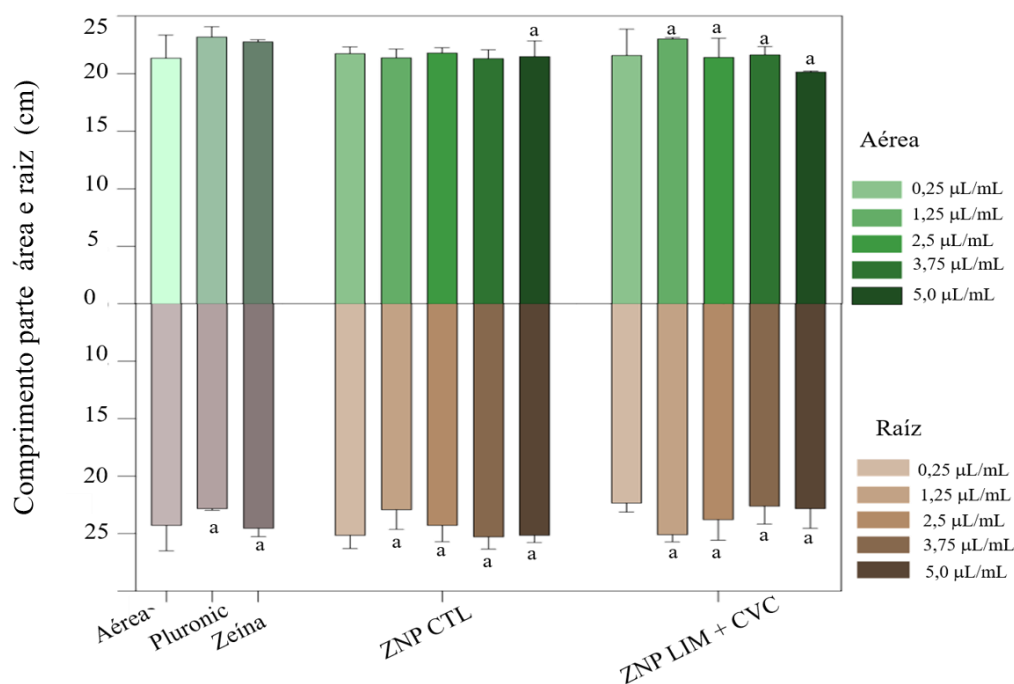


Fonte: autoria própria.

Outras análises realizadas das medições de raízes e do comprimento da parte aérea de cada planta de feijão, além das análises dos fatores de atividade fotossintética como níveis

de clorofila a e b e carotenóides para verificação de fitotoxicidade das nanopartículas nos organismos não alvo.

FIGURA 19 : Gráfico das medições de feijão do comprimento da parte aérea e da raiz das plântulas. Considerando a significância de $p < 0,05$ (ANOVA).



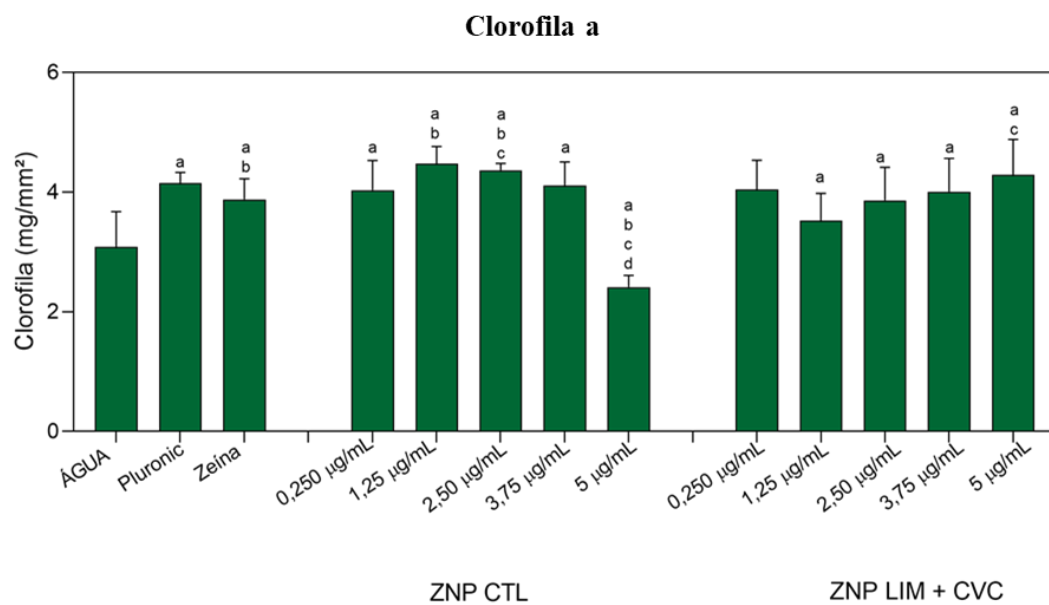
Fonte: autoria própria

A parte radicular e aérea pode ser analisada para identificação de fitotoxicidade, que poderia ser causadas pela formulação de nanopartículas. As folhas são considerada a parte mais sensível de uma planta e através dela pode ser observado alguns fatores que indicariam a toxicidade na planta, sendo um desses fatores a clorose (CAMPOS et al., 2018b).

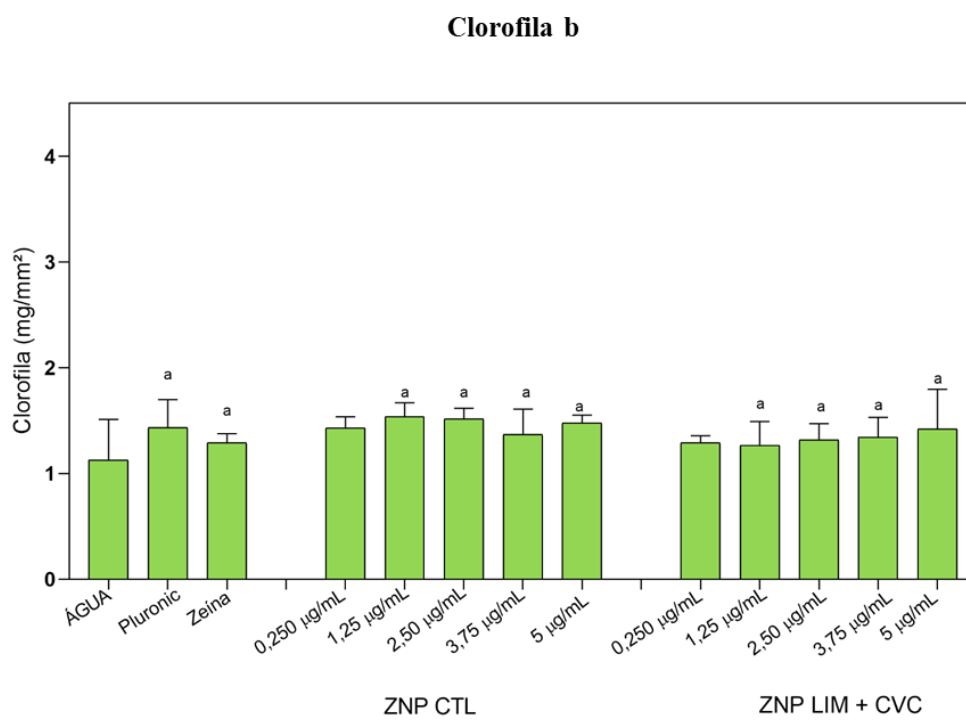
Durante a coleta de dados foi observado que não ocorreu nenhum fator que indicasse toxicidade para as plantas de feijão, pois não ocorreram diferenças nos pigmentos fotossintetizantes que identificasse clorose. Além disso não observou-se diferenças significativas tanto na parte aérea quanto na raiz das plantas.

FIGURA 20: A) Análise de clorofila a B) Análise clorofila b C) Caratenóides em plantas de feijão. Foram realizadas análises de significancia através da ANOVA $p > 0,5$ %

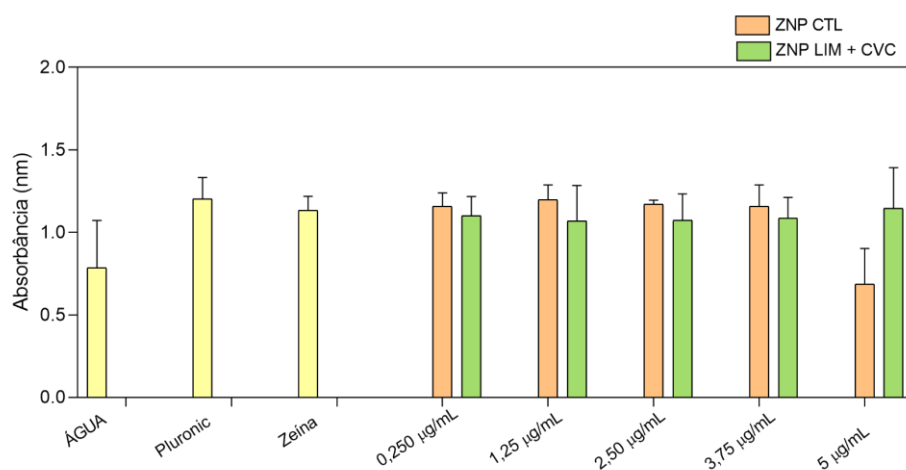
A)



B)



C)



Através das análises realizada pela ANOVA $p > 0,5 \%$ foi possível verificar que as concentrações de clorofila a não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos quando comparadas com o as nanopartículas com e sem o ativo, em relação aos tratamentos testemunhas com: água, zeína e pluronic. Assim como para as concentrações de clorofila b no tratamento não houve diferenças significativas quando comparadas aos tratamentos testemunha e nanopartículas sem os ativos.

Para os caratenóides nas nanopartículas com os ativos na maior concentração apresentou uma variação, porém não significativa comparada aos tratamentos testemunhas e a nanopartícula de controle.

Outros autores avaliaram a fitotoxicidade de nanopartículas funcionalizadas com β -ciclodextrina contendo carvacrol e linalol, verificaram que ocorreu diminuições na toxicidade quando os ativos foram nanoencapsulados (CAMPOS et al., 2018a).

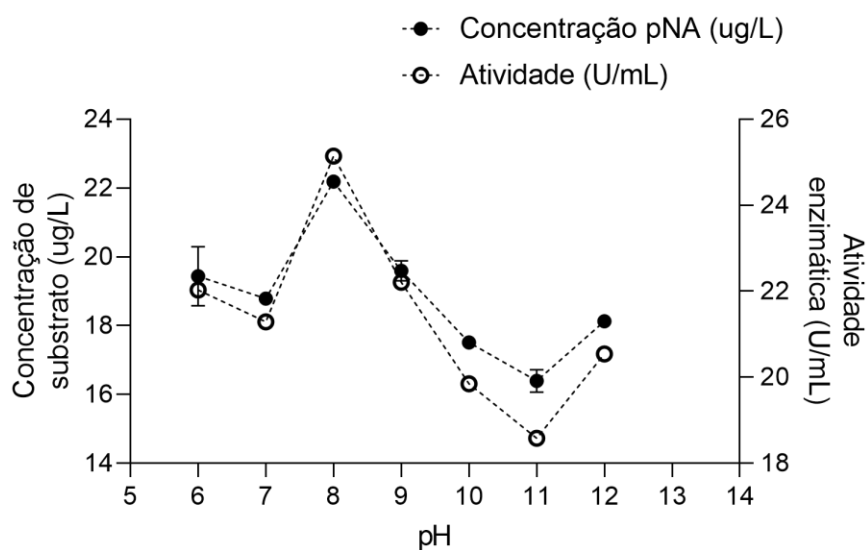
Synowiec et al. (2017), também avaliaram o potencial fitotoxicos de 12 tipos de óleos essenciais, em três culturas diferentes, *Avena sativa*, *Brassica napus* e *Zea mays* e verificaram que além das concentrações as cultura também depende da sensibilidade da espécie. Correlacionando os resultados obtidos no ensaio com as sementes e no ensaio pós emergente, podemos observar que nas sementes as maiores concentrações aplicadas apresentam maior fitotoxicidade, já para as plantas a formulação com os ativos não demonstraram fitotoxicidade para todas as concentrações.

5.7 Atividade enzimática da tripsina

A atividade enzimática da tripsina foi realizada em diferentes pH variando de 6 a 12, uma vez que o pH possui um papel importante na atividade desta. Para o estudo, a atividade de tripsina apresentou atividade ótima em pH 8,0 conforme representado na figura 21.

De acordo com a figura 21, pode-se afirmar que a condição experimental que maximiza a atividade enzimática máxima foi encontrada em pH 8,0 a 37 °C.

FIGURA 21:Efeito de diferentes pH na atividade da tripsina em temperatura de 37°C.



Fonte: Própria autoria

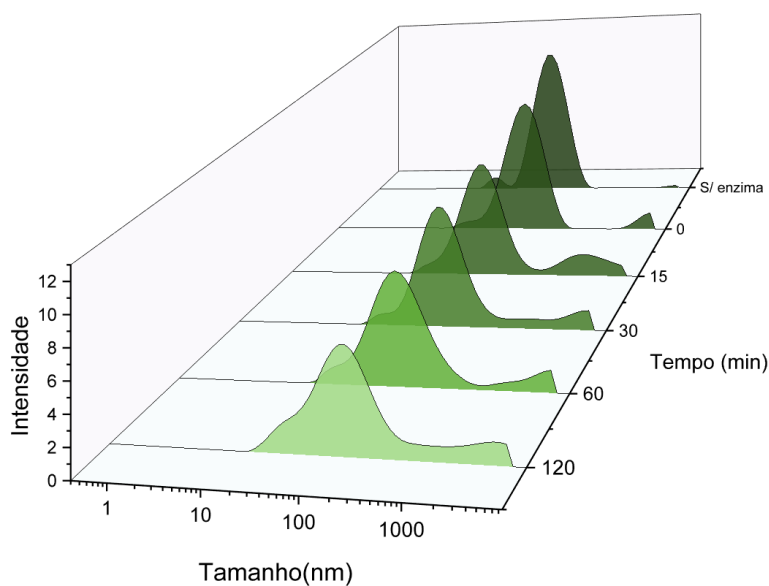
Os resultados obtidos neste ensaio, podem ser comparados aos encontrados na literatura, onde os autores relatam atividade ótima para tripsina, encontrada em 50 e 60°C (6,7 U) e para a quimiotripsina (5,68 U) ambos na mesma temperatura (AKBAR; SHARMA, 2017a) e o pH ótimo foi encontrado na faixa de 8 a 10. De Araújo et al. (2013) encontrou atividade máxima proteolítica da tripsina em pH 8,5 em temperatura de 55°C.

5.8 Degradação enzimática das nanopartículas

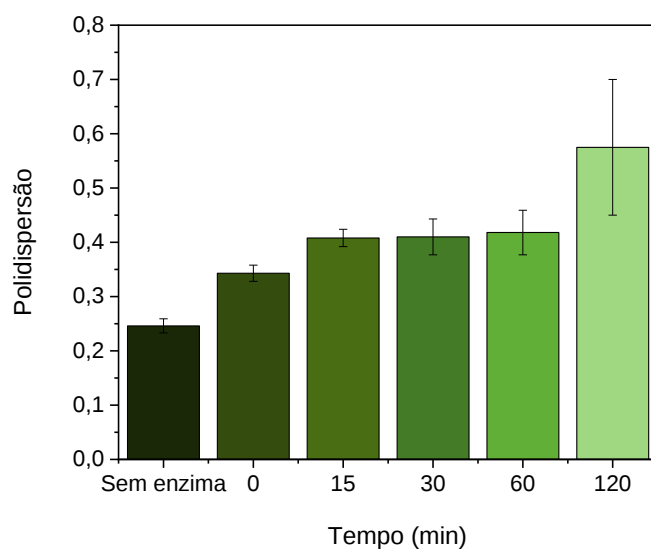
Para o ensaio de degradação das ZNP LIM+CVC com a adição da enzima tripsina, foram realizados análises do diâmetro médio e polidispersão e também concentração e diâmetro médio (NTA). Os ensaios foram realizados com 950 μL da formulação ZNP LIM + CVC sem a enzima adicionando 50 μL de água (amostra de controle), para a amostra com adição da enzima tripsina, foram utilizados 950 μL de ZNP LIM + CVC e 50 μL de enzima, em função do tempo 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos, apresentados na figura 22.

FIGURA 22: A) Análise do tamanho das ZNP LIM + CVC, B) Polidispersão das ZNP LIM + CVC C) Potencial zeta das ZNP LIM + CVC pela técnica de DLS D) Análise de tamanho e concentração das ZNP LIM + CVC através da técnica de NTA (para ambos gráficos). Análises em função do tempo de contato com a enzima , sem adição e com a enzima nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 minutos.

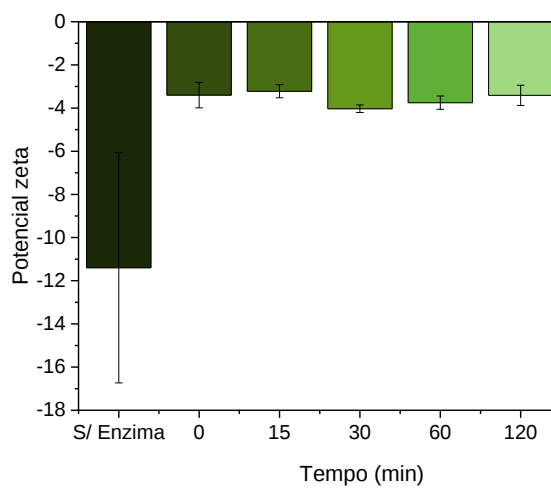
A)



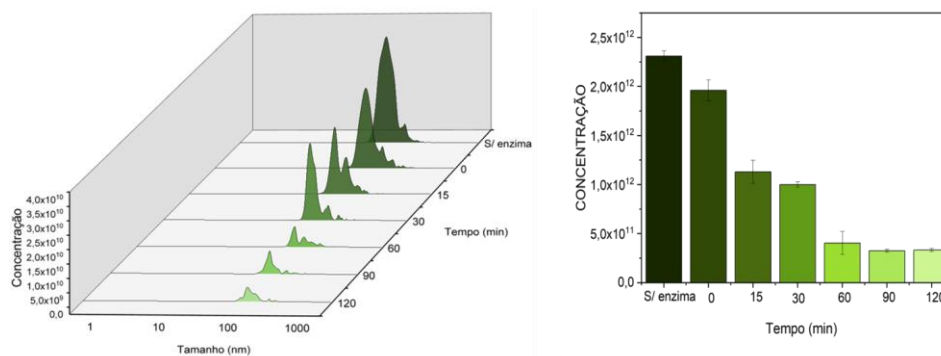
B)



C)



D)



Fonte: Própria autoria

Nas análises em DLS pode-se observar na figura 22 A) que a intensidade do tamanho das nanopartículas diminui conforme o tempo de exposição da nanopartícula com a enzima. Possivelmente isso acontece pelo fato da tripsina ser uma enzima digestiva ela auxiliando no processo de degradação. Essa enzima é responsável pela realização da quebra de proteínas em várias unidades de aminoácidos para absorção (PAWAR et al., 2014).

Na figura 22 B) verificamos que a polidispersão se apresentou em $0,246 \pm 0,013$ sem adição da enzima e ao primeiro contato com a enzima no tempo 0 minutos, $0,343 \pm 0,015$ ocorrendo um aumento e ao final do tempo de 120 minutos $0,575 \pm 0,125$ apresentou um aumento maior. Neste caso também ocorre a digestão realizada pela tripsina, onde ela realiza a quebra de grandes estruturas protéicas em várias unidades de aminoácidos.

Na figura 22 C) observa-se que o potencial zeta das nanopartículas sem a adição de enzima se encontrava em $-11,4$ mV e em função do tempo de contato com a enzima, diminuiu para $-3,4 \pm 0,59$ mV ao longo de 120 minutos indicando que as partícula sofreram alteração ao longo deste período.

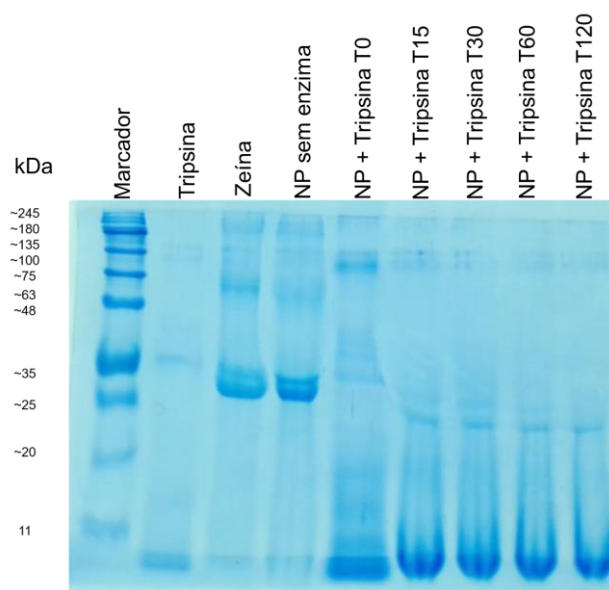
Já na figura 22 D), ambos os gráficos (3D e em barras) apresentam a análise realizada no NTA. Nesta figura, pode-se verificar que a concentração encontrada sem a adição de enzima foi de $2,31 \times 10^{12} \pm 5,36 \times 10^{11}$ partículas/mL e o tamanho médio de 101 ± 3 nm, no tempo inicial. Já com a presença da enzima este valor foi para $1,96 \times 10^{12} \pm 1,08 \times 10^{11}$ e o tamanho médio de 131 ± 3 nm, sendo o mesmo alterado para $3 \times 10^{11} \pm 1 \times 10^{10}$ partículas/mL e o tamanho médio foi de 178 ± 18 nm. Desta forma, pela técnica de NTA, foi possível observar que houve uma diminuição na população de partículas em função do tempo, sendo este fato provavelmente devido à degradação das partículas pela atividade enzimática.

Um fato importante é que ao longo de todo o ensaio a atividade enzimática foi monitorada durante o período de 240 minutos (4 horas) e a mesma se apresentou ativa dentro o tempo analisado, em T0 minutos a atividade encontrada foi de 2,3 U/mL e após 240 minutos 2,4 U/mL, indicando que as nanopartículas ou componentes do sistema não foram capazes de inativar a atividade desta enzima.

Para confirmar a degradação das nanopáticas, foram realizadas análises de eletroforese em condições desnaturantes. A figura 23 mostra o gel de poliacrilamida com as formulações testadas iniciando pelo marcador, em sequência: enzima tripsina, formulação

de nanopartícula de limoneno e carvacrol, sem a adição da enzima tripsina, a formulação com a adição de enzima tripsina, nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 minutos de contato .

FIGURA 23: SDS-PAGE em gel poliacrilamida, iniciando com o marcador de peso molecular seguindo com as formulações : Tripsina; zeína; ZNP LIM + CVC (sem a enzima); formulação de ZNP LIM+CVC + tripsina incubada nos tempos 0; 15; 30; 60 e 120 minutos.



Fonte: autoria própria.

A enzima tripsina apresenta unidades com massa de 23,3 a 66 kDa (AKBAR; SHARMA, 2017b; SIGMA- ALDRICH, 2019) e a zeína possui massa entre 20 a 21 kDa (SIGMA- ALDRICH, 2019). A análise de eletroforese comprova que quando a formulação contendo LIM + CVC, entra em contato com a enzima tripsina, inicia-se imediatamente em tempo inicial a degradação da nanopartícula zeína, apresentada na figura 23.

Estudos realizados por outros autores corroboram com resultados obtidos, como em nanoesferas de zeína encapsuladas contendo três tipos de óleos essenciais: orégano, tomilho vermelho e cássia (óleo 100% puro) investigando a liberação controlada dos óleos em sistemas digestivos, onde os autores observaram através de análise de eletroforese a hidrólise nas nanoesferas de zeína de forma lenta para o intestino delgado e mais rápida no intestino grosso, o que sugere que o sistema pode ser útil para administração de materiais biológicos (PARRIS; COOKE; HICKS, 2005). Assim também (AKBAR; SHARMA, 2017b) avaliaram através de SDS-PAGE e encontraram bandas de tripsina com massas moleculares em 23 a 66 kDa e quimiotripsina em 29 a 34 kDa.

Camara et al. (2019) descreveram que formulações responsivas a enzimas apresentam vantagens consideráveis para a área agrícola, pois os ativos só serão liberados na presença das enzimas, o que aumenta a eficácia e segurança da aplicação, além de mitigar os efeitos ao meio ambiente e aos organismos não-alvo, e que podem diminuir consideravelmente a quantidades de produtos químicos empregues comparadas aos métodos comuns.

6 CONCLUSÃO

A agricultura tem apresentado inovações tecnológicas e com isso nanotecnologia tem sido uma aliada área da agricultura nos últimos anos, devido aos impactos ambientais e a utilização massiva dos agroquímico, por essa razão pesquisas voltadas a sustentabilidade e segurança a saúde humana e do meio ambiente tem se intensificado. Atualmente encontramos no mercado alguns produtos formulados com compostos botânicos, considerados de baixo impacto, entretanto esses produtos são limitados comparado aos produtos convencionais, pela baixa disponibilidade de informações sobre os componentes desses produtos como óleos essenciais, devido à ausência regularização e padronização na composição desses, e a falta de conhecimento sobre a toxicidade dessas formulações no meio ambiente. A literatura apresenta alguns trabalhos que trazem procedimentos do preparo e caracterização dessas formulações, porém poucos trazem informações sobre a toxicidade a organismos não-alvo. Diante desse atual cenário, esse trabalho apresenta o preparo e caracterização de nanopartículas carregadas com compostos botânicos, para possíveis aplicações agrícolas de maneira sustentável, para o controle de pragas com liberação estímulo responsivo.

A figura 24 apresenta um resumo dos principais resultados obtidos neste estudo, onde as nanopartículas sem e com os ativos apresentou estabilidade durante o período de acompanhamento, 120 dias. A ZNP CTL mostrou um tamanho inicial de $117 \pm 0,7$ nm após 120 dias $116 \pm 2,4$ nm exibindo diminuição não significativa no tamanho, também foi analisada a concentração, que inicialmente se apresentou em $3,52 \times 10^{12} \pm 1,51 \times 10^{11}$ e em 120 dias $5,05 \times 10^{12} \pm 1,07 \times 10^{11}$ partículas/mL. Já as ZNP LIM + CVC tiveram tamanho inicial de 111 ± 1 nm e mantiveram valores estáveis em relação ao tamanho que em 120 dias também teve uma diminuição no diâmetro médio de 87 ± 1 nm e a concentração foi de $4,69 \times 10^{12} \pm 9,08 \times 10^{11}$ e em 120 dias $4,73 \times 10^{12} \pm 9,08 \times 10^{11}$, para a polidispersão ZNP CTL

apresentou-se em $0,180 \pm 0,013$ e aos 120 dias $0,139 \pm 0,012$, em ZNP LIM + CVC a polidispersão foi de $0,277 \pm 0,006$ e também com uma diminuição 120 dias $0,234 \pm 0,008$. Para o potencial zeta das ZNP CTL foi de $-30 \pm -1,17$ mV e em 120 dias ocorreu uma diminuição -24 ± 1 mV, para as ZNP LIM + CVC o potencial zeta encontrado inicialmente foi de $-25 \pm 1,5$ mV e em 120 dias esse valor foi de $-22 \pm 0,6$ mV, e o pH das nanopartículas sem os ativos inicialmente foi de $8,27 \pm 0,02$ e em 120 dias teve uma diminuição de $7,69 \pm 0,01$, para a formulação com os ativos inicialmente foi de $8,30 \pm 0,02$ em 120 dias também diminuiu $7,66 \pm 0,02$. A eficiência de encapsulação para ambos os ativos foi acima de 90%, o que indica uma interação ideal entre os ativos e o sistema. Em análise de ângulo de contato foi possível verificar a molhabilidade das nanopartículas na superfície de planta de feijão onde apresentou o ângulo de 64° sugerindo que as nanopartículas são hidrofílicas.

FIGURA 24: Resumo dos resultados obtidos nas análises realizadas, para produção e caracterização das nanopartículas de zeína carregadas com ativos botânicos LIM + CVC e a a degradação enzimática sobre as nanopartículas.

ZNP CTL			
Período (dias)	0	120	Conclusão
Diâmetro médio (nm)	117 ± 1	116 ± 1	estável
PdI	0,180 ± 0,013	0,139 ± 0,012	estável
Potencial zeta (mV)	-30 ± 1	-24 ± 1	estável
Concentração de partículas (part/mL)	3,52 x 10 ¹² ±1,51 x 10 ¹¹	5,05 x10 ¹² ± 1,07 x 10 ¹¹	estável
pH	8,2 ± 0,02	7,6 ± 0,01	estável
ZNP LIM + CVC			
Período (dias)	0	120	
Diâmetro médio (nm)	111 ± 2	87 ± 1	estável
PdI	0,277 ± 0,006	0,234 ± 0,008	estável
Potencial zeta (mV)	-25 ± 2	-22 ± 1	estável
pH	8,3 ± 0,02	7,6 ± 0,02	estável
Concentração de partículas (part/mL)	4,69 x 10 ¹² ± 1,32 x 10 ¹¹	4,73 x 10 ¹² ±9,08 x 10 ¹¹	estável
Eficiência de encapsulação - LIM %	99,9 ± 0,04	99,8 ± 0,02	estável
Eficiência de encapsulação - CVC %	91 ± 0,14	72,8 ± 0,07	estável
AFM	As nanopartículas apresentaram morfologia esférica		
DSC e FTIR	Observou-se que houve boa interação entre os ativos encapsulados e a nanopartícula de zeína		
Cinética de liberação dos ativos LIM + CVC			
LIM	Concentração baixa não foi possível quantificar		
CVC	15 min.: 0,9 ± 0,02 µg/mL	2880 min.: 24,1 ± 0,8 µg/mL	
Fitotoxicidade em sementes e plantas de feijão			
Sementes	As ZNP apresentam toxicidade dose-dependente em aplicações de maiores concentrações		
Plantas	Plantas pós emergente não houve alterações na área foliar e radicular as ZNP não apresentaram toxicidade.		
Degradação enzimática em ZNP LIM + CVC			

Atividade enzimática encontrada foi em pH 8 à 37°C e 22 U/mL de tripsina, foi possível comprovar a degradação das nanopartículas através das técnicas de análise: DLS, NTA e eletroforese.

O sistema de degradação enzimática foi efetivo

As análises realizadas no DSC foram possíveis observar as interações entre os compostos presentes na nanopartícula e no IFTR foi possível verificar que ocorreram pequenos deslocamentos nos ensaios com as nanopartículas sem e com o ativo que essas diferenças não foram significativas e que os compostos dos óleos essenciais LIM e CVC apresentaram características presentes nas nanopartículas com os ativos encapsulados, o que sugere interação entre os ativos e a matriz. No ensaio de cinética de liberação, foi realizado com os ativos LIM e CVC, notou-se que para ambos ativos as liberações dos foram baixas, sendo quantificado no carvacrol em 15 minutos $2,1 \pm 0,04 \%$ e em 2880 $55,3 \pm 1,8$, já o limoneno apresentou concentrações baixas não sendo possível quantificar. Também neste trabalho foi realizado o ensaio de fitotoxicidade com sementes e com plantas de feijão, qual apresentou toxicidade dose-dependente para o tratamento com as sementes, quando aplicados em baixa concentrações (abaixo de 70%), já para o tratamento com as plantas podemos observar que não ocorreu alterações significativas no desenvolvimento das raízes e da parte aérea, além das análises de clorofila a e b e carotenóides, qual não apresentou clorose nas folhas das plantas, o que indicaria clorose na planta, desta forma podemos sugerir que não ocorreu fitotoxicidade nas plantas já emergentes. As condições ótimas para o ensaio de liberação dos ativos junto a enzima foram determinadas em pH 8,0, 37°C e 22 U/mL tripsina, para os ensaios de degradação das nanopartículas com os ativos na presença de enzimas proteolíticas foram correlacionadas as três técnicas realizadas, DLS, NTA e eletroforese para que pudéssemos comprovar a atividade enzimática da tripsina nas nanopartículas com os ativos, desta forma confirmamos que o sistema respondeu a hipótese inicial do trabalho.

Os resultados obtidos nas análises realizadas na dissertação, apresentam informações importantes para o desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de zeína carregadas com compostos botânicos com potencial estímulo responsivo à enzimas, sendo assim consideradas perspectivas para a área agrícola, destacando a segurança contra efeitos fitotóxicos para saúde humana, organismos não-alvo e podendo mitigar os impactos causados ao meio ambiente causado por agroquímicos utilizados.

7 REFERÊNCIAS

AKBAR, S. M.; SHARMA, H. C. Alkaline Serine Proteases from *Helicoverpa Armigera* : Potential Candidates for Industrial Applications: Alkaline Serine Proteases from

Helicoverpa Armigera. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 94, n. 1, p. e21367, jan. 2017a.

AKBAR, S. M.; SHARMA, H. C. Alkaline Serine Proteases from *Helicoverpa Armigera*: Potential Candidates for Industrial Applications. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 94, n. 1, p. e21367, 1 jan. 2017b.

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

ANDERSON, T. J.; LAMSAL, B. P. REVIEW: Zein Extraction from Corn, Corn Products, and Coproducts and Modifications for Various Applications: A Review. **Cereal Chemistry Journal**, v. 88, n. 2, p. 159–173, mar. 2011.

Anvisa. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/servicos/publicacoes>>. Acesso em: 31 jul. 2019.

ANVISA, 2017.pdf. , [s.d.].

BAIRD, T. T. Trypsin ☆. In: **Reference Module in Life Sciences**. [s.l.] Elsevier, 2017.

BICAS, J. L.; PASTORE, G. M. Isolation and screening of d-limonene-resistant microorganisms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 563–567, set. 2007.

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

CAIRA, S.; FERRANTI, P. Innovation for Sustainable Agriculture and Food Production. In: **Reference Module in Food Science**. [s.l.] Elsevier, 2016.

CALLMANN, C. E.; GIANNESCHI, N. C. Enzyme-Responsive Nanoparticles for the Treatment of Disease. In: **Biomedical Nanotechnology**. Methods in Molecular Biology. [s.l.] Humana Press, New York, NY, 2017. p. 223–238.

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

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

CAMPOS, E. V. R. et al. Carvacrol and Linalool Co-Loaded in β -Cyclodextrin-Grafted Chitosan Nanoparticles as Sustainable Biopesticide Aiming Pest Control. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 16 maio 2018a.

CAMPOS, E. V. R. et al. Carvacrol and Linalool Co-Loaded in β -Cyclodextrin-Grafted Chitosan Nanoparticles as Sustainable Biopesticide Aiming Pest Control. **Scientific**

Reports, v. 8, n. 1, dez. 2018b. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-018-26043-x>>. Acesso em: 5 jul. 2019.

CEPEDA-PALACIOS, R. et al. In Vitro and in Vivo Effects of Neem Tree (*Azadirachta Indica* A. Juss) Products on Larvae of the Sheep Nose Bot Fly (*Oestrus Ovis* L. Díptera: Oestridae). **Veterinary Parasitology**, v. 200, n. 1–2, p. 225–228, fev. 2014.

CERDA, R. et al. Primary and Secondary Yield Losses Caused by Pests and Diseases: Assessment and Modeling in Coffee. **PLOS ONE**, v. 12, n. 1, p. e0169133, 3 jan. 2017.

CETIN, H. et al. Acaricidal activity of *Satureja thymbra* L. essential oil and its major components, carvacrol and γ -terpinene against adult *Hyalomma marginatum* (Acari: Ixodidae). **Veterinary parasitology**, v. 170, p. 287–90, 1 mar. 2010.

CHAIEB, I. et al. Chemical Composition and Aphicidal Potential of Citrus Aurantium Peel Essential Oils. **Entomologia Generalis**, v. 37, n. 1, p. 63–75, 1 nov. 2017.

CHAUDHARY, S.; MISRA, S. Nanotechnology: Resource Management for Sustainable Agriculture. p. 4, 2016.

CHEN, C. et al. Fabrication of Light-Responsively Controlled-Release Herbicide Using a Nanocomposite. **Chemical Engineering Journal**, v. 349, p. 101–110, out. 2018.

CHEN, H.; YADA, R. Nanotechnologies in agriculture: New tools for sustainable development. **Trends in Food Science & Technology - TRENDS FOOD SCI TECHNOL**, v. 22, p. 585–594, 1 nov. 2011.

CHEN, H.; ZHONG, Q. A novel method of preparing stable zein nanoparticle dispersions for encapsulation of peppermint oil. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 593–602, 1 jan. 2015.

DAI, R. Y. et al. High Blades Spreadability of Chlorpyrifos Microcapsules Prepared with Polysiloxane Sodium Carboxylate/Sodium Carboxymethylcellulose/Gelatin via Complex Coacervation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 530, p. 13–19, out. 2017.

DAMALAS, C. A.; KOUTROUBAS, S. D. Current Status and Recent Developments in Biopesticide Use. **Agriculture**, v. 8, n. 1, p. 13, 12 jan. 2018.

DAR, S. A. et al. Prospects , Utilization and Challenges of Botanical Pesticides in Sustainable Agriculture. In: **Anais...**2014.

DAR, S. A. et al. Prospects, Utilization and Challenges of Botanical Pesticides in Sustainable Agriculture. p. 14, [s.d.]

DASGUPTA, N.; RANJAN, S.; RAMALINGAM, C. Applications of Nanotechnology in Agriculture and Water Quality Management. **Environmental Chemistry Letters**, v. 15, n. 4, p. 591–605, dez. 2017.

DAVIDOV-PARDO, G. et al. Effect of Maillard Conjugates on the Physical Stability of Zein Nanoparticles Prepared by Liquid Antisolvent Coprecipitation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 38, p. 8510–8518, 30 set. 2015.

DE ARAÚJO, M. C. COLETADAS NO RIACHO CAVOUÇO. p. 3, 2013.

DE OLIVEIRA, J. L. et al. Association of Zein Nanoparticles with Botanical Compounds for Effective Pest Control Systems. **Pest Management Science**, v. 75, n. 7, p. 1855–1865, jul. 2019.

E ENAN, E. Molecular response of *Drosophila melanogaster* tyramine receptor cascade to plant essential oils. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 35, p. 309–21, 1 maio 2005.

ELZEY, et., al. (7) **Purity analysis of adulterated essential oils by FT-IR spectroscopy and partial-least-squares regression | Request PDF**. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/309250546_Purity_analysis_of_adulterated_essential_oils_by_FT-IR_spectroscopy_and_partial-least-squares_regression>. Acesso em: 16 jan. 2020.

ENAN, E. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 130, n. 3, p. 325–337, 1 nov. 2001.

FAO. **Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação: Estudo revela que Brasil é um dos países mais eficientes no uso da terra e insumos agrícolas em função de sua alta produção | FAO no Brasil | Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <<http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/pt/c/1070557/>>. Acesso em: 2 jan. 2020.

FRACETO, L. F. et al. Nanotechnology in Agriculture: Which Innovation Potential Does It Have? **Frontiers in Environmental Science**, v. 4, 2016. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fenvs.2016.00020/full>>. Acesso em: 14 maio. 2018.

GABRIEL PAULRAJ, M. et al. Comparative studies of tripolyphosphate and glutaraldehyde cross-linked chitosan-botanical pesticide nanoparticles and their agricultural applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, 11th APCCS-2016-Chemistry, Environmental, Biotechnology and Biomedical Aspects of Chitin and Chitosan. v. 104, p. 1813–1819, 1 nov. 2017.

GANJE, M. et al. Mathematical and Fuzzy Modeling of Limonene Release from Amylose Nanostructures and Evaluation of Its Release Kinetics. **Food Hydrocolloids**, v. 95, p. 186–194, out. 2019.

GAO, Z. et al. Photo-controlled release of fipronil from a coumarin triggered precursor. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 11, p. 2528–2535, 1 jun. 2017.

GUIMARÃES, A. G. et al. Encapsulation of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano, with β -cyclodextrin, improves the pharmacological response on cancer pain experimental protocols. **Chemico-Biological Interactions**, v. 227, p. 69–76, 5 fev. 2015.

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

HU, Q.; KATTI, P. S.; GU, Z. Enzyme-Responsive Nanomaterials for Controlled Drug Delivery. **Nanoscale**, v. 6, n. 21, p. 12273–12286, 24 set. 2014.

HUANG, B. et al. Advances in Targeted Pesticides with Environmentally Responsive Controlled Release by Nanotechnology. **Nanomaterials**, v. 8, n. 2, p. 102, 11 fev. 2018.

IANNITELLI, A. et al. Potential Antibacterial Activity of Carvacrol-Loaded Poly(DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) Nanoparticles against Microbial Biofilm. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 8, p. 5039–5051, 8 ago. 2011.

INMETRO, 2016.pdf. , [s.d.].

Inseticidas Botânicos, seus Princípios Ativos, Modo de Ação e Uso Agrícola - Elen Menezes.pdf. Disponível em: <<https://www.scribd.com/document/370243093/Inseticidas-Botonicos-seus-Principios-Ativos-Modo-de-Acao-e-Uso-Agricola-Elen-Menezes-pdf>>. Acesso em: 14 maio. 2018.

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

ISMAN, M. **Botanical Insecticides, Deterrents, And Repellents In Modern Agriculture And An Increasingly Regulated World**. [s.l: s.n.]v. 51

ISMAN, M. B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**, XIVth International Plant Protection Congress. v. 19, n. 8, p. 603–608, 12 set. 2000.

ISMAN, M. B.; GRIENEISEN, M. L. Botanical Insecticide Research: Many Publications, Limited Useful Data. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 3, p. 140–145, mar. 2014.

KAH, M.; WALCH, H.; HOFMANN, T. Environmental Fate of Nanopesticides: Durability, Sorption and Photodegradation of Nanoformulated Clothianidin. **Environmental Science: Nano**, v. 5, n. 4, p. 882–889, 2018a.

KAH, M.; WALCH, H.; HOFMANN, T. Environmental fate of nanopesticides: durability, sorption and photodegradation of nanoformulated clothianidin †Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c8en00038g. **Environmental Science. Nano**, v. 5, n. 4, p. 882–889, 1 abr. 2018b.

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

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

- KAROLEWICZ, B. et al. Pluronic F127 as a Suitable Carrier for Preparing the Imatinib Base Solid Dispersions and Its Potential in Development of a Modified Release Dosage Forms. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 130, n. 1, p. 383–390, 1 out. 2017.
- KAZIEM, Amir. E. et al. α -Amylase triggered carriers based on cyclodextrin anchored hollow mesoporous silica for enhancing insecticidal activity of avermectin against *Plutella xylostella*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 359, p. 213–221, 5 out. 2018.
- KOUTSOPOULOS, S. et al. Adsorption of Trypsin on Hydrophilic and Hydrophobic Surfaces. **Langmuir**, v. 23, n. 4, p. 2000–2006, 1 fev. 2007.
- KUMMER, R. et al. Evaluation of Anti-Inflammatory Activity of *Citrus Latifolia* Tanaka Essential Oil and Limonene in Experimental Mouse Models. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1–8, 2013.
- LALE, S. V.; KOUL, V. Stimuli-Responsive Polymeric Nanoparticles for Cancer Therapy. In: **Polymer Gels**. Gels Horizons: From Science to Smart Materials. [s.l.] Springer, Singapore, 2018. p. 27–54.
- LAZZARI, F. M.; SOUZA, A. S. REVOLUÇÃO VERDE: IMPACTOS SOBRE OS CONHECIMENTOS TRADICIONAIS. p. 16, 2017.
- LIU, H. et al. A midgut-specific serine protease, BmSP36, is involved in dietary protein digestion in the silkworm, *Bombyx mori*. **Insect Science**, v. 24, 1 ago. 2017.
- LOWRY, G. V.; AVELLAN, A.; GILBERTSON, L. M. Opportunities and Challenges for Nanotechnology in the Agri-Tech Revolution. **Nature Nanotechnology**, v. 14, n. 6, p. 517–522, jun. 2019.
- LUO, Y. et al. Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of alpha-tocopherol, and its in vitro controlled release study. **Colloids and Surfaces B Biointerfaces**, v. 85, p. 145–52, 1 fev. 2011a.
- LUO, Y. et al. Preparation and Characterization of Zein/Chitosan Complex for Encapsulation of α -Tocopherol, and Its in Vitro Controlled Release Study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, n. 2, p. 145–152, 1 jul. 2011b.
- LUO, Y.; WANG, Q. Zein-Based Micro- and Nano-Particles for Drug and Nutrient Delivery: A Review. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 131, 15 ago. 2014.
- MOTHÉ, C. G.; DAMICO, A.; MACHADO, M. da G. S. Estudo Termoanalítico, CLAE e Fracionamento Físico e Químico Do Subproduto Industrial Do Milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 1–7, mar. 2005.
- MOURA, et., al. DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PICÃO-PRETO E PIMENTÃO. v. 17, n. 2, p. 13, 2013.
- NAGEGOWDA, D. A. Plant volatile terpenoid metabolism: Biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation. **FEBS Letters**, v. 584, n. 14, p. 2965–2973, 16 jul. 2010.

NEČAS, D.; K LAPETEK, P. Gwyddion: an open-source software for SPM data analysis. **Open Physics**, v. 10, n. 1, p. 181–188, 2011.

NORONHA, C. M. et al. Characterization of Antioxidant Methylcellulose Film Incorporated with α -Tocopherol Nanocapsules. **Food Chemistry**, v. 159, p. 529–535, 15 set. 2014.

OLIVEIRA, J. L. de et al. Application of Nanotechnology for the Encapsulation of Botanical Insecticides for Sustainable Agriculture: Prospects and Promises. **Biotechnology Advances**, p. 1550–1561, 1 dez. 2014.

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, n. 6, p. 1330–1340, 14 fev. 2018.

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

PATANKAR, A. G. et al. Complexity in Specificities and Expression of Helicoverpa Armigera Gut Proteinases Explains Polyphagous Nature of the Insect Pest. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, n. 4–5, p. 453–464, mar. 2001.

PATEL, A. R.; VELIKOV, K. P. Zein as a source of functional colloidal nano- and microstructures. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 19, n. 5, p. 450–458, 1 out. 2014.

PAWAR, V. K. et al. Targeting of Gastrointestinal Tract for Amended Delivery of Protein/Peptide Therapeutics: Strategies and Industrial Perspectives. **Journal of Controlled Release**, v. 196, p. 168–183, dez. 2014.

PENALVA, R. et al. Zein nanoparticles for oral delivery of quercetin: Pharmacokinetic studies and preventive anti-inflammatory effects in a mouse model of endotoxemia. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 13, n. 1, p. 103–110, 1 jan. 2017.

PERDONES, Á. et al. Effect on Tomato Plant and Fruit of the Application of Biopolymer-Oregano Essential Oil Coatings: Effect of Essential Oil Coatings on Tomatoes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 13, p. 4505–4513, out. 2016.

PEREIRA, A. E. S. et al. Application of Poly(Epsilon-Caprolactone) Nanoparticles Containing Atrazine Herbicide as an Alternative Technique to Control Weeds and Reduce Damage to the Environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 268, p. 207–215, mar. 2014.

PEREIRA, A. E. S. et al. γ -Polyglutamic Acid/Chitosan Nanoparticles for the Plant Growth Regulator Gibberellic Acid: Characterization and Evaluation of Biological Activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1862–1873, 10 fev. 2017.

PIGNATI, W. A. et al. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 10, p. 3281–3293, out. 2017.

PINGALI, P. L. Green Revolution: Impacts, Limits, and the Path Ahead. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 31, p. 12302–12308, 31 jul. 2012.

PIRES, T.; RIBEIRO, M. G.; MACHADO, A. EXTRAÇÃO DO R-(+)-LIMONENO A PARTIR DAS CASCAS DE LARANJA: AVALIAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DA VERDURA DOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO TRADICIONAIS. **Química Nova**, 2017. Disponível em: <http://quimicanova.sbq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=6691&nomeArquivo=ED20170308.pdf>. Acesso em: 28 fev. 2019.

PODARALLA, S.; PERUMAL, O. Influence of Formulation Factors on the Preparation of Zein Nanoparticles. **AAPS PharmSciTech**, v. 13, n. 3, p. 919–927, 26 jun. 2012.

PRASAD, A. et al. Zein Nanoparticles Uptake and Translocation in Hydroponically Grown Sugar Cane Plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 26, p. 6544–6551, 5 jul. 2018.

PRASAD, R.; BHATTACHARYYA, A.; NGUYEN, Q. D. Nanotechnology in Sustainable Agriculture: Recent Developments, Challenges, and Perspectives. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1014, 2017.

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

PUBCHEM. **Limonene**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/22311>>. Acesso em: 29 nov. 2019.

RANGEL, R. C. C.; RANGEL, E. C.; CRUZ, N. C. MODIFICAÇÃO DA MOLHABILIDADE DE CERÂMICAS DE TiO₂ E Al₂O₃ PELA EXPOSIÇÃO A PLASMAS DE SF₆. p. 12, 2004.

REGNAULT-ROGER, C. The Potential of Botanical Essential Oils for Insect Pest Control. **Integrated Pest Management Reviews**, v. 2, n. 1, p. 25–34, 1 fev. 1997.

REGNAULT-ROGER, C.; VINCENT, C.; ARNASON, J. T. Essential Oils in Insect Control: Low-Risk Products in a High-Stakes World. **Annual Review of Entomology**, v. 57, p. 405–424, 2012.

REHMAN, M. U. et al. D -Limonene Suppresses Doxorubicin-Induced Oxidative Stress and Inflammation via Repression of COX-2, INOS, and NFκB in Kidneys of Wistar Rats. **Experimental Biology and Medicine**, v. 239, n. 4, p. 465–476, abr. 2014.

ROY, A. et al. Controlled Pesticide Release from Biodegradable Polymers. **Central European Journal of Chemistry**, v. 12, n. 4, p. 453–469, abr. 2014.

SADEGHI, R. et al. Advances in Nanotechnology as They Pertain to Food and Agriculture: Benefits and Risks. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 8, p. 467–492, 28 fev. 2017.

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

SEEMA, DATTA. **(6) (PDF) ORGANOCCLAY PLURONIC F68 – MONTMORILLONITE, AS A SUSTAINED RELEASE DRUG DELIVERY VEHICLE FOR PROPRANOLOL HYDROCHLORIDE**. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/280083401_ORGANOCCLAY_PLURONIC_F68_-MONTMORILLONITE_AS_A_SUSTAINED_RELEASE_DRUG_DELIVERY_VEHICLE_FOR_PROPRANOLOL_HYDROCHLORIDE>. Acesso em: 12 jan. 2020.

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

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

SILVA-BUZANELLO, R. A. da et al. Validation of an Ultraviolet–Visible (UV–Vis) Technique for the Quantitative Determination of Curcumin in Poly(l-Lactic Acid) Nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 172, p. 99–104, abr. 2015.

SOLOMONS et. al, 2001. , [s.d.].

SPASOJEVIĆ, L. et al. Edible Water Barrier Films Prepared from Aqueous Dispersions of Zein Nanoparticles. **LWT**, v. 109, p. 350–358, jul. 2019.

SYNOWIEC, A. et al. Phytotoxic Potential of Essential Oils from Temperate Climate Plants against the Germination of Selected Weeds and Crops. **Journal of Pest Science**, v. 90, n. 1, p. 407–419, 1 fev. 2017.

TAO, W. et al. Nanobuffering of PH-Responsive Polymers: A Known but Sometimes Overlooked Phenomenon and Its Biological Applications. **ACS Nano**, v. 13, n. 5, p. 4876–4882, 28 maio 2019.

TOMAZELLI JÚNIOR, O. et al. Microencapsulation of essential thyme oil by spray drying and its antimicrobial evaluation against *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 2, p. 311–317, 17 ago. 2017.

TORKAMANI, A. E. et al. Encapsulation of Polyphenolic Antioxidants Obtained from *Momordica Charantia* Fruit within Zein/Gelatin Shell Core Fibers via Coaxial Electrospinning. **Food Bioscience**, v. 21, p. 60–71, fev. 2018.

US EPA, O. **Biopesticides**. Disponível em:

<<https://www.epa.gov/pesticides/biopesticides>>. Acesso em: 15 maio. 2018.

VILLAYERDE, J. J. et al. Biopesticides in the Framework of the European Pesticide Regulation (EC) No. 1107/2009. **Pest Management Science**, v. 70, n. 1, p. 2–5, jan. 2014.

WANG, H. et al. Facile Encapsulation of Hydroxycamptothecin Nanocrystals into Zein-Based Nanocomplexes for Active Targeting in Drug Delivery and Cell Imaging. **Acta Biomaterialia**, v. 61, p. 88–100, 1 out. 2017.

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

WBC. **Enzyme Manual: Trypsin**. Disponível em: <<http://www.worthington-biochem.com:8080/enzyme-manual/TRY/>>. Acesso em: 18 jul. 2019.

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

WILKINS, R. M. Insecticide Resistance and Intracellular Proteases: Insecticide Resistance and Intracellular Proteases. **Pest Management Science**, v. 73, n. 12, p. 2403–2412, dez. 2017a.

WILKINS, R. M. Insecticide Resistance and Intracellular Proteases. **Pest Management Science**, v. 73, n. 12, p. 2403–2412, dez. 2017b.

WRÓBLEWSKA, A. The Epoxidation of Limonene over the TS-1 and Ti-SBA-15 Catalysts. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 19907–19922, dez. 2014.

YU, M. et al. Tannic Acid-Based Nanopesticides Coating with Highly Improved Foliage Adhesion to Enhance Foliar Retention. **RSC Advances**, v. 9, n. 46, p. 27096–27104, 2019.

ZHANG, B.; LUO, Y.; WANG, Q. Development of Silver–Zein Composites as a Promising Antimicrobial Agent. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 9, p. 2366–2375, 13 set. 2010.

ZHANG, Y. et al. Fabrication, characterization and antimicrobial activities of thymol-loaded zein nanoparticles stabilized by sodium caseinate–chitosan hydrochloride double layers. **Food Chemistry**, v. 142, p. 269–275, 1 jan. 2014.

ZHAO, A. et al. Inhibitory Effect of Protease Inhibitors on Larval Midgut Protease Activities and the Performance of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Frontiers in Physiology**, v. 9, 15 jan. 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2018.01963/full>>. Acesso em: 4 mar. 2019.