

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Renato Grillo

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO
MODIFICADA PARA HERBICIDAS TRIAZÍNICOS
UTILIZANDO NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de
Mestre em Biologia Funcional e
Molecular, área de Bioquímica.

Este exemplar corresponde à redação da
tese defendida pelo(a) candidato (a)
Renato Grillo
Leonardo Fernandes Fraceto
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

G879d Grillo, Renato, 1984-
Desenvolvimento de sistemas de liberação modificada para herbicidas triazínicos utilizando nanocápsulas poliméricas / Renato Grillo. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Leonardo Fernandes Fraceto.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Tecnologia de liberação controlada. 2. Nanocápsulas. 3. Herbicidas triazínicos. 4. Quitosana. I. Fraceto, Leonardo Fernandes. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Development of controlled release systems for triazine herbicides using polymeric nanocapsules

Palavras-chave em Inglês:

Controlled release technology

Nanocapsules

Triazine herbicides

Chitosan

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Leonardo Fernandes Fraceto [Orientador]

Vagner Roberto Botaro

André Henrique Rosa


Data da defesa: 19-07-2011

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

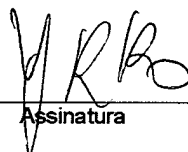
Campinas, 19 de julho de 2011

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto (Orientador)


Assinatura

Prof. Dr. Vagner Roberto Botaro


Assinatura

Profa. Dra. Luciana Camargo de Oliveira

Assinatura

Prof. Dr. André Henrique Rosa


Assinatura

Profa. Dra. Daniele Ribeiro de Araújo

Assinatura

Aos meus pais Lázaro e Liliane

"As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus caminhos."

Clarice Lispector

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar por toda força, generosidade, luz e saúde.

À Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Departamento de Bioquímica, pela oportunidade e experiência.

À Universidade Estadual Paulista, campus Sorocaba, Departamento Engenharia Ambiental, pelo espaço e oportunidade.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa de mestrado e à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto pela orientação dedicada nestes anos de convívio, profissionalismo e oportunidade, os quais foram fundamentais para o meu crescimento profissional e pessoal. Obrigado pela amizade e por confiar no meu trabalho.

Ao Prof. Dr. André H. Rosa e à Profa. Dra. Eneida de Paula pela importante colaboração, ajuda, atenção e incentivo durante toda a realização deste trabalho.

Aos meus pais Lázaro e Liliane, alicerces da minha vida, pela formação, educação, amor incondicional, apoio irrestrito quanto ao caminho que eu escolhi e por nunca ter me deixado desistir.

A toda a minha família (avós, avôs e tios), em especial as minhas queridas irmãs Ana Paula e Silvia Carolina que tanto me apoiaram com muita amizade, amor e carinho.

A minha namorada Pâmela pelo companheirismo, paciência, incentivo, confiança e amor.

Aos meus amigos Felipe, Geovane, Bruno e Nathalie pela amizade sincera, incentivo, conversas, conselhos, risadas, ajuda e aprendizado.

Aos meus amigos do Laboratório de Química Ambiental da UNESP-Sorocaba (Nathalie, Bruno, Anderson, Diego, Cássia, Estefânia, Lucas, Camila, Lilian, Renata) pela convivência, companheirismo, troca de experiências, além de agradáveis momentos de descontração.

Aos meus amigos do Laboratório de Biomembranas (Allan, Bruna, Sheila, Vivi Queiroz, Vivi Guilherme, Vivi Vieira, Ana Laís, Michelle, Giovana, Cíntia, Dani, Cleyton, Bispo, Maribel e Márcio) pela convivência, troca de experiências e todos os momentos vividos ao longo desses anos.

A Adriane e Antônia, técnicas do laboratório de microscopia eletrônica do Instituto de Biologia da Unicamp pelo auxílio nas análises de microscopia.

E a todos os professores, alunos e funcionários que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Artigos completos publicados em periódicos relacionados ao projeto

- **GRILLO, R.**; PEREIRA, A.E.S.; DE MELO, N.F.S.; PORTO, R.M.; FEITOSA, L.O.; TONELLO, P.S.; FILHO, N.L.D.; ROSA, A.H.; LIMA, R.; FRACETO, L.F. Controlled release system for ametryn using polymer microspheres: Preparation, characterization and release kinetics in water. *Journal of Hazardous Materials*, v. 186, p. 1645-1651, 2011.
- SILVA, M. S.; COCENZA, D.S.; **GRILLO, R.**; MELO, NATHALIE F. S.; TONELLO, P.S.; OLIVEIRA, L.C.; CASSIMIRO, D.L.; ROSA, A. H.; FRACETO, L.F. Paraquat-loaded alginate/chitosan nanoparticles: preparation, characterization and soil sorption studies. *Journal of Hazardous Materials*, v. 190, p. 366-374, 2011.
- LOBO, F.; AGUIRRE, C.L.; SILVA, M. S.; **GRILLO, R.** ; MELO, N. F. ; OLIVEIRA, L.K.; MORAIS, L.C.; CAMPOS, V.; ROSA, A. H.; FRACETO L.F. Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) microspheres loaded with atrazine herbicide: screening of conditions for preparation, physico-chemical characterization and in vitro release studies. *Polymer Bulletin*, v. 67, p. 479-495, 2011.
- **GRILLO, R.**; MELO, N. F. S.; LIMA, R. ; LOURENÇO, R.; ROSA, A. H.; FRACETO L.F. Characterization of atrazine-loaded biodegradable poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) microspheres. *Journal of Polymers and the Environment*, v. 18, p. 26-32, 2010.
- SILVA, M.S.; COCENZA, D.S.; DE MELO, N.F.S.; **GRILLO, R.** ; ROSA, A.H.; FRACETO, L.F. Nanopartículas de alginato como sistema de liberação para o herbicida clomazone. *Química Nova*, v. 33, p. 1868-1873, 2010.

Capítulo de livro publicado

- LOBO, F.; AGUIRRE, C.L.; SOUZA, P.M.S.; **GRILLO, R.**; MELO, N. F.; ROSA, A. H.; FRACETO, L.F. Preparation and characterization of polymeric microparticles used for controlled release of ametryn herbicide. *Herbicide / Book 3*. Rijeka: Intech, 2011.

Prêmios relacionados ao projeto

- **2011** ICBP2011 Junior Scientist Travel Award, Center for Theoretical Biological Physics, University of California, San Diego, CA, USA.
- **2010** Trabalho Premiado em 2º lugar, Categoria Pesquisador. Título: "Desenvolvimentos de sistemas de liberação para três herbicidas triazínicos". 2º Prêmio Agroambiental Monsanto, Monsanto, São Paulo, Brasil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação do sistema de transporte de elétrons do fotossistema II e da inibição da transferência pelos herbicidas triazínicos (modificado de HESS, 2000).	5
Figura 2. Estrutura química do herbicida atrazina.	6
Figura 3. Estrutura química do herbicida ametrina.	7
Figura 4. Estrutura química do herbicida simazina.	9
Figura 5. Representação esquemática de um sistema convencional para aplicação de pesticidas e representação de um sistema de liberação.	10
Figura 6. Representação esquemática de um corte transversal em: A) nanocápsulas poliméricas e B) nanoesferas poliméricas. Em verde encontra-se representado o composto bioativo (e suas interações com a nanoestrutura).	14
Figura 7. Estrutura química do polímero biodegradável poli(ϵ -caprolactona).	16
Figura 8. Representação estrutural do polímero quitosana.	18
Figura 9. Representação esquemática do ensaio de liberação <i>in vitro</i> utilizando membranas de celulose semipermeável.	28
Figura 10. Cromatogramas dos herbicidas triazínicos: A) Atrazina, B) Ametrina e C) Simazina, obtidos sob condições cromatográficas descritas no item 3.2.1.2.	38
Figura 11. Curvas de calibração analíticas para os herbicidas: A) Atrazina, B) Ametrina e C) Simazina, obtidas sob condições cromatográficas descritas no item 3.2.1.2	40
Figura 12. Perfil de cinética de liberação <i>in vitro</i> para o herbicida atrazina livre e associado às nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona), temperatura 25°C, determinação em triplicata (n=3).	43
Figura 13. Perfis de cinética de liberação <i>in vitro</i> para os herbicidas atrazina, ametrina e simazina em nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona), temperatura 25°C, determinação em triplicata (n=3).	45
Figura 14. Resultados obtidos da análise do modelo matemático de Korsmeyer-	49

Peppas: A) NC:ATZ, B) NC:AMT e C) NC:SIM.

- Figura 15.** Distribuição de tamanho das nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona) contendo herbicidas analisadas durante 90 dias, temperatura 25°C, determinação em triplicata (n=3). 51
- Figura 16.** Distribuição de tamanho de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) contendo simazina em função do tempo de estabilidade: A) Tempo inicial (zero dias) e B) Tempo final (90 dias), temperatura 25°C, determinação em triplicata (n=3). 52
- Figura 17.** Valores de polidispersão avaliados em função do tempo para nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) contendo herbicidas, determinação em triplicata (n=3). 53
- Figura 18.** Valores de potencial zeta para as formulações de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) contendo os herbicidas em função do tempo, determinação em triplicata (n=3). 56
- Figura 19.** Valores de pH das formulações de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) sem e contendo os herbicidas em função do tempo. 57
- Figura 20.** Variação do diâmetro hidrodinâmico e do índice de polidispersão de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) em diferentes pH. 59
- Figura 21.** Valores de potencial zeta para nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) em diferentes pHs. 60
- Figura 22.** Imagens de microscopia de força atômica das nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona): A) NC sem herbicida (2D), B) NC sem herbicida (3D), C) NC-PCL:AMT (2D) e D) NC-PCL:AMT (3D). 61
- Figura 23.** Micrografia de nanocápsula polimérica de poli(ϵ -caprolactona). 62
- Figura 24.** Espectro de absorção no infravermelho na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} para amostra de: A) ametrina; B) NC-PCL; C) NC-PCL:AMT. 64
- Figura 25.** Representação esquemática da conformação das cargas das nanocápsulas revestidas com o polímero quitosana. 65
- Figura 26.** Cinética de liberação *in vitro* das nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) revestidas com diferentes concentrações de quitosana, temperatura 25°C, 68

determinação em triplicata (n=3).

Figura 27. Resultados obtidos usando o modelo matemático de Korsmeyer-Peppas para as nanocápsulas revestidas contendo diferentes concentrações de quitosana. 70

Figura 28. Distribuição do tamanho das nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona) revestidas com diferentes concentrações de quitosana em função do tempo, temperatura de 25°C, determinação em triplicata (n=3). 72

Figura 29. Distribuição de tamanho das nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) revestidas com quitosana (8 $\mu\text{g/mL}$): A) tempo de zero dias, B) tempo de 90 dias. 73

Figura 30. Micrografia de nanocápsulas poliméricas de poli(ϵ -caprolactona) revestidas com a concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$ de quitosana, aumento de 30.000 vezes. 73

Figura 31. Distribuição de tamanho das nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) revestidas com quitosana (40 $\mu\text{g/mL}$): A) tempo de zero dias, B) tempo de 90 dias. 74

Figura 32. Valores de polidispersão avaliados em função do tempo para nanocápsulas contendo herbicidas, determinação em triplicata (n=3). 75

Figura 33. Potencial zeta (mV) das nanocápsulas revestidas com diferentes concentrações de quitosana em função do tempo (zero, 15, 30, 60 e 90 dias) contendo atrazina. 76

Figura 34. Valores de pH nas nanocápsulas revestidas em função do tempo (zero, 15, 30, 60 e 90 dias). 77

Figura 35. A) Dados de potencial zeta e tamanho das nanocápsulas revestidas contendo ATZ em função da concentração de quitosana e B) Representação esquemática das nanopartículas sendo revestidas por diferentes concentrações de quitosana. 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplos de sistemas de liberação modificada para herbicidas.	12
Tabela 2: Condições analíticas utilizadas para quantificação do herbicida ametrina em nanocápsulas poliméricas.	25
Tabela 3: Condições analíticas utilizadas para quantificação dos herbicidas atrazina e simazina em nanocápsulas poliméricas.	25
Tabela 4. Limite de detecção e limite de quantificação dos métodos analíticos para cada herbicida estudado.	40
Tabela 5: Valores de solubilidade e eficiência de encapsulação das nanocápsulas de PCL contendo os herbicidas atrazina, ametrina e simazina, determinação em triplicata (n=3).	41
Tabela 6: Valores de constantes de liberação (k), expoente de liberação (n) e coeficiente de correlação (r) obtido pelos melhores ajustes das curvas das cinéticas de liberação dos herbicidas associados às nanopartículas de PCL.	49
Tabela 7: Valores de diâmetro (tamanho) para as formulações de nanocápsulas contendo os herbicidas, determinação em triplicata (n=3).	51
Tabela 8: Valores de eficiência de encapsulação das nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) revestidas com diferentes concentrações de quitosana contendo atrazina.	66
Tabela 9: Valores de eficiência de liberação das formulações de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) revestidas com quitosana.	69
Tabela 10: Valores de constantes de liberação (k), expoente de liberação (n), coeficiente de correlação (r) obtido pelos melhores ajustes das curvas das cinéticas de liberação do herbicida associado às nanocápsulas revestidas de poli(ϵ -caprolactona).	70

LISTA DE ABREVIACÕES

CONAMA: Conselho Nacional de Meio Ambiente

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

EUA: Estados Unidos da América

ATZ: Atrazina

AMT: Ametrina

SIM: Simazina

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DP: Desvio padrão

IC: Inclinação da curva

NC: Nanocápsulas

NE: Nanoesferas

NP: Nanopartículas poliméricas

NLS: Nanopartículas lipídicas sólidas

PCL: Poli(ϵ -caprolactona)

PLA: poli(lactídeo)

PGA: poli(glicólico)

PLGA: poli(lático-co-glicólico)

PLL: Poli(L-lático)

PHV: Poli(hidroxicaprolato)

PHB: Poli(hidroxibutirato)

PHBV: Poli(hidroxibutirato-co-hidroxicaprolato)

NC-PCL: Formulações de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) sem herbicida

NC:ATZ: Formulações de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) contendo atrazina

NC:AMT: Formulações de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) contendo ametrina

NC:SIM: Formulações de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) contendo simazina

NC:ATZ:QUIT: Formulações de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) revestidas com quitosana contendo atrazina

AOT: Sódio bis(2-etil-hexil) sulfossuccinato

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Defensivos agrícolas	1
1.2 Herbicidas.....	2
1.2.1 Herbicidas Triazínicos	3
1.2.1.1 Atrazina	6
1.2.1.2 Ametrina	7
1.2.1.3 Simazina.....	8
1.3 Liberação modificada de herbicidas	9
1.3.1 Sistemas nanoparticulados poliméricos de liberação	14
1.3.2 Métodos de preparo das nanopartículas poliméricas	15
1.3.3 Nanopartículas poliméricas revestidas	17
1.3.3.1 Quitosana	18
2. OBJETIVOS	21
2.1 Gerais	21
2.2 Específicos	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1 Materiais	23
3.2 Metodologia.....	24
3.2.1 Desenvolvimento da metodologia analítica de quantificação dos herbicidas em nanocápsulas poliméricas	24
3.2.1.1 Princípio da técnica.....	24
3.2.1.2 Condições cromatográficas	24
3.2.1.3 Determinação das curvas de calibração analítica.....	25
3.2.2 Preparo das nanocápsulas de PCL	26
3.2.2.1 Preparo das nanocápsulas revestidas com quitosana.....	27
3.2.3 Medidas da eficiência de encapsulação	27
3.2.4 Cinética de liberação in vitro.....	28

3.2.4.1	Determinação da eficiência de liberação	29
3.2.4.2	Modelagem matemática dos ensaios de liberação	29
3.2.5	Avaliação da estabilidade das nanocápsulas	30
3.2.5.1	Diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão	31
3.2.5.1.1	Princípio da técnica.....	31
3.2.5.1.2	Determinação do diâmetro e índice de polidispersão.....	31
3.2.5.2	Potencial Zeta.....	32
3.2.5.2.1	Princípio da técnica.....	32
3.2.5.2.2	Determinação do potencial zeta	32
3.2.5.3	Medida de estabilidade química do polímero.....	33
3.2.6	Avaliação da morfologia e estrutura das nanopartículas	33
3.2.6.1	Microscopia de força atômica	33
3.2.6.1.1	Princípio da técnica.....	33
3.2.6.1.2	Preparo das amostras	34
3.2.6.2	Microscopia eletrônica de transmissão.....	34
3.2.6.2.1	Princípio da técnica.....	34
3.2.6.2.2	Preparo das amostras	35
3.2.7	Caracterização por espectroscopia na região do infravermelho.....	35
3.2.7.1	Princípio da técnica.....	35
3.2.7.2	Determinação dos espectros de infravermelho	36
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1	Desenvolvimento de metodologia analítica	37
4.1.1	Obtenção dos cromatogramas dos herbicidas	37
4.1.2	Construção das curvas de calibração analítica dos herbicidas	38
4.2	Eficiência de encapsulação	40
4.3	Cinética de liberação in vitro.....	42
4.3.1	Modelo matemático para avaliação do mecanismo de liberação dos herbicidas a partir de nanocápsulas poliméricas	47
4.4	Avaliação da estabilidade físico-química das nanocápsulas	50

4.4.1 Tamanho e índice de polidispersão	51
4.4.2 Potencial Zeta.....	55
4.4.3 Medida de estabilidade química do polímero	57
4.4.3.1 Comportamento das NC de PCL em diferentes pHs	59
4.5 Avaliação da morfologia e estrutura das nanocápsulas poliméricas	60
4.5.1 Microscopia de força atômica	60
4.5.2 Microscopia eletrônica de transmissão.....	62
4.6 Caracterização por espectroscopia na região do infravermelho	63
4.7 Nanopartículas de PCL revestidas com quitosana contendo atrazina	65
4.7.1 Eficiência de encapsulação de atrazina em nanocápsulas revestidas	66
4.7.2 Cinética de liberação in vitro.....	67
4.7.2.1 Modelos matemáticos para avaliação do mecanismo de liberação	69
4.7.3 Avaliação da estabilidade físico-química das NC revestidas.....	71
5. CONCLUSÕES	81
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

RESUMO

Muitas das novas tecnologias desenvolvidas atualmente envolvem a nanobiotecnologia, dentre elas, os sistemas carreadores nanoestruturados poliméricos. Os sistemas nanoestruturados poliméricos (SNP) agem como compartimentos transportadores de substâncias bioativas e apresentam tamanho inferior a 1 μm . Estes sistemas têm a capacidade de alterar as propriedades físico-químicas dos compostos a eles incorporados, levando a algumas vantagens. Para herbicidas estes sistemas podem ser responsáveis pela redução na quantidade de substância química necessária para o controle de pragas, diminuição no risco de poluição ambiental, redução na quantidade de energia gasta, uma vez que se reduz o número de aplicações necessárias comparadas às formulações convencionais e aumento na segurança das pessoas responsáveis pela aplicação do produto no campo. Neste trabalho pretende-se introduzir esta nova abordagem tecnológica de sistemas de liberação modificada para herbicidas triazínicos, preparando e caracterizando dois tipos de nanocápsulas obtidas do polímero biodegradável poli(ϵ -caprolactona) (PCL). Os herbicidas triazínicos escolhidos foram ametrina, atrazina e simazina devido a sua ampla utilização em plantações de cana-de-açúcar e milho no Brasil. Em uma primeira etapa deste projeto foram preparadas nanocápsulas pelo método deposição interfacial de polímero pré-formado e analisadas quanto sua eficiência de encapsulação, perfil de cinética de liberação, estabilidade físico-química e morfologia. A eficiência de encapsulação dos herbicidas nas nanocápsulas de PCL foi elevada, apresentando valores compreendidos entre 98% e 84% (m/m). O perfil de cinética de liberação do herbicida livre foi mais rápido, quando comparado com o herbicida associado às nanocápsulas. O mecanismo responsável pela liberação dos herbicidas neste sistema foi dado pelo processo de relaxamento das cadeias poliméricas. As suspensões coloidais de nanocápsulas apresentaram tamanho médio entre 200-300 nm, polidispersão baixa e valores de potencial zeta menor que -25 mV. As análises microscópicas mostraram que as nanocápsulas apresentaram-se esféricas, densas e sem agregados. Os espectros de infravermelho das nanocápsulas de PCL contendo herbicidas não apresentaram

bandas relacionadas aos herbicidas, evidenciando uma interação entre o composto bioativo e a nanopartícula. Na segunda etapa deste projeto foram preparadas nanocápsulas de PCL revestidas com diferentes concentrações de quitosana e encapsulou-se o herbicida atrazina ao sistema. A taxa de encapsulação, o perfil de cinética de liberação e a estabilidade físico-química das formulações também foram avaliados e observou valores de encapsulação compreendido entre 84% e 64% (m/m). O perfil de cinética de liberação do herbicida também foi alterado quando associado às nanocápsulas revestidas e o mecanismo de liberação foi dado pelo processo de difusão e relaxamento das cadeias poliméricas. A estabilidade das formulações foi alterada conforme mudança na concentração de quitosana. Portanto considerando alguns destes resultados e pensando na larga utilização de herbicidas no mundo, o seu uso na agricultura na forma associada a sistemas carreadores de liberação modificada pode ser interessante e bastante promissor do ponto de vista ecológico como econômico.

Palavras-chave: Liberação modificada, nanocápsulas, nanocápsulas revestidas, quitosana, poli(ϵ -caprolactona), herbicidas triazínicos, ametrina, atrazina, simazina, química ambiental.

ABSTRACT

Many of the new technologies developed today involve nanobiotechnology, among them, nanostructured polymeric carrier systems. Nanostructured polymeric systems (PNS) compartments act as carriers of bioactive substances and have size less than 1 micrometers. These systems have the ability to change the physicochemical properties of the compounds incorporated into them, leading to numerous advantages. For these systems herbicides may be responsible for the reduction in the amount of chemical needed for pest control, decreased risk of environmental pollution, reduction in the amount of energy expended, since it reduces the number of applications required compared to conventional formulations and increase the safety of persons responsible for applying the product on the field. This study intended to introduce this new technology approach for sustained release systems triazine herbicides, preparing and characterizing nanocapsules produced with poly (ϵ -caprolactone) (PCL). The herbicides were chosen ametryn, atrazine and simazine because of its wide use in sugar cane and corn crops in Brazil. In a first stage of this study was prepared nanocapsules by interfacial polymer deposition method performed and analyzed for their encapsulation efficiency, release kinetics profile, physical and chemical stability and morphology. The encapsulation efficiency of herbicides in PCL nanocapsules was good, with values between 98% and 84%. The kinetic profile of free herbicide release was modified compared with the herbicide associated with nanocapsules. The mechanism responsible for the release of herbicides in this system was given by the process of relaxation of polymer chains. The colloidal suspensions of nanocapsules present a mean size between 200-300 nm, low polydispersity and zeta potential values lower than -25 mV. The microscopic analysis showed that the nanocapsules were spherical and didn't present aggregates. The infrared spectra of nanocapsules-PCL containing herbicides showed no bands related to herbicides, showing an interaction between the nanoparticle and the bioactive compound. In the second stage of this study was prepared PCL nanocapsules coated with different concentrations of chitosan and encapsulated to the herbicide atrazine to the system. The rate of encapsulation, the profile of release kinetics

and physical and chemical stability of the formulations were also evaluated and observed values of encapsulation between 84% and 64%. The profile of release kinetics of the herbicide was also altered when associated with nanocapsules coated and release mechanism was given by the process of diffusion and relaxation of polymer chains. The stability of the formulations was changed according to change in the concentration of chitosan used. So considering some of these results and considering the wide use of herbicides in the world, its use in agriculture as the associated systems for the controlled release carrier can be interesting and very promising in terms of ecological and economical.

Keywords: modified release, poly(epsilon-caprolactone), triazine herbicides, nanocapsules, coated nanocapsules, chitosan, ametryn, atrazine, simazina, environmental chemistry.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Defensivos agrícolas

As plantas constituem a principal fonte de alimento do mundo e devido ao aumento crescente da população, tem ocorrido uma tendência nos últimos anos para maximizar a produção agrícola (PLIMMER *et al.*, 2001; SOPEÑA *et al.*, 2009). Sabe-se que a escassez de alimentos não só leva a fome e a desnutrição, mas também a instabilidade social, política e econômica de uma região (KENAWY e SHERRINGTON, 1992). Entretanto muitos são os esforços atualmente para aumentar a produtividade agrícola, a partir do desenvolvimento de culturas de alto rendimento, que engloba a utilização de fertilizantes, defensivos agrícolas e máquinas de alta tecnologia.

Os defensivos agrícolas, também chamados de agrotóxicos, pesticidas, praguicidas e biocidas, são substâncias químicas ou misturas, naturais ou sintéticas utilizadas para eliminar pragas da lavoura, como fungos, insetos, plantas, bactérias e vírus (MOGUL *et al.*, 1996). Estes compostos têm sido amplamente encontrados em recursos hídricos superficiais e subterrâneos do mundo, devido ao amplo uso em áreas agrícolas e urbanas. Trata-se de uma variedade de moléculas com diferentes propriedades que lhes conferem diferentes graus de persistência ambiental, mobilidade e potenciais tóxico, carcinogênico, mutagênico e teratogênico ou algum efeito endócrino a diversos organismos não-alvos, inclusive o ser humano (ARMAS *et al.*, 2007).

No Brasil alguns fatores colaboram para a preocupação com o uso de defensivos agrícolas, dentre os quais, poderiam ser citados o uso indiscriminado dos mesmos e ausência de uma legislação e fiscalização mais eficientes quando se trata de contaminação de recursos naturais por estes compostos. No Brasil existem dois órgãos que possuem definições para qualidade de águas: o Ministério da Saúde e o Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA). A Portaria n° 518, de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde, é responsável pelo padrão de potabilidade da água para consumo humano e a Resolução CONAMA n° 357, de março de 2005, estabelece níveis de qualidade para águas ambientais, avaliados por parâmetros e

indicadores específicos, de modo a assegurar o uso das águas doce, salgada e salobra.

A intensificação do uso de defensivos agrícolas nestas últimas décadas, e a ocorrência de efeitos danosos desses agentes químicos sobre o ambiente e o homem fizeram com que vários países regulamentassem seu uso e sua produção com o objetivo de minimizar as conseqüências ao ambiente. Entretanto, o Brasil é um dos três maiores países consumidores mundiais de defensivos agrícolas. Segundo o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) entre 2000 e 2005, houve um leve crescimento na média de consumo destes produtos, de 3,19 kg/ha para 3,23 kg/ha. Em 2009, foram comercializadas 725 mil toneladas de produtos formulados, dentre os defensivos agrícolas utilizados, os herbicidas foram os mais usados, com 59% (429 toneladas), seguido por inseticidas e acaricidas com 21% (150 toneladas), fungicidas com 12% (90 toneladas) e outros com 8% (55 toneladas) (MENTEN *et al.*, 2010). Desta forma, os defensivos agrícolas, principalmente os herbicidas, são importantes compostos para serem levados em consideração, visando à sustentabilidade econômica, ambiental e social do agronegócio brasileiro.

1.2 Herbicidas

Os herbicidas são substâncias químicas utilizadas na agricultura para o controle de ervas classificadas como daninhas e possui como vantagem rapidez de ação, custo reduzido, efeito residual e não revolvimento do solo. A presença de ervas daninhas no cultivo pode causar diversos problemas para a produção agrícola entre eles:

- Impedir ou alterar a disponibilidade de nutriente, água e luz das plantas cultivadas;
- Liberar substâncias através das raízes e folhas, que são tóxicas para as culturas, uma vez que inibem ou dificultam a germinação, crescimento ou desenvolvimento das plantas nas proximidades;
- Criar um *habitat* favorável para a proliferação de outras pragas (artrópodes e/ou acari), agindo como um hospedeiro;

– Impedir o processo normal de colheita podendo contaminar a produção obtida (LABRADA *et al.* 1996; JOEL *et al.*, 2000; WARE E WHITACRE 2004; CAL *et al.*, 2005; SOPEÑA *et al.*, 2009).

Dados estatísticos mostram que cerca de 20-30% do custo de produção de uma lavoura se deve aos gastos no controle das plantas daninhas (LORENZI, 1994) e assim, as perdas agrícolas com este tipo de praga podem ter um profundo efeito sobre a economia mundial em termos de redução da produtividade, elevação do custo de produção e a baixa qualidade do produto colhido (COBB, 1992), justificando assim a necessidade do uso controlado destes produtos.

Os herbicidas podem ser aplicados ao solo em três momentos distintos, antes do plantio da cultura (pré-plantio), antes de emergência (pré-emergência) e após a emergência (pós-emergência) (MOGUL *et al.*, 1996) e podem ser classificados, quanto ao seu mecanismo de ação (inibidores da fotossíntese, inibidores da divisão celular, inibidores de lipídeos, inibidores de carotenóides, etc), quanto a sua estrutura química (triazínicos, piridina, amônio quaternário, tiocarbamatos, etc), seletividade, entre outros (COBB *et al.*, 2000; MARCHI *et al.*, 2008). Os herbicidas seletivos são utilizados para matar apenas ervas daninhas, sem prejudicar a cultura de um modo geral, já os herbicidas não seletivos tem o propósito de matar toda a vegetação, deixando assim, o campo pronto para um novo plantio. Embora existam diversas classificações nenhuma delas é completamente adequada ou definitiva, porém cabe ao agricultor entendê-las a fim de minimizar custos no plantio e prevenir o aparecimento de plantas resistentes a herbicidas (OLIVEIRA *et al.*, 2001).

Dentre as classes de herbicidas utilizados na agricultura, os triazínicos são os responsáveis por 30% da produção mundial e conseqüentemente são os compostos mais encontrados nas águas superficiais e subterrâneas, sendo um importante objeto de estudo (RODRIGUES e ALMEIDA, 2005).

1.2.1 Herbicidas Triazínicos

Os compostos químicos triazínicos são um grupo de herbicidas análogos muito utilizados como herbicidas no controle pré e pós-emergente de plantas daninhas nas mais variadas culturas, tais como, milho, cana-de-açúcar, sorgo, café,

banana, abacaxi, entre outras (COUTINHO *et al.*, 2005; BRECKENRIDGE *et al.*, 2010). Os herbicidas triazínicos são derivados das s-triazinas, fabricadas pela reação do cloreto cianúrico com aminas apropriadas. O ácido cianúrico, fabricados a partir do cloro e ácido cianídrico, contém três átomos de cloro, que pode ser substituído por etapas. Dois dos átomos de cloro são muito reativos e reagem com as aminas sob condições controladas para dar uma variedade de herbicidas triazínicos ativos (LEBARON *et al.*, 2008) O átomo de cloro pode ser mantido ou substituído por um grupo metóxi ou tiometil. Existem muitas variações possíveis, mas cerca de 14 compostos estão atualmente em uso comercial. Dentre eles, destacam-se a atrazina, ametrina e simazina, que foram registrados como substâncias inibidoras do crescimento de plantas daninhas no ano de 1955 (LEBARON *et al.*, 2008; BRECKENRIDGE *et al.*, 2010).

Estes herbicidas agem na inibição da fotossíntese, em particular ao nível do fotossistema II (MARCHI *et al.*, 2008). Muitos pigmentos, proteínas e outras substâncias químicas envolvidas na reação da fotossíntese estão localizadas nos cloroplastos. Em condições normais, sem a interferência de inibidores fotossintéticos, durante a fase luminosa da fotossíntese, a energia luminosa (EL) capturada pelos pigmentos (clorofila e carotenóides) é transferida para um “centro de reação” especial (P680), gerando elétrons no estado excitado, sendo estes transferidos para a feofitina (Feo) e em seguida para uma molécula de plastoquinona presa a uma membrana do cloroplasto (Qa), ligada a uma proteína (D1). A molécula da plastoquinona (Qa) transfere elétrons para outra plastoquinona (Qb) que recebe dois íons de hidrogênio do estroma, assim a plastohidroquinona (PQH₂) é liberada dentro da membrana e é substituída por outra molécula de plastoquinona (PQ), e assim ocorre a transferência de elétrons entre os fotossistemas II (P680) e I (P700). Os herbicidas inibidores do fotossistema II (HERB) se ligam à proteína D1 no sítio onde se prende a plastoquinona (Qb) e competem pelo sitio da proteína, ocasionando a saída da plastoquinona e interrompendo o fluxo de elétrons entre os fotossistemas. Embora a fotossíntese seja inibida, as plantas suscetíveis não morrem simplesmente de fome. O fluxo de elétrons fica interrompido e as moléculas de clorofila ficam com carga energética acentuada, porque os elétrons não são armazenados como energia química (ATP e NADPH), formando assim radicais livres

e então as plantas morrem por causa da peroxidação de lipídeos nas membranas, sofrendo clorose que conduz à necrose dos tecidos (SENE *et al.*, 2010; MARCHI *et al.*, 2008).

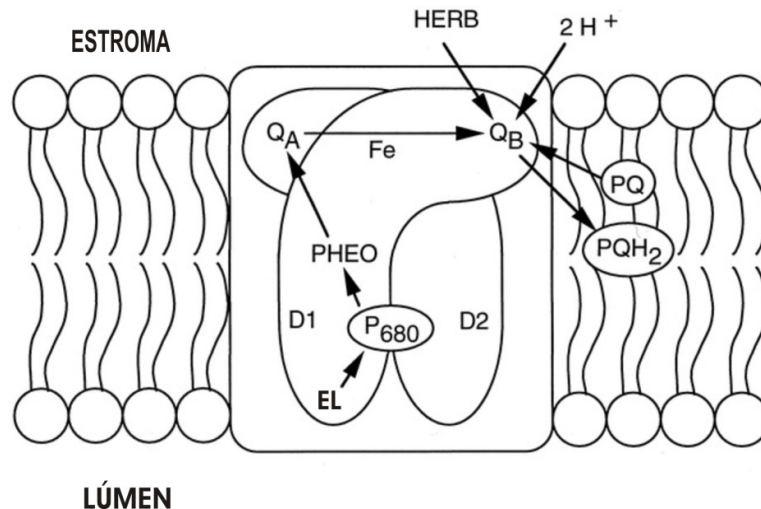


Figura 1. Representação do sistema de transporte de elétrons do fotossistema II e da inibição da transferência pelos herbicidas triazínicos (modificado de HESS, 2000).

Os herbicidas triazínicos são, no mundo todo, os herbicidas mais presentes nas águas superficiais e subterrâneas, vindo a representar 80,7% dos contaminantes encontrados em amostras de água superficial e subterrânea analisadas na Alemanha, sendo a atrazina a responsável por 59,7% dos casos (BEITZ *et al.*, 1994). Um estudo feito por ARMAS *et al.*, 2007 mostrou concentrações de herbicidas triazínicos (ametrina, atrazina e simazina) acima do padrão de potabilidade brasileira na bacia do Rio Corumbataí, localizado no interior do estado de São Paulo. A presença destes herbicidas concomitantemente a vários pontos da bacia mostrou uma carga residual de 2 até 13 vezes maior que o limite máximos de 0,5 µg/L, conforme estipulado pela Comunidade Européia (ARMAS *et al.*, 2007). Nos EUA também tem sido encontrado níveis altos destes compostos também em águas de lençol freático (UEPA *et al.*, 2006).

Embora esta classe de herbicidas tenha sido proibida em muitos países, a detecção destes compostos ainda tem sido freqüente (KODAMA *et al.*, 2001). Esta grande ocorrência das triazinas em diversos compartimentos ambientais justifica-se em virtude de sua elevada persistência em solos, hidrólise lenta, solubilidade baixa

em água e adsorção a matéria orgânica e argila (COLLA *et al.*, 2008, PLAKAS e KARABELAS *et al.*, 2009).

1.2.1.1 Atrazina (ATZ)

A atrazina (2-cloro-4-etilamina-6-isopropilamina-s-triazina) é um herbicida da classe dos triazínicos, apresentada como um sólido cristalino branco, com estrutura química representada por um anel triazínico substituído com cloro, etilamina e isopropilamina (Figura 2), que a torna recalcitrante para a degradação biológica no ambiente (COLLA *et al.*, 2008; BRECKENRIDGE *et al.*, 2010).

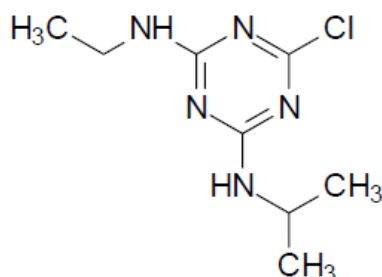


Figura 2. Estrutura química do herbicida atrazina.

Nesse sentido a atrazina é utilizada mundialmente para o controle pré e pós de plantas invasoras de folhas largas e gramíneas na agricultura, especialmente no cultivo de milho, sorgo e cana-de-açúcar (RIBEIRO *et al.*, 2005; RODRIGUES e ALMEIDA, 1998; ROMAN *et al.*, 2007).

A atrazina representa 12% (mais de 40.000 toneladas/ano) de todos os herbicidas empregados nos Estados Unidos em culturas de milho, sorgo, cana-de-açúcar e abacaxi. No Brasil, principalmente nas culturas de cana-de-açúcar e milho, são utilizadas elevadas quantidades deste herbicida (LANCHOTE, 1997).

Este composto bioativo é um contaminante potencial da água em virtude de características como elevada persistência em solos, hidrólise lenta, baixa pressão de vapor, solubilidade baixa em água, adsorção à matéria orgânica e argila e alta solubilidade em solventes orgânicos (HALLBERG, 1989). A baixa pressão de vapor favorece o escoamento e movimentação na fase aquosa do solo, e através de sua característica como herbicida lipofílico, tem capacidade de adsorção pela matéria

orgânica, argila e tecidos gordurosos (JACOMINI, 2002). A meia-vida da atrazina pode variar de 2 a 300 dias em água e de 20 a 385 dias em solo. Alta salinidade e pH muito ácido são alguns fatores que favorecem a degradação da atrazina na água. Para o solo, os fatores que aceleram sua degradação são: alta umidade, temperaturas elevadas, alta porcentagem de matéria orgânica, alta densidade microbiana, pH ácido, alta incidência de raios ultravioleta e disponibilidade nas camadas superficiais do solo (EISLER, 1989).

Uma parte da atrazina é degradada no ambiente, através de processos químicos e principalmente microbiológicos (SKIPPER *et al.*, 1967) e outra parte escoar para os mananciais juntamente com a água das chuvas ou infiltra-se no solo. Vários são os autores que se preocupam em estudar os efeitos da atrazina nos corpos de água, sedimento, fauna e flora devido à contaminação provocada pelo uso indiscriminado (BELLUCK *et al.*, 1991, SENESI *et al.*, 1992; JACOMINI, 2002; COLLA *et al.*, 2008).

1.2.1.2 Ametrina (AMT)

A ametrina (Figura 3) é um herbicida pertencente à família das s-triazinas onde os substituintes são um grupo tiometil, um grupo etil e um grupo isopropil, formando a estrutura que leva o nome de (2-etilamina-4-isopropilamina-6-metiltio-s-2,4,6-triazina). A ametrina é um herbicida sistêmico que é registrado no Brasil para as culturas de algodão, citros, milho e cana-de-açúcar (VIVIAN *et al.*, 2007; BRECKENRIDGE *et al.*, 2010), sendo seu uso destacado na cultura de cana-de-açúcar.

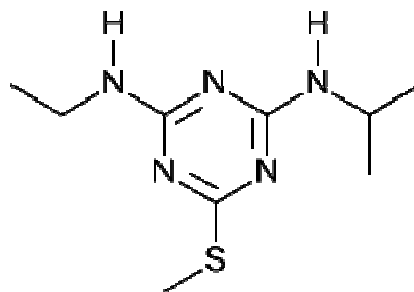


Figura 3. Estrutura química do herbicida ametrina.

Sendo uma molécula razoavelmente estável, este herbicida apresenta uma meia-vida de 20 a 100 dias, é muito móvel no ambiente e ainda altamente persistente nos diversos compartimentos ambientais (COSTA, 1992), podendo persistir por até seis meses no solo (RODRIGUES e ALMEIDA, 1995). Entretanto, estes autores sugerem que esta classificação pode variar conforme o tipo de solo e as condições climáticas encontrados no local da aplicação. Seus resíduos e metabólitos têm sido encontrados em águas subterrâneas mesmo depois de longos períodos após sua aplicação (CABRAL *et al.*, 2003). A ametrina é tóxica e pode trazer sérios prejuízos à saúde e ao ambiente.

Entre os estudos realizados com águas superficiais e subterrâneas, a ametrina foi detectada em seis estados dos Estados Unidos, em pouquíssimas amostras de águas superficiais e em 4% das amostras de águas subterrâneas (EXTOXNET, 2011). Já segundo PFEUFFER & RAND (2004), o monitoramento de pesticidas realizado entre 1992 e 2001 no sul da Flórida revelou que o herbicida ametrina foi um dos compostos mais comumente encontrados em águas superficiais. MITCHELL *et al.*, 2005 também identificaram resíduos de ametrina (0,3 µg/L) e outros quatro herbicidas em águas de rios pertencentes à região de Mackay Whitsunday, na Austrália.

No Brasil, LAABS *et al.*, 2002 estudaram a contaminação da região nordeste do Pantanal mato-grossense por pesticidas utilizados na agricultura. Foram detectados resíduos de ametrina na maioria das amostras coletadas em águas de superfície, embora em baixa concentração. Entretanto, em amostras de sedimentos, as concentrações foram superiores a 4,5 µg/kg. A elevada frequência de detecção de ametrina, juntamente com sua alta concentração em algumas amostras, foi atribuída, conforme citado, ao intenso cultivo de cana-de-açúcar no nordeste do pantanal (VIVIAN *et al.*, 2007).

1.2.1.3 Simazina (SIM)

A simazina (2-cloro-4-6-bis-s-etilamino-triazina) é um herbicida triazínico seletivo, utilizado para o controle de plantas daninhas de folhas largas e gramíneas anuais, como plantações de milho, soja, amendoim, laranja, batata, alho e campos

de amoreira (Figura 4). A simazina tem se acumulado extensivamente no ambiente em virtude de seu uso por mais de 40 anos, devido a sua alta hidrofobicidade e de sua estrutura dificilmente biodegradável (KODAMA *et al.*, 2001; BRECKENRIDGE *et al.*, 2010). Dentre os herbicidas triazínicos, a simazina é classe que possui menor potencial tóxico contra animais e ao ser humano (EXTOXNET, 2011).

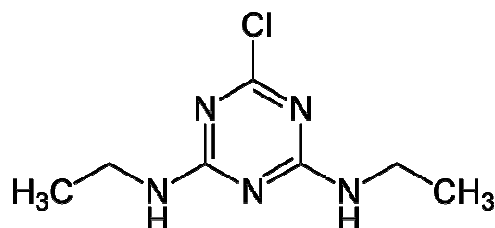


Figura 4. Estrutura química do herbicida simazina.

As taxas mais elevadas do composto é usado para controle de plantas daninhas não seletivos em áreas industriais. Antes de 1992, a simazina foi usada para controlar ervas daninhas submersas e algas em grandes aquários, tanques de cultivo, piscicultura, piscinas, lagos ornamentais e torres de resfriamento. A simazina é disponível em pó molhável, grânulos dispersíveis em água, líquidos e formulações granulares (KODAMA *et al.*, 2001, EXTOXNET, 2011).

1.3 Liberação modificada de herbicidas

A chamada “Revolução Verde” entre as décadas de 60 e 70, fez com que houvesse um grande estímulo na utilização de agroquímicos no Brasil e desta forma, devido à vasta utilização indiscriminada destes, atualmente muitas tentativas de minimização dos riscos sociais, ambientais e econômicos pelo uso de defensivos agrícolas tem sido discutidas e normatizadas (ALVES FILHO, 2002).

Pesquisas têm mostrado que embora a utilização dos herbicidas na agricultura ainda seja bastante alta, sabe-se que dependendo do método de aplicação e das condições climáticas, cerca de 90% dos herbicidas convencionalmente aplicados no campo nunca encontram seu objetivo principal, que

é justamente, produzir a resposta biológica desejada no momento exato e nas quantidades específicas requeridas. Estes problemas ocorrem devido a baixa especificidade destes compostos com a planta e também pela baixa estabilidade química que estas moléculas possuem (CAL *et al.*, 2005; VILLAVERDE *et al.*, 2006; GINÉS, *et al.*, 1996; PERÉZ-MARTINÉZ, *et al.*, 1998; LEZCANO *et al.*, 2002; MANOLIKAR e SAWANT, 2003). Nos últimos anos a tecnologia de liberação modificada emergiu como uma importante alternativa que promete resolver os problemas que acompanham o uso de alguns herbicidas, visando o aumento de sua eficiência, minimização de impactos ambientais e garantia do desenvolvimento sustentável (MOGUL *et al.*, 1996).

O termo liberação modificada é utilizado para sistemas que possuem a capacidade de liberar de forma contínua e prolongada uma determinada substância. Este sistema tem sido extensivamente aplicado na indústria farmacêutica (MORAHUERTAS *et al.*, 2010; SINHA *et al.*, 2004; GRILLO *et al.*, 2010a; MORAES *et al.*, 2010; TOFOLI *et al.*, 2011; FELIPPOTTI *et al.*, 2011; MELO *et al.*, 2011) e alimentícia (KOONTZ, 2006; LAKKIS, 2007; LIMA *et al.*, 2010), mas também já existem relatos de utilização visando aplicações agrícolas (EL BAHRI e TAVERDET, 2005; EL BAHRI e TAVERDET, 2007; PÉREZ DE LUQUE *et al.*, 2009; SOPEÑA *et al.*, 2009; GRILLO *et al.*, 2010b, FERNÁNDEZ-PÉREZ *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2010; SINGH *et al.*, 2010; LOBO *et al.*, 2011; FERNÁNDEZ-PÉREZ *et al.*, 2011; DUBEY *et al.*, 2011; GRILLO *et al.* 2011; SILVA *et al.*, 2011).

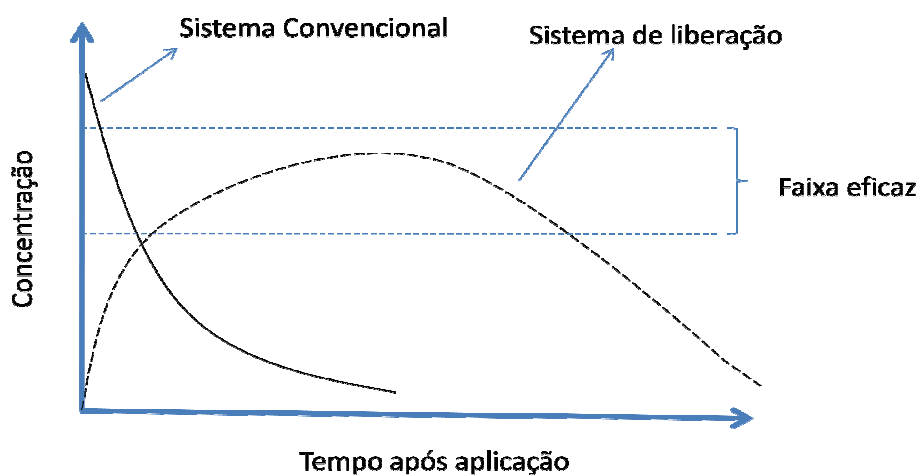


Figura 5. Representação esquemática de um sistema convencional para aplicação de herbicidas e representação de um sistema de liberação.

Observa-se na Figura 5 que no sistema convencional as várias aplicações do herbicida podem fazer com que se ultrapasse a concentração máxima segura do composto, enquanto para a formulação de liberação modificada, isto pode não ser observado. Além deste fator citado acima, os sistemas de liberação modificada podem levar a diversas vantagens como a:

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

Um variado grupo de materiais tem sido desenvolvido como sistemas de liberação modificada para defensivos agrícolas, como por exemplo, as ciclodextrinas (MANOLIKAR *et al.*, 2003; VILLAVARDE *et al.* 2006; GUO *et al.*, 2011), as argilas (FERNÁNDEZ-PÉREZ *et al.* 2004; TSAI e LAI, 2006; MAQUEDA *et al.* 2008; CORNEJO *et al.*, 2008), a sílica (BARIK *et al.* 2008), a lignina (GARRIDO-HERRERA *et al.* 2009), as micropartículas poliméricas (EL BAHRI e TAVERDET, 2005; EL BAHRI e TAVERDET, 2007; SUAVE *et al.* 2010; GRILLO *et al.* 2010b, GRILLO *et al.*, 2011) e as nanopartículas (SILVA *et al.* 2010; SILVA *et al.*, 2011).

A tabela 1 apresenta alguns exemplos de aplicação de sistemas de liberação para herbicidas encontrados na literatura para diferentes carreadores.

Tabela 1. Exemplos de sistemas de liberação modificada para herbicidas.

Sistemas de liberação	Herbicida	Principais resultados	Referência
Argilas e associações com outros materiais	Hexazinona	- Liberação lenta e redução da lixiviação do herbicida em coluna de solo comparado a formulação comercial.	CELIS <i>et al.</i> , 2002
	Metribuzina	- Redução na liberação do herbicida no solo por um período de 25 a 104 dias.	MAQUEDA <i>et al.</i> , 2008
	Alachlor	- Eficiência de encapsulação da orde de 40 % e redução de 1,6 vezes na liberação do herbicida comparado com a formulação comercial.	SÁNCHEZ-VERDEJO <i>et al.</i> , 2008
	Acetochlor	- A liberação do ativo foi modificada, sendo o mecanismo determinado por processo de difusão.	Li <i>et al.</i> , 2008
	Atrazina	- Liberação do ativo foi lenta associado a argilas ácidas por um período entre 29 e 36 dias, sendo o mecanismo de liberação determinado por processos de difusão.	FERNÁNDEZ-PÉREZ <i>et al.</i> , 2004
	Atrazina	- Foi observado aumento da atividade do herbicida e diminuição na lixiviação do solo, ocasionando um maior controle das ervas daninhas.	CEA <i>et al.</i> , 2010
Xerogéis de materiais gerais	Atrazina	- Eficiência de encapsulação deste ativo da ordem de 60%, apresentando menor afinidade pelo solo, ou seja, diminuição na sorção do herbicida	ÁVILA <i>et al.</i> , 2009
	Paraquat	- A liberação do herbicida foi modificada e sustentada durante 46 dias e a capacidade de liberação do paraquat foi dependente da expansão da matriz polimérica e da densidade do polímero.	AOUADA <i>et al.</i> , 2010
Materiais celulósicos e lignina	Alachlor	- Foi observada uma elevada associação do ativo e por conseqüência um aumento da atividade herbicida, observando-se uma ação prolongada deste ativo.	SOPEÑA <i>et al.</i> , 2007

Materiais celulósicos e lignina	Cloridazona	- Valores de eficiência de encapsulação acima de 94% para todas as formulações e observou-se a liberação do bioativo dependia do tamanho dos granulados.	FERNÁNDEZ-PÉREZ <i>et al.</i> , 2011
Micropartículas Poliméricas	Ametrina	- Eficiência de encapsulação do ativo por volta de 40%, sendo sua liberação lenta e determinada por processos de relaxação de cadeias poliméricas e difusão do ativo das partículas.	GRILLO <i>et al.</i> , 2011
	Atrazina	- Eficiência de encapsulação do ativo por volta de 35%, apresentando uma liberação bastante lenta.	GRILLO <i>et al.</i> , 2010
Nanopartículas Poliméricas	Paraquat	- Eficiência de encapsulação do ativo foi da ordem de 75%, apresentando perfil de liberação modificada sendo a sorção do herbicida encapsulado nas nanopartículas de alginato/quitosana diminuída devido a associação com as partículas.	SILVA <i>et al.</i> , 2011
	Clomazone	- Eficiência de encapsulação do ativo ficou na faixa de 60% a 90% sendo o perfil de liberação deste modificado e o mecanismo de liberação segue um processo de difusão não fickiano.	SILVA <i>et al.</i> , 2010
Minerais	Terbutilazina	- O complexo retardou a liberação do herbicida em água ocasionando redução na lixiviação do solo após a complexação do ativo complexado.	BRUNA <i>et al.</i> , 2008

Dentre os diferentes sistemas de liberação citados na tabela 1, o sistema nanoparticulado polimérico parece ser um dos sistemas mais promissores, uma vez que estas nanopartículas podem ser biodegradáveis (devido ao tipo de polímero que pode ser usado no preparo) e apresentam boa estabilidade física, química e biológica. As nanopartículas poliméricas apresentam boa reprodutividade de preparo, além de serem aplicáveis a uma ampla variedade de substâncias, sempre visando melhorar suas propriedades químicas e minizar os impactos ambientais

(PICOS *et al.*, 2000; SINHA *et al.*, 2004; DURÁN *et al.*, 2006).

1.3.1 Sistemas nanoparticulados poliméricos de liberação

Nanopartículas são frequentemente definidas como partículas coloidais sólidas que apresentam tamanho entre 10-1000 nm. O termo nanopartícula polimérica (NP) é um termo geral que abrange as nanoesferas (NE) e nanocápsulas (NC) (RAO E GECKELER, 2011). Nanoesferas são partículas constituídas de uma matriz polimérica densa, cuja massa interna é sólida e possibilita a adsorção de moléculas na sua superfície ou encapsuladas em seu interior. Em geral estas partículas são esféricas, mas também podem ser descritas como forma não esférica na literatura (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010; VAUTHIER *et al.*, 2000). As nanocápsulas são sistemas vesiculares que agem como um reservatório, em que substâncias bioativas são armazenadas no seu interior líquido (água ou óleo) ficando rodeadas por um material sólido (COUVREUR *et al.*, 1995). A figura 6 apresenta um esquema que representa os dois tipos de nanopartículas poliméricas.

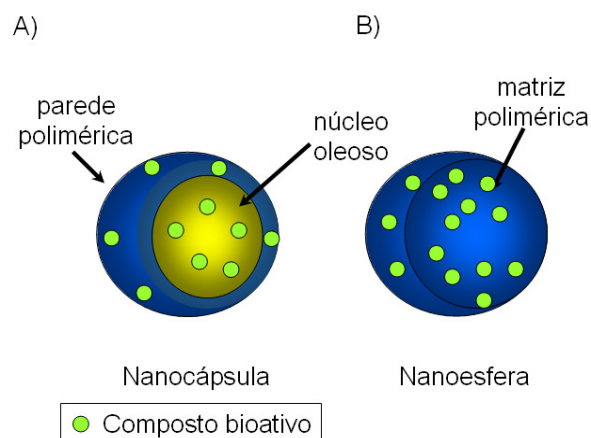


Figura 6. Representação esquemática de um corte transversal em: A) nanocápsulas poliméricas e B) nanoesferas poliméricas. Em verde encontra-se representado o composto bioativo (e suas interações com a nanoestrutura).

Estes sistemas nanoparticulados estão revolucionando o uso de diversos medicamentos na área da saúde (MORAES *et al.* 2010; GRILLO *et al.*, 2010a; MELO *et al.*, 2011; ALVES *et al.*, 2011; MORAES *et al.*, 2011) e de diversos pesticidas,

herbicidas e fertilizantes na agricultura (ROMERO-CANO *et al.*, 2002; PÉREZ-DE-LUQUE *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2010). O uso destes sistemas para defensivos agrícolas permite a liberação modificada do bioativo, além de proteger o composto contra agentes externos, aumentar sua solubilidade em água e promover uma maior absorção pelo vegetal (PÉREZ-DE-LUQUE *et al.*, 2009).

1.3.2 Métodos de preparo das nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas podem ser preparadas a partir de polímeros pré-formados ou pela polimerização *in situ* de monômeros (SOPPIMATH *et al.*, 2001; REIS *et al.*, 2006; MORALES, 2007). A escolha do método de preparo das nanopartículas é feita com base em vários fatores, compreendendo o tipo de polímero usado, local da utilização das partículas, tamanho desejado, entre outros (RAO E GECKELER, 2011).

O método de polimerização *in situ* envolve a formação do polímero no momento da preparação das nanopartículas e podem ser obtidos por polimerização em emulsão ou polimerização interfacial. As limitações desses métodos envolvem a exigência de solventes orgânicos tóxicos para o preparo e a dificuldade de purificação, levando a presença de moléculas residuais tóxicas (monômeros) decorrentes da polimerização deficiente. Devido a estas limitações, foi proposto o uso de polímeros pré-formados para o preparo das partículas, sendo estes os mais utilizados atualmente (REIS *et al.*, 2006).

Os métodos baseados em polímeros pré-formados mais utilizados são: nanoprecipitação, deposição interfacial de polímero pré-formado, emulsificação/difusão do solvente, emulsificação/ evaporação do solvente, dupla emulsificação e *salting-out* (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; REIS *et al.*, 2006).

O método de nanoprecipitação foi desenvolvido inicialmente por FESSI *et al.*, 1988 e o princípio básico desta técnica é baseada na deposição interfacial de um polímero após o deslocamento de um solvente semipolar, miscível com água, a partir de uma solução lipofílica. A rápida difusão do solvente dentro da fase não-solvente resulta em uma diminuição da tensão interfacial entre as duas fases, o que

aumenta a área de superfície e leva à formação de pequenas gotas de um solvente orgânico.

No método de nanoprecipitação, descrito inicialmente por FESSI *et al.*, 1988, a fase orgânica é constituída de solvente (s) orgânico (s) miscível (s) em água contendo o composto bioativo e o polímero é adicionado, sob agitação moderada. A fase aquosa contendo o tensoativo e finalmente o solvente orgânico são removidos por evaporação (FESSI *et al.*, 1988). É possível obter nanocápsulas por uma adaptação do método de micro/nanoprecipitação (método de deposição interfacial de polímero pré-formado), adicionando-se um óleo e um tensoativo de baixa hidrofília a fase orgânica (FESSI *et al.*, 1989). Esses métodos (nanoprecipitação e deposição interfacial de polímero pré-formado) são vantajosos, pois não requerem homogeneização de alta energia, são relativamente fáceis, rápidos, facilmente escalonáveis e o solvente empregado, geralmente, é a acetona, considerada menos tóxica que solventes como o diclorometano, comumente empregado em métodos que envolvem emulsificação (BUDHIAN *et al.*, 2007). Entretanto a preparação das nanopartículas como carreadores impõe algumas restrições físico-químicas e biológicas quanto aos polímeros utilizados (DURÁN *et al.*, 2006; MORALES, 2007).

Polímeros biocompatíveis e biodegradáveis são materiais que podem ser muito interessantes do ponto de vista ambiental, uma vez que a princípio não causam danos ou impactos ao ambiente (NAIR & LAURENCIN, 2007; DURÁN *et al.*, 2006). Existem vários polímeros utilizados no preparo de nanopartículas; entretanto, os poliésteres alifáticos são interessantes devido à sua biodegradabilidade, disponibilidade, biocompatibilidade, ausência de toxicidade e pela facilidade em incorporar uma ampla variedade de compostos (PICOS *et al.*, 2000).

O polímero poli(ϵ -caprolactona) (PCL) é um polímero biodegradável capaz de incorporar diferentes estruturas químicas em sua composição (Figura 7).

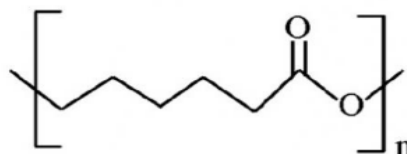


Figura 7. Estrutura química do polímero biodegradável Poli(ϵ -caprolactona) (PCL).

Este polímero é insolúvel em água, porém a água permeia as cadeias poliméricas, e sua degradação é lenta em meio aquoso e não causa danos ambientais (BUNTER *et al.*, 1998). Devido ao fato do PCL se degradar mais lentamente que os demais polímeros biodegradáveis, como os polímeros poli glicólico (PGA) e poli(lactídeo) (PLA), este se tornou um polímero de escolha para sistemas de liberação modificada (SINHA *et al.*, 2004; WOODRUFF *et al.*, 2010). Muitos estudos mostram a utilização deste polímero em sistemas de liberação modificada para fármacos (WOODRUFF *et al.*, 2010), devido à sua alta permeabilidade a muitos medicamentos e pela sua excelente biocompatibilidade, sendo completamente eliminado do organismo (WOODRUFF *et al.*, 2010). Entretanto, este polímero também pode ser utilizado para fins ambientais, como mostra OVEZ e HOLL (2008), que utilizou o polímero poli(ϵ -caprolactona) com a intenção de biorremediação de herbicidas triazínicos em água.

1.3.3 Nanopartículas poliméricas revestidas

Como já descrito, na literatura diversos são os polímeros utilizados para preparar nanocápsulas poliméricas (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010), entretanto, algumas estratégias metodológicas podem ser utilizadas a fim de revestir a superfície destas nanopartículas, através da adição de uma fina camada polimérica, depositada ao redor das partículas. Desta maneira, o revestimento pode ser adicionado durante o estágio final do preparo das nanocápsulas convencionais (nanoprecipitação ou dupla emulsão), através da interação eletrostática entre polímeros catiônicos e aniônicos (CALVO *et al.*, 1997; VILA *et al.*, 2002, MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

O revestimento das nanocápsulas poliméricas modifica a superfície das partículas e permite novas interações moleculares. CALVO *et al.*, 1997 utilizaram o polímero catiônico quitosana para revestir nanopartículas de PCL, com o objetivo de aumentar a muco adesão destas partículas com a região eletricamente negativa do epitélio da córnea e tiveram bons resultados. PREGO *et al.*, 2006 revestiram nanocápsulas com quitosana com a finalidade de avaliar a eficácia e o mecanismo de ação para liberação de peptídeo biologicamente ativo. Entre os polímeros

utilizados para revestimento de nanocápsulas a quitosana parece ser o polímero de escolha (GUTERRES *et al.*, 2010).

1.3.3.1 Quitosana

A quitosana é um polímero catiônico natural, que pode ser obtido a partir da quitina por meio da desacetilação com álcalis (Figura 8), podendo também estar naturalmente presente em alguns fungos, como aqueles pertencentes aos gêneros *Mucor* e *Zygomycetes* (KAFETZOULOS *et al.*, 1993). De acordo com o grau médio de acetilação (GA), parâmetro empregado para caracterizar o conteúdo médio de unidades *N*-acetil-*D*-glicosamina de quitosana, podem-se obter diversas quitosanas variando-se, assim, suas propriedades físico-químicas, como solubilidade, pKa e viscosidade (SINGLA *et al.*, 2001).

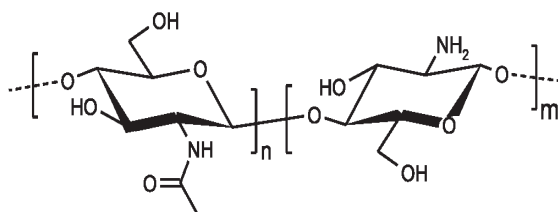


Figura 8. Representação estrutural do polímero de quitosana.

Este polímero por se tratar de um polímero natural biodegradável extremamente abundante e atóxico tem sido um material potencialmente atraente para diversas áreas: na agricultura (adubo para plantas, atividade antimicrobiana, antifúngica), no tratamento de água (floculante para clarificação, remoção de íons metálicos, polímero ecológico e redução de odores), na indústria de cosméticos (creme dental, esfoliante para a pele, tratamento de acne), na biofarmacêutica (imunológico, antitumoral, hemostático e anticoagulante), entre outros (WANG *et al.*, 2006; AZEVEDO *et al.*, 2007; PÉREZ-DE-LUQUE *et al.*, 2009).

O emprego de quitosana e a pesquisa por novas aplicações têm aumentado exponencialmente com o surgimento da nanotecnologia, micropartículas e nanopartículas estão sendo preparadas e revestidas por este material, com a

finalidade de liberação modificada de compostos bioativos (CALVO *et al.*, 1997; PREGO *et al.*, 2006). Diversos são os métodos de preparo destas partículas, porém muitas associações são feitas com polímeros negativamente carregados, como é o caso dos polímeros sintéticos PCL, PLGA e PLA. Uma vantagem adicional deste sistema são as características atóxicas deste polímero, sendo assim a sua utilização de grande interesse para aplicações ambientais.

2. OBJETIVOS

2.1 Gerais

Este trabalho teve como objetivo desenvolver (preparar e caracterizar) sistemas de liberação modificada para os herbicidas triazínicos: ametrina, atrazina e simazina, através de nanocápsulas poliméricas de poli(ϵ -caprolactona) normais e revestidas com quitosana, a fim de criar uma possível alternativa para o uso destes herbicidas em plantações, de forma a minimizar os impactos ambientais e os riscos para a saúde humana.

2.2 Específicos

- Desenvolvimento da metodologia analítica de quantificação dos herbicidas (ATZ, AMT e SIM) por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência);
- Preparo das formulações de nanocápsulas de PCL contendo os herbicidas;
- Preparo das formulações de nanocápsulas de PCL revestidas com quitosana contendo o herbicida atrazina;
- Avaliação da eficiência de encapsulação dos herbicidas nas nanocápsulas de PCL ou revestidas pelo método ultrafiltração/centrifugação;
- Realização de ensaios de liberação *in vitro* dos herbicidas na presença das nanocápsulas de PCL ou revestidas;
- Determinação do mecanismo de liberação dos herbicidas nas nanopartículas de PCL através de modelos matemáticos descritos na literatura;
- Avaliação da estabilidade físico-química (distribuição de tamanho, polidispersão e potencial zeta) das nanopartículas contendo herbicida em função do tempo;
- Avaliação da morfologia e estrutura das nanocápsulas de PCL por microscopia de força atômica (MFA) e microscopia eletrônica de transmissão (MET).
- Caracterização físico-química dos herbicidas e das formulações de nanocápsulas por espectroscopia na região do infravermelho.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais e reagentes

- Atrazina (grau de pureza 95%) - Pestanal[®]
- Ametrina (grau de pureza 95%) - Pestanal[®]
- Simazina (grau de pureza 95%) - Pestanal[®]
- Quitosana (baixa massa molecular), 80% de acetilação - Sigma[®]
- Poli(ϵ -caprolactona) (PCL) MW = 80.000 Da - Sigma[®]
- Polissorbato 80 (Tween[®] 80) - Sigma[®]
- Monoestearato de sorbitano (Span[®] 60) - Sigma[®]
- Triglicerídios de ácidos cáprico e caprílico (Myritol[®] 318) - Cognis[®]
- Acetona (grau espectroscópico analítico) - Merck[®]
- Etanol (grau espectroscópico analítico) - Merck[®]
- Metanol (grau HPLC) – JT Baker[®]
- Dispositivos de ultrafiltração de celulose regenerada de 30 kDa- Millipore[®]
- Dispositivos de ultrafiltração de celulose regenerada de 1kDa- Millipore[®]
- Agitador magnético - Tecnal[®]
- Microcentrífuga - MiniStar[®]
- Evaporador rotativo AL 390 - American Lab[®]
- Bomba à vácuo A12 - Symbol[®]
- Potenciômetro - Tecnal[®]
- Analisador de partículas Zetasizer Nano ZS 90 – Malvern[®]
- Microscopia de Força Atômica – Nanosurf[®]
- Microscopia de Transmissão - Zeiss LEO[®] 906
- Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - Varian[®] Pro Star
 - Bomba PS 210 solvent delivery module - Varian[®]
 - Detector UV-Vis PS 210 - Varian[®]
 - Coluna cromatográfica Varian[®] C₁₈ fase reversa, 5 μ 110A, 250x4,60mm
 - Injetor manual
 - Software Galaxie Workstation
- Espectrofotômetro de FI-IR 660, Varian[®] Inc.

3.2 Metodologia

3.2.1 Desenvolvimento da metodologia analítica para quantificação dos herbicidas em nanocápsulas poliméricas.

3.2.1.1 Princípio da técnica

A quantificação dos herbicidas triazínicos presentes nas nanocápsulas de PCL foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Esta técnica é um tipo de cromatografia frequentemente utilizada para separar e quantificar compostos orgânicos, dentre eles, pesticidas (RODRÍGUEZ-CUESTA *et al.*, 2005; HUERTAS-PÉREZ *et al.*, 2008; BEALE *et al.*, 2010; GRILLO *et al.*, 2011), fármacos (MORAES *et al.*, 2010, MELO *et al.*, 2011), entre outros. Dentre as vantagens da técnica, está o tempo reduzido de análise, alta resolução, confiabilidade, excelente sensibilidade, seletividade e versatilidade (COLLINS *et al.*, 2007).

Na CLAE as amostras passam por uma coluna cromatografia, chamada de fase estacionária, mediante a passagem de um líquido sob alta pressão, chamado fase móvel (HARRIS, 2001). Cada composto possui uma diferente afinidade com estas fases (estacionária ou móvel) e então é possível separar os composto e quantificá-los por meio de um detector (HARRIS, 2001). Esta técnica necessita de um sistema de distribuição de solvente, uma válvula de injeção de amostra, uma coluna de alta pressão, um detector e um computador para monitorar o sistema e apresentar os resultados.

3.2.1.2 Condições Cromatográficas

No início do desenvolvimento da metodologia analítica para quantificação dos herbicidas triazínicos, as condições cromatográficas foram ajustadas para obtenção de um pico simétrico, através do preparo de diferentes tipos de fase móvel e concentrações de soluções de herbicidas, até a obtenção de condições cromatográficas adequadas. As condições cromatográficas utilizadas durante todo processo de quantificação dos herbicidas estão descritas na Tabela 2 e 3.

Tabela 2. Condições analíticas utilizadas para quantificação do herbicida ametrina em nanocápsulas poliméricas.

Amostra	Ametrina em água desionizada
Fase móvel	Acetonitrila/água (70/30) (v/v)
Volume de injeção	100 μ L
Fluxo	1,5 mL/min
Temperatura	Ambiente (25°C)
Detector (λ)	Ultravioleta (UV), $\lambda = 220$ nm
Coluna cromatográfica	Phenomenex, Gemini 5 μ C ₁₈ 110A, 150 x 4,60mm

Tabela 3. Condições analíticas utilizadas para quantificação dos herbicidas atrazina e simazina em nanocápsulas poliméricas.

Amostra	Atrazina e Simazina em água desionizada
Fase móvel	Acetonitrila/água (50/50) (v/v)
Volume de injeção	100 μ L
Fluxo	1,0 mL/min
Temperatura	Ambiente (25°C)
Detector (λ)	Ultravioleta (UV), $\lambda = 225$ nm
Coluna cromatográfica	Phenomenex, Gemini 5 μ C ₁₈ 110A, 250 x 4,60mm

3.2.1.3 Construção da curva de calibração analítica

Soluções estoques de herbicidas foram preparadas na concentração de 33 μ g/mL e sucessivas diluições em triplicata foram feitas e levadas para leitura em CLAE nas condições citadas na tabela 2 e 3. Após a determinação das áreas nas diversas concentrações, gráficos foram feitos (área em função de concentração de herbicidas) e em seguida realizou-se a análise do comportamento matemático da curva (regressão linear). As curvas foram analisadas durante três dias consecutivos

e uma média entre todas as curvas foi utilizada como padrão para quantificar os herbicidas. Todos os gráficos foram analisados pelo programa Origin 8.1[®].

A estimativa do limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram realizadas a partir de dados obtidos com as regressões lineares das curvas analíticas de cada método proposto e aplicados às Equações 1 e 2, respectivamente (ICH, 1996; BRASIL, 2003).

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

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

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

3.2.2 Preparo das nanocápsulas de PCL

A preparação das NC de PCL foi realizada segundo o método de deposição interfacial de polímero pré-formado descrito inicialmente por FESSI *et al.* (1988). O método envolve a mistura de uma fase orgânica em uma outra fase aquosa. A fase orgânica foi constituída de 100 mg de polímero (PCL), 30 mL de solvente orgânico (acetona), 200 mg de óleo (triglicerídeos de ácido cáprico e caprílico - Miglyol[®] 810), 40 mg de tensoativo (monoestearato de sorbitano - Span[®] 60) e 10 mg de herbicida (ametrina, atrazina ou simazina). A fase aquosa foi composta por 30 mL de solução aquosa contendo 60 mg de tensoativo (Polissorbato 80 - Tween[®] 80). Após a dissolução dos componentes de ambas as fases, a fase orgânica foi inserida, lentamente, sob agitação magnética a fase aquosa com o auxílio de um funil. A suspensão resultante foi mantida sob agitação por 10 minutos e em seguida o solvente orgânico foi evaporado por pressão reduzida, utilizando um evaporador rotativo (FESSI *et al.*, 1988). A suspensão de nanopartículas foi evaporada até um volume final de 10 mL e a concentração de herbicida nas formulações após evaporação foi de 1mg/mL. As formulações foram armazenadas em frascos âmbar a temperatura ambiente (25°C).

3.2.2.1 Preparo das nanopartículas revestidas com quitosana

As nanopartículas revestidas com quitosana foram preparadas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado descrito no item 3.2.2 (FESSI *et al.*, 1989) e no processo final de agitação, adicionou-se utilizando um funil, diferentes concentrações de quitosana nas formulações de nanocápsulas de acordo com a metodologia descrita por CALVO *et al.*, 1997.

A solução padrão de quitosana foi preparada na concentração de 500 µg/mL em solução acética (1mol/L), a fim de solubilizar o polímero e posteriormente diferentes concentrações de quitosana foram adicionadas as formulações de nanocápsulas, obtendo formulações com concentrações finais de 0 µg/mL, 8 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 30 µg/mL e 40 µg/mL de quitosana. Todas as formulações foram armazenadas em frascos âmbar e deixadas à temperatura de 25°C para posteriores análises.

3.2.3 Medidas da eficiência de encapsulação

O total (100%) de herbicida (ametrina, atrazina e simazina) presente na suspensão de NC poliméricas foi determinado diluindo as suspensões em acetonitrila (ACN). Esta solução foi filtrada em membrana Millipore® de 0,22 µm e quantificada por CLAE, segundo as condições descritas nas tabelas 2 e 3.

A quantidade de herbicida encapsulado às NC foi determinado pelo método de ultrafiltração/centrifugação, que consiste em submeter à suspensão de NC à centrifugação em dispositivos de ultrafiltração constituídos de celulose regenerada de 30 kDa (Microcon – Millipore®) e quantificar o ultrafiltrado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Apenas atravessa a membrana de 30 kDa o herbicida livre, sendo assim, por diferença entre a quantidade de herbicida utilizada (100%) e herbicida não associado as NC, determinou-se a eficiência de herbicida encapsulado as nanocápsulas. A quantificação do total de herbicida presente na suspensão de NC (100%) e do herbicida não associado às NC foi realizada por CLAE a partir da equação da reta da curva analítica previamente validada. Diversos

trabalhos empregam essa técnica para determinar a taxa de encapsulação de compostos bioativos em nanopartículas (GAMISANS *et al.*, 1999; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; KILIC *et al.*, 2005).

3.2.4 Cinética de liberação *in vitro*

Para verificar o perfil de liberação dos herbicidas triazínicos pelas nanocápsulas foram realizados ensaios de cinética de liberação, que consiste de um sistema formado por dois compartimentos, um chamado doador e outro receptor (Figura 9).

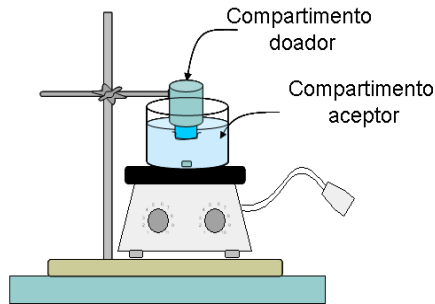


Figura 9. Representação esquemática do ensaio de liberação *in vitro* utilizando membranas de celulose semipermeável.

Nesse sistema foi utilizado uma membrana de celulose (Spectrapore, com poro para exclusão molecular de 1 KDa.) separando a amostra (2 mL no compartimento doador) do compartimento receptor, contendo o solvente (80mL de água) sob agitação leve (PAAVOLA *et al.* 1995). O tamanho dos poros dessa membrana permite que passe através dela para o compartimento receptor, somente herbicida livre das nanopartículas, enquanto o herbicida associado às nanopartículas fica retido no compartimento doador até que o equilíbrio seja deslocado no sentido de liberar o herbicida que estava no interior das partículas. Cabe salientar que tal estudo foi realizado sob condição de diluição *sink*, o qual se refere a um excesso de volume de solvente, fazendo com que a concentração de soluto não atinja mais do que 20% de sua solubilidade máxima (AULTON 2002).

As amostras foram coletadas do compartimento receptor e analisadas por CLAE no comprimento de onda de cada herbicida (em intervalos de 15 minutos na

primeira hora e depois em intervalos de 30 minutos e 1 hora, até que ocorresse estabilização da liberação) durante aproximadamente cinco dias. Os valores de área foram convertidos em % de herbicida liberado em função do tempo. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

3.2.4.1 Determinação da Eficiência de Liberação (EL)

A eficiência de liberação (EL%) sugerida inicialmente por KHAN & RHODES (1975) pode ser incluída como um importante parâmetro para avaliar a cinética de liberação. Este termo pode ser definido como a área sob a curva de liberação em um determinado intervalo de tempo e permite uma comparação entre diferentes formulações contendo o mesmo ativo. A eficiência de liberação (EL %) foi calculada a partir dos valores obtidos de área sob a curva (ASC) do perfil de liberação do herbicida (ou do herbicida nas suspensões de nanopartículas) em intervalo de tempo (t) entre zero e 5,5 dias e dividido pela área sobre a curva teórica de um retângulo admitindo uma liberação de 100% entre o tempo de zero e 5,5 dias (ASC(100%)) (KHAN & RHODES, 1975). A EL foi expressa em percentagem e pode ser definida pela equação 3.

$$EL(\%) = \frac{ASC(\text{zero} - 5,5)}{ASC(100\%)} \times 100\% \quad (3)$$

3.2.4.2 Modelagem matemática dos ensaios de liberação

A investigação do perfil de liberação de bioativos em nanopartículas pode fornecer informações importantes a respeito dos mecanismos que governam a liberação destes (POLAKOVIC *et al.*, 1999). Atualmente através do avanço da informática diversos modelos matemáticos foram criados e se tornou possível prever estes mecanismos (SIEPMANN *et al.* 2008; SIEPMANN *et al.* 2001; COSTA e LOBO, 2001).

O modelo semi-empírico de Korsmeyer Peppas (Equação 4) foi aplicado às curvas de liberação dos herbicidas das nanopartículas de PCL, visando elucidar que

tipo de mecanismo rege este sistema de liberação (HARIHARAM *et al.* 1994; COLOMBO *et al.* 1995; COLOMBO *et al.* 2005; FERRERO *et al.* 2000; COSTA e LOBO, 2001).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = Kt^n + b \quad (4)$$

onde K é a constante cinética de liberação que incorpora características estruturais e geométricas do mecanismo e n é o expoente de liberação que, de acordo com o valor numérico que assume, caracteriza o mecanismo de liberação do herbicida.

Esta equação geralmente é utilizada para interpretar e descrever a liberação de compostos quando o mecanismo que prevalece não é bem conhecido ou resulta da combinação de dois processos aparentemente independentes: um devido ao transporte do herbicida que obedece às leis de Fick ou transporte Fickiano, e outro consequência dos fenômenos de inchamento/relaxamento da matriz polimérica (expansão dinâmica), na qual envolve a transição de um estado semi-rígido a outro mais flexível, chamado transporte Caso-II.

A análise do modelo foi feita em função dos valores obtidos das regressões lineares dos tratamentos, sendo possível determinar a constante da cinética de liberação (K) e o valor de expoente de liberação (n).

3.2.5 Avaliação da estabilidade das nanocápsulas

Para avaliar a estabilidade das formulações de nanocápsulas sem e contendo os herbicidas triazínicos foram determinadas algumas propriedades físico-químicas como tamanho (diâmetro hidrodinâmico), polidispersão, potencial zeta e pH em função do tempo zero, 15, 30, 60 e 90 dias.

3.2.5.1 Diâmetro hidrodinâmico e polidispersão

3.2.5.1.1 Princípio da técnica – Espectroscopia de correlação de fótons

Muitas ferramentas estão disponíveis para avaliar o tamanho de nanopartículas poliméricas, entre elas, a espectroscopia de correlação de fótons. Esta técnica também é conhecida como “Dynamic Light Scattering” e baseia-se na interação das partículas com um feixe de luz incidente, que consiste em medir o movimento aleatório das partículas (movimento browniano) e relaciona esta medida ao tamanho delas através da equação de Stokes- Einstein (Equação 5) (PATY e FRISKEN, 2006). Quanto maior a partícula, mais lento será seu movimento browniano, enquanto que as partículas menores terão movimento mais rápido. Alguns fatores como a temperatura, viscosidade, pH necessitam ser estáveis para não ocorrer erros de interpretação (GUTERRES *et al.*, 2010). Valores de diâmetro médio, distribuição de tamanho e índice de polidispersão são encontrados por esta análise. O índice de polidispersão obtido indica homogeneidade relativa do sistema (GUTERRES *et al.*, 2010).

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (5)$$

onde, $d(H)$ é o raio hidrodinâmico, K é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta, η é a viscosidade da amostra e D o coeficiente de difusão.

3.2.5.1.2 Determinação do diâmetro e índice de polidispersão

A técnica de espalhamento de luz foi utilizada para determinação do tamanho médio e da distribuição de tamanho das nanopartículas (polidispersão). Essa avaliação foi feita diluindo-se cem vezes as suspensões de nanocápsulas com água (Milli-Q) e utilizando-se um analisador de partículas Zetasizer HSA 3000 (Malvern®) a um ângulo fixo de 90° e temperatura de 25°C. Cada resultado foi expresso como média de três determinações (GOVENDER *et al.*, 2000; VENKATRAMAN *et al.*, 2005).

3.2.5.2 Potencial zeta

3.2.5.2.1 Princípio da técnica

O potencial zeta é o potencial elétrico no plano hidrodinâmico de cisalhamento, ou seja, em geral as partículas em suspensão possuem carga na superfície, criando uma camada ao redor da partícula que difere do meio dispersante. As nanopartículas devem apresentar um valor de potencial zeta relativamente alto para garantir a estabilidade físico-química da suspensão, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar agregação em função de colisões ocasionais de nanocápsulas adjacentes (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Este parâmetro pode ser determinada por eletroforese, em que um campo elétrico é aplicado na dispersão e então as partículas migram em direção ao eletrodo de carga oposta com uma velocidade proporcional à magnitude do potencial zeta (DELGADO *et al.*, 2005). A mais comum técnica experimental eletroforética usada para determinar o potencial zeta de nanocápsulas são de espalhamento de luz de eletroforese (GUTERRES *et al.*, 2010). O potencial zeta é influenciado pela mudança dos componentes das formulações, especialmente tensoativos e a composição do polímero (COUVREUR *et al.*, 2002).

3.2.5.2.2 Determinação do potencial zeta

A carga de superfície das nanocápsulas foi avaliada através da determinação de potencial zeta, utilizando-se um analisador de potencial zeta Zetasizer HSA 3000 (Malvern®). As análises foram realizadas diluindo-se cem vezes as suspensões de nanopartículas em água desionizada (Milli-Q) e os resultados foram expressos como médias de três determinações.

3.2.5.3 Medida de estabilidade química do polímero (pH)

A análise da estabilidade química do polímero foi avaliada através da medida de pH da suspensão em função do tempo, uma vez que alterações nestes podem indicar degradação química do polímero (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). O pH das suspensões das nanocápsulas foram medidos no decorrer de 90 dias e utilizou um pHmetro (Tecnal[®]) previamente calibrado com soluções tampão de pH 7,0 e 4,0.

3.2.6 Avaliação da morfologia e estrutura das nanopartículas por microscopia

Diferentes técnicas de microscopia podem ser usadas para observar a morfologia das nanocápsulas e suas estruturas, entre elas a microscopia de força atômica (MFA) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) (GUTERRES *et al.*, 2010).

3.2.6.1 Microscopia de força Atômica (MFA)

3.2.6.1.1 Princípio da técnica

A microscopia de força atômica, também conhecida como microscopia de varredura de força, baseia-se na varredura da superfície da amostra por uma ponta piramidal (ponteira) de alguns micra de comprimento (100 a 200 μm) e geralmente com menos de vinte nanômetros de diâmetro, integrada em um cantilever flexível. A sonda (ponteira + cantilever) é sempre o componente básico do equipamento e, para alcançar resolução atômica, a ponta tem que terminar em um conjunto de átomos. O microscópio de força atômica (MFA) permite a caracterização das propriedades interfaciais dos elétrons, possibilitando a observação direta da arquitetura de determinadas superfícies, trazendo importantes informações sobre a morfologia de algumas superfícies, incluindo polímeros, cerâmicas, nanocompósitos, vidros e amostras biológicas (WIESENDANGER, 1994; BONNELL E HUEY, 2001)

Esta técnica tem sido utilizada largamente no estudo de polímeros (JANDT, 1998, SCHNEIDER & HERRMANN, 2001 e HODGES, 2002), devido a sua capacidade de fornecer informações que não eram passíveis de se obter com o uso da microscopia eletrônica de varredura.

3.2.6.1.2 Preparo das amostras

As suspensões de nanocápsulas foram investigadas por microscopia de força atômica. As amostras preparadas anteriormente (item 3.2.2) foram diluídas (cem vezes) e depositadas em uma superfície de silício previamente limpa com solução de ácido nítrico e água. As amostras imobilizadas foram secas com ar comprimido e deixadas por 24 horas em ambiente com baixa umidade e posteriormente foram analisadas pelo microscópio de força atômica Nanosurf Easy Scan 2 Basic AFM – padrão BT02217 (Nanosurf®, Suíça) em modo de contato intermitente. Foram utilizados cantilever comercial Contr 10 e a velocidade de scan foi proporcional ao tamanho da área de varredura e da frequência.

3.2.6.2 Microscopia eletrônica de Transmissão

3.2.6.2.1 Princípio da técnica

A microscopia eletrônica de transmissão é uma técnica bastante utilizada para avaliar distribuição de tamanho, integridade e morfologia de nanocápsulas poliméricas. Enquanto o microscópio de luz utiliza fótons como à radiação visível para observação de materiais pequenos, o microscópio eletrônico, por sua vez emprega feixes de elétrons, que são emitidos em direção a uma amostra, interagindo com a amostra enquanto a atravessa. Normalmente a amostra de nanopartícula é seca e empregada com agentes de contraste, tais como acetato de uranila ou ácido fosfotúngstico e, em seguida são analisadas (GUINEBRETIERE *et al.* 2002, SI *et al.*, 2005; GUTERRES, *et al.*, 2010).

3.2.6.2.2 Preparo das amostras

A morfologia e a estrutura das NC foram examinadas pelo microscópio Zeiss LEO 906 do laboratório de microscopia eletrônica (LME), Instituto de Biologia, Unicamp. As nanocápsulas anteriormente preparadas foram previamente diluídas cem vezes em água e submetidas à técnica de coloração negativa descrita por LERIA e MARCO (2001). Nesta técnica as suspensões de NC foram gotejadas em “grids” de 200-300 mesh revestidos por “formvar” e após a secagem foi gotejado uma solução aquosa de acetato de uranila a 2 % (m/v) e após a evaporação do solvente os grids foram levados para análise no microscópio, utilizando uma voltagem de 80 kV.

3.2.7 Caracterização por espectroscopia na região do infravermelho

3.2.7.1 Princípio da técnica

A espectroscopia na região do infravermelho é um tipo de espectroscopia de absorção a qual usa a região do infravermelho do espectro eletromagnético e esta técnica fornece evidências da presença de vários grupos funcionais em diversas estruturas orgânicas, devido à interação das moléculas ou átomos com a radiação eletromagnética, em um processo de vibração molecular (SOLOMONS E FRYHLE, 2001).

A radiação no infravermelho faz com que átomos e grupos de átomos de compostos orgânicos vibrem com amplitude aumentada ao redor das ligações covalentes que os ligam e o processo é quantizado, porém o espectro vibracional costuma aparecer como uma série de bandas, porque a cada mudança de nível de energia vibracional corresponde uma série de mudanças de níveis de energia rotacional e as linhas se sobrepõem dando origem às bandas observadas no espectro (SILVERSTEIN *et al.*, 1991). As deformações sofridas pelas ligações químicas, em decorrência da absorção no infravermelho, são percebidas através de movimentos vibracionais nas ligações, os quais envolvem deformações angulares (nos “ângulos” de ligações) e deformações axiais (nos eixos das ligações). Além disto, as frequências de ressonância podem ser em uma primeira aproximação

relacionadas ao comprimento da ligação e às massas dos átomos em cada ponta da estrutura molecular. As ligações podem vibrar de seis modos: estiramento simétrico, estiramento assimétrico, tesoura, rotação, wag e twist.

3.2.7.2 Determinação dos espectros de infravermelho

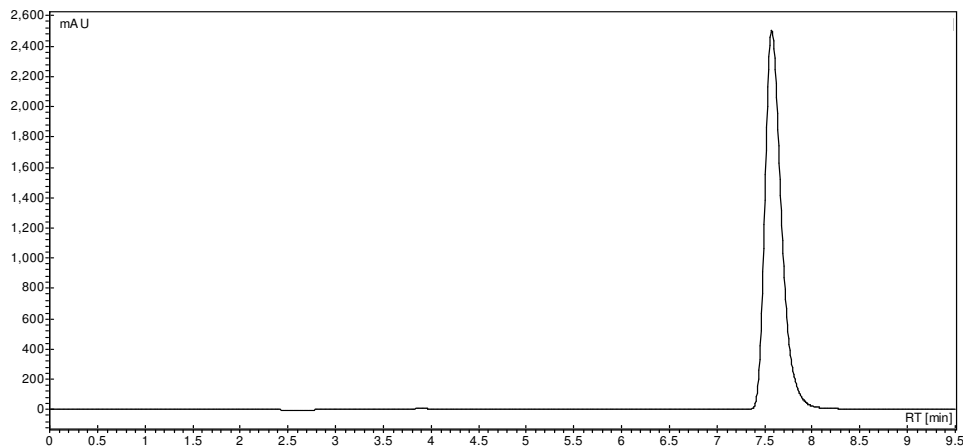
As análises de infravermelho foram realizadas com a finalidade de investigar a presença dos herbicidas triazínicos nas nanocápsulas de PCL. Os experimentos foram realizados em um espectrofotômetro de FI-IR 660 Varian® Inc. em uma faixa de 400 a 4000 cm^{-1} , utilizando 32 varreduras por amostra com resolução de 8 cm^{-1} . Amostras dos herbicidas (ATZ, AMT e SIM) e nanocápsulas de PCL sem e contendo os herbicidas foram analisadas utilizando o acessório de reflectância total atenuada (ATR) (POLLETO *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2010). A espectroscopia Refletância Total Atenuada (ATR) é uma técnica utilizada para se obter espectros na região do infravermelho de amostras como: pastas, adesivos e pó que não podem ser analisados pelos métodos normais, como pastilhas ou filmes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

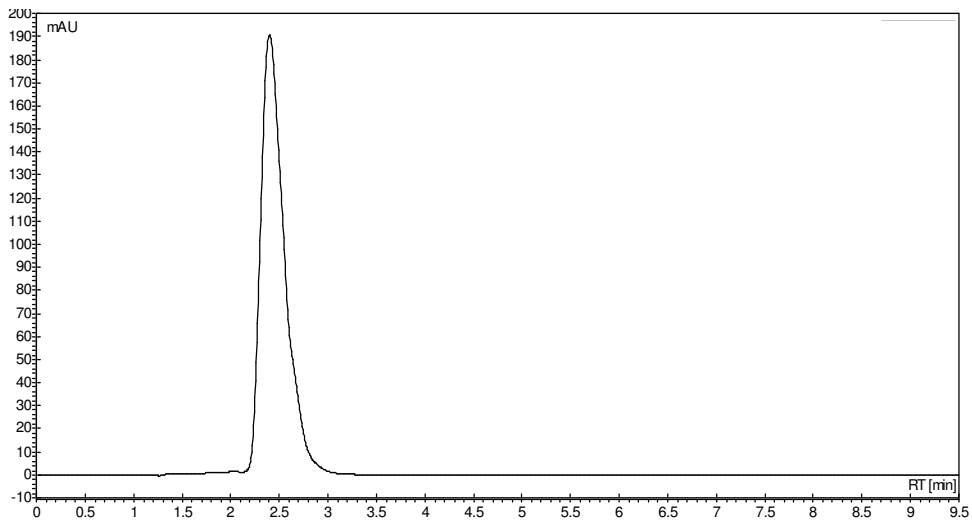
4.1 Desenvolvimento de metodologia analítica para quantificação de herbicidas

4.1.1 Obtenção dos cromatogramas dos herbicidas

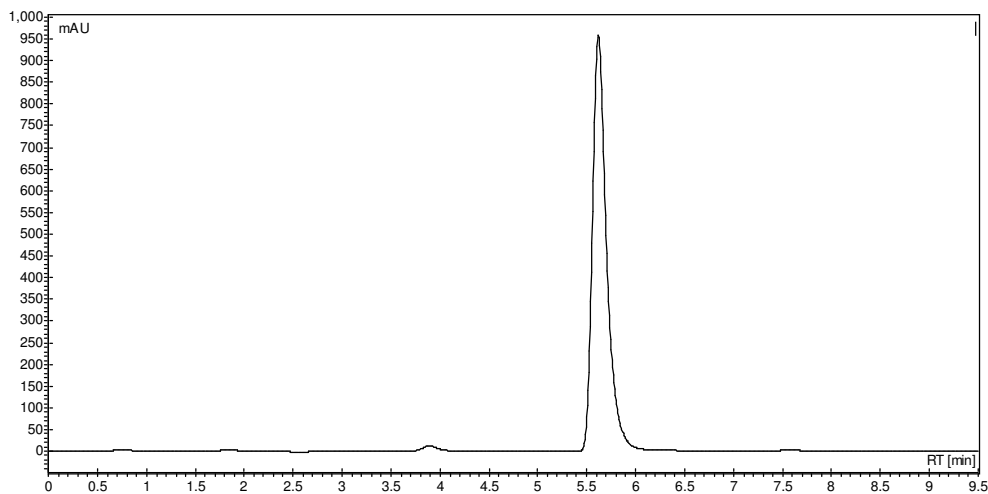
Soluções de herbicidas foram injetadas em CLAE, em busca de obter cromatogramas com picos únicos, simétricos e tempos de retenção curtos. Diversas foram às fases móveis testadas para se chegar as melhores condições, citadas nas tabelas 2 e 3, para cada herbicida. A figura 10 mostra os cromatogramas dos três herbicidas (ATZ, AMT e SIM) e observa-se a presença de um único pico, simétrico, apresentando tempos de retenção abaixo de 10 minutos para cada herbicida estudado. Estes dados são importantes para a realização de futuras análises, como quantificação da eficiência de encapsulação dos herbicidas nas nanocápsulas, ensaios de cinética de liberação *in vitro*, entre outros.



A)



B)



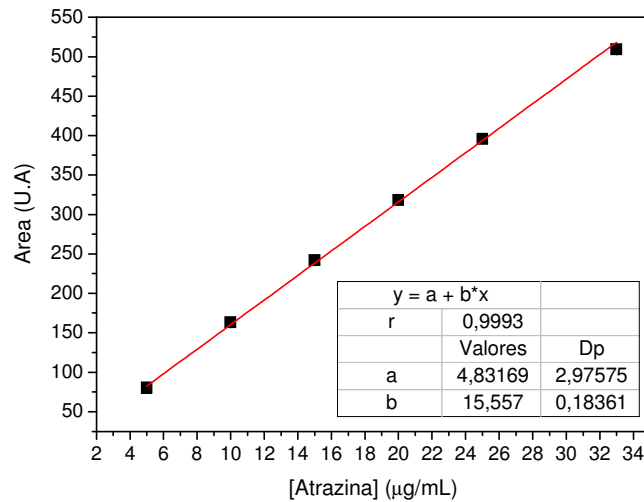
C)

Figura 10. Cromatogramas dos herbicidas triazínicos: A) Atrazina, B) Ametrina e C) Simazina, obtidos sob condições cromatográficas descritas no item 3.2.1.2.

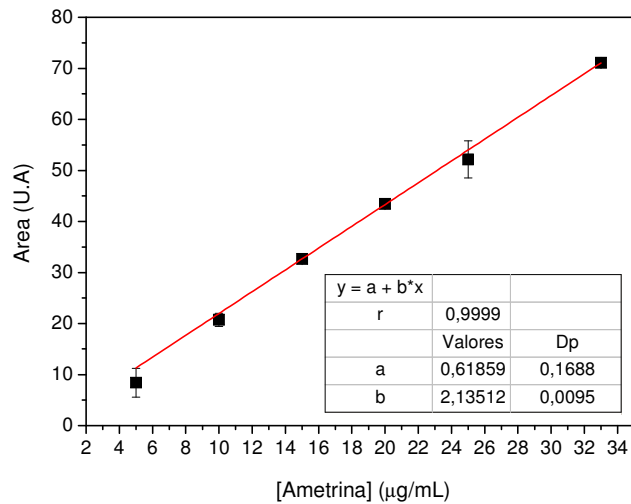
4.1.2 Construção das curvas de calibração analítica dos herbicidas

A curva de calibração analítica mostra a resposta de um método analítico para quantidades conhecidas de analito (HARRIS, 2001). Para a análise quantitativa

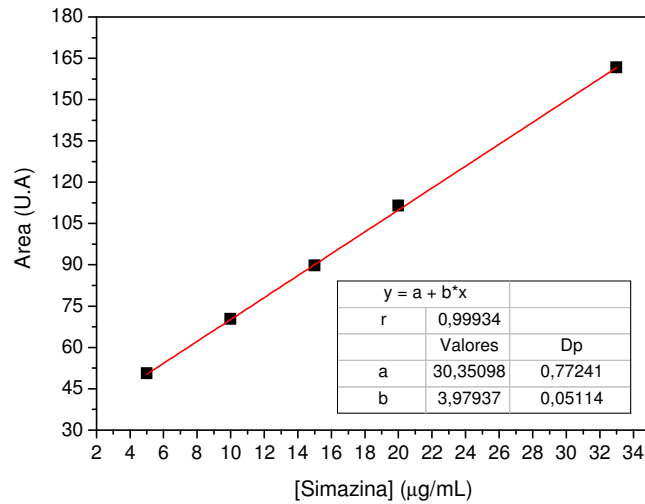
dos herbicidas (ATZ, AMT e SIM) foram preparadas soluções com concentrações compreendidas entre 5 µg/mL a 33 µg/mL e as curvas analíticas foram avaliadas a partir de três curvas diferentes em três dias consecutivos. As médias das curvas analíticas determinadas para os herbicidas estão apresentadas na figura 11 e observa-se um comportamento linear para todas as curvas, com um coeficiente de correlação linear (r) próximo a 1. Os limites de detecção e quantificação dos métodos estão apresentados na tabela 4.



A)



B)



C)

Figura 11. Curvas de calibração analíticas para os herbicidas: A) Atrazina, B) Ametrina e C) Simazina, obtidas sob condições cromatográficas descritas no item 3.2.1.2.

Tabela 4. Limite de detecção e limite de quantificação dos métodos analíticos para cada herbicida estudado.

	Atrazina	Ametrina	Simazina
Limite de detecção (µg/mL)	0,57	0,23	0,58
Limite de quantificação (µg/mL)	1,91	0,79	1,94

4.2 Eficiência de encapsulação

Partículas nanométricas possuem valores elevados de área/volume e permitem que moléculas sejam encapsuladas com facilidade em seu interior (PRABU *et al.* 2008), entretanto, é necessário se preocupar com a natureza química e com a polaridade do compostos a serem associados. MORA-HUERTAS *et al.*, 2010 explica que compostos hidrofílicos apresentam baixo valor de eficiência de encapsulação (~10%) quando associados à nanocápsulas poliméricas, enquanto

que compostos hidrofóbicos possuem alta afinidade (acima de 70%). Neste contexto, os herbicidas (AMT, ATZ e SIM) possuem baixa solubilidade em água e foram associados à nanocápsulas poliméricas de PCL, a fim de promover uma liberação modificada destes bioativos, visando o desenvolvimento de formulações que possam causar menos impacto ambiental e a saúde humana.

Os valores de eficiência de encapsulação para as formulações NC:AMT, NC:ATZ e NC:SIM foram descritos na tabela 5 e observa-se que os maiores valores de encapsulação estão relacionados com os compostos de menor solubilidade aquosa. O herbicida simazina é o mais hidrofóbico de todos e o que apresentou maior eficiência de encapsulação ($97,0 \pm 0,51\%$).

Tabela 5. Valores de solubilidade e eficiência de encapsulação das nanocápsulas de PCL contendo os herbicidas atrazina, ametrina e simazina (n=3).

Amostras	Encapsulação	Solubilidade *
NC:AMT	84,13 % \pm 2,56	185 mg/L
NC:ATZ	86,77 % \pm 0,73	28 mg/L
NC:SIM	97,08 % \pm 0,51	5 mg/L

*Solubilidade (EXTOXNET, 2011)

Estes elevados valores de eficiência de encapsulação podem ser explicados por dois fatores: pela alta solubilidade destes herbicidas no óleo presente no interior das nanocápsulas e, também pela interação destes compostos com a matriz polimérica das partículas, uma vez que os grupos amino (NH) do herbicida se ligam com os oxigênios presentes na estrutura do polímero PCL, formando ligações de hidrogênio.

GRILLO *et al.*, 2010 mostraram que a encapsulação do herbicida ATZ em micropartículas poliméricas de PHBV poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) ocorreu por ligações de van der Waals (contatos hidrofóbicos) e através de ligações de hidrogênio entre os grupos amino da ATZ com os radicais carbonílicos do polímero.

MORA-HUERTAS *et al.*, 2010 observaram alguns trabalhos na literatura que utilizavam nanocápsulas de PCL para liberação modificada de bioativos e

observaram que estas nanopartículas tiveram valores elevados de encapsulação quando associados com compostos hidrofóbicos.

MORAES *et al.*, 2011 prepararam nanocápsulas de PCL através do método de nanoprecipitação, contendo o anestésico local benzocaína e também obtiveram valores de eficiência de encapsulação maiores que 85%. FERRANTI *et al.*, 1999 também prepararam nanocápsulas de PLC contendo o fármaco primidona e encontraram valores entre 67% e 75% de eficiência de encapsulação.

De modo geral, os herbicidas tiveram boa encapsulação nas nanocápsulas de PCL e demonstraram ser boas moléculas para associação neste tipo de sistema nanoestruturado.

4.3 Cinética de liberação *in vitro*

Vários parâmetros podem afetar a liberação de herbicidas em sistemas matriciais, tais como o tamanho das nanocápsulas, a massa molecular, a natureza do óleo e a razão de polímero (SIEPMAN *et al.* 2001). Portanto ensaios de cinética de liberação são fundamentais para a caracterização das partículas, pois fornece informações importantes quanto à interação herbicida-carreador e o mecanismo envolvido no processo de liberação (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010). Segundo SOPPIMATH *et al.*, 2001 a liberação de bioativos a partir de sistemas nanoparticulados poliméricos depende de diversos fatores, entre eles, da difusão do ativo através da matriz da partícula, da desorção do composto pela superfície, da difusão pela parede polimérica, da erosão da matriz polimérica e pela combinação de processos de difusão e erosão.

Os experimentos de cinética de liberação *in vitro* foram realizados utilizando dois compartimentos, um chamado doador e outro acceptor, como citados no item 3.2.4 e todas as amostras foram analisadas por CLAE. Os dados foram calculados em porcentagem de liberação e plotados em função do tempo. Neste ensaio o herbicida possui a capacidade de atravessar os poros da membrana, porém as nanopartículas com tamanho superior a 200 nm, não a atravessam e, desta forma, é possível observar o efeito da associação do herbicida na velocidade de liberação da matriz polimérica das nanocápsulas.

Na figura 12 comparou-se o perfil de cinética de liberação do herbicida atrazina livre com o herbicida associado às nanocápsulas poliméricas de PCL e observou que a solução de herbicida livre liberou 50% do ativo em 7,2 horas (0,3 dias), enquanto que a formulação de nanopartícula demorou aproximadamente 21,6 horas (0,9 dias) para liberar a mesma quantidade de ativo. Também foi possível observar que no período de quatro dias o herbicida livre de nanopartículas foi completamente liberado (100%) para o compartimento aceptor, enquanto que na formulação de nanocápsulas apenas 65% da ATZ havia sido liberada neste tempo.

Este perfil de liberação é bastante interessante, pois, uma vez que se modifica o perfil de liberação do herbicida, abre uma nova perspectiva para reduzir os problemas químicos e toxicológicos destes compostos.

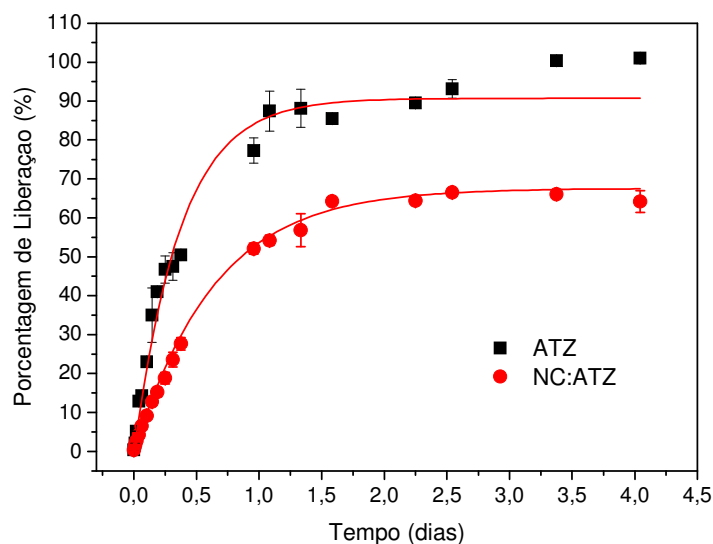


Figura 12. Perfil de cinética de liberação *in vitro* para o herbicida atrazina livre e associado às nanocápsulas de PCL, 25°C, determinação em triplicata (n=3).

Vários trabalhos na literatura relatam modificação na cinética de liberação de diversos compostos bioativos quando associados às nanopartículas e micropartículas poliméricas, porém muitos dos trabalhos são relacionados com fármacos (VERGER *et al.*, 1998; HUANG e BRAZEL, 2001; VENKATRAMAN *et al.*, 2005; GRILLO *et al.*, 2010, MELO *et al.*, 2010; MORAES *et al.*, 2011). A literatura descreve a utilização de polímeros biodegradáveis também para a liberação

modificada de herbicidas (DAILEY *et al.*, 1993; DAILEY *et al.*, 1998; ROMERO-CANO *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2011).

SILVA *et al.*, 2010 associaram o herbicida clomazone em nanopartículas de alginato/quitosana e alginato/AOT e observaram perfis de cinética de liberação mais lentos para o sistema nanoparticulado, semelhantes aos resultados apresentados neste trabalho. A eficiência de encapsulação do herbicida clomazone nestas nanopartículas foi de 89,8% e 59,1% e o perfil de liberação do herbicida foi retardado em 20% quando associado às nanopartículas de alginato/quitosana e 50% para as nanopartículas de alginato/AOT quando comparado com o perfil de liberação do herbicida não encapsulado no período de 4 horas. Em outro estudo SILVA *et al.*, 2011 preparam nanopartículas poliméricas de alginato-AOT contendo o herbicida paraquat e obtiveram também um perfil de liberação cerca de 20% mais lento que a formulação de herbicida convencional durante 4 horas de estudo.

Recentemente trabalhos do nosso grupo de pesquisa mostraram que micropartículas de dois polímeros naturais modificaram o perfil de liberação do herbicida ametrina e atrazina (GRILLO *et al.*, 2010b; GRILLO *et al.* 2011, LOBO *et al.*, 2011). A eficiência de encapsulação dos herbicidas ametrina e atrazina em micropartículas poliméricas foi de 35% e 32%, respectivamente e observou que o perfil de ambas as formulações foram retardados em aproximadamente 20% quando avaliados por um ou quatro dias e que o mecanismo de liberação de ambos é dado pela difusão e relaxamento das cadeias poliméricas.

Com a finalidade de comparar os perfis de cinética de liberação dos três herbicidas (ATZ, AMT e SIM) associados às nanocápsulas de PCL, a Figura 13 mostra os três perfis de liberação em função do tempo.

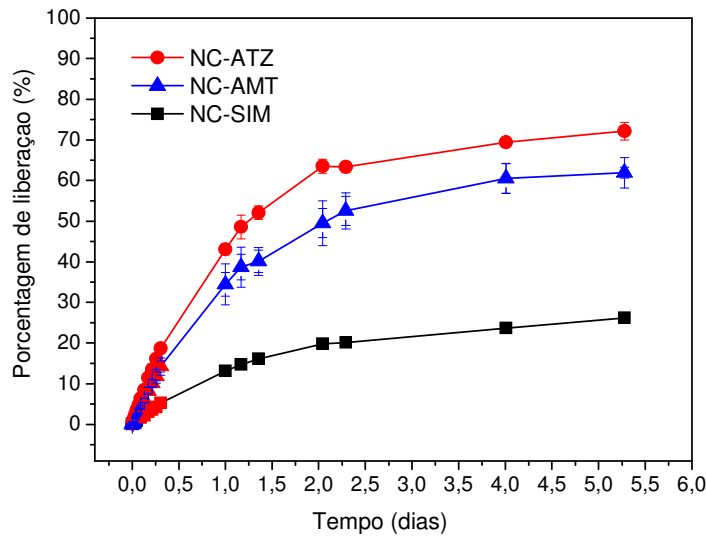


Figura 13. Perfis de cinética de liberação *in vitro* para os herbicidas atrazina, ametrina e simazina em nanocápsulas de PCL, temperatura 25°C, n=3.

Na figura 13 observa-se que os perfis de liberação dos herbicidas atrazina e ametrina associados às nanocápsulas de PCL foram ligeiramente diferentes, durante os cinco dias de estudo, apresentando uma taxa de liberação de 72% e 61% respectivamente. No caso destes dois herbicidas a eficiência de encapsulação nas nanocápsulas de PCL foi muito semelhante ~ 85 %, fato este que indica que a diferença no perfil de liberação pode ser explicado provavelmente pela diferença na intensidade das interações intermoleculares de cada um dos herbicidas com a fase oleosa e/ou polimérica (WOODRUFF *et al.* 2010). Observa-se que na estrutura química dos herbicidas atrazina e ametrina existem grupamentos CH_3 mais volumosos que o herbicida simazina e estes grupamentos podem gerar um impedimento estérico, dificultando as ligações de hidrogênio do herbicida com as cadeias poliméricas e conseqüentemente diminui a interação e acelera a liberação do composto bioativo.

Já para as nanocápsulas contendo simazina observou-se que o perfil de liberação foi bastante alterado em relação aos outros dois herbicidas (ametrina e atrazina), uma vez que apenas 25% do herbicida foi liberado no tempo de cinco dias. Esta diferença no perfil da cinética de liberação da simazina, pode estar relacionada

a alta hidrofobicidade do composto (solubilidade aquosa de 5 mg/L) em comparação aos demais (atrazina e ametrina 28 mg/L e 185 mg/L respectivamente), uma vez que sua eficiência de encapsulação foi de 97,1% e um outro fator que justificaria esta liberação lenta poderia ser a forte interação do herbicida com as cadeias poliméricas do PCL, já que a estrutura química do composto possui grupos CH_3 menos volumosos que os demais herbicidas estudados.

ROMERO E VINCENT (2002) prepararam nanocápsulas de poli(ácido láctico) contendo o fármaco 4-nitroanisol e observaram um perfil de liberação bastante lento para o fármaco quando encapsulado as nanocápsulas, mostrando que em algumas vezes pode ocorrer uma forte interação entre o composto em estudo e as nanopartículas, retardando todo o processo.

Estudos relatam que dentre os polímeros biodegradáveis mais utilizados para liberação de ativos, como o poli(lático-co-glicólico) (PLGA), poliglicólico (PGA), poli(lactídeo) (PLA) e seus copolímeros, o polímero poli(ϵ -caprolactona) (PCL) é o que possui degradação mais lenta (WOODRUFF *et al.* 2010), por isto que é empregado extensivamente em sistemas de liberação modificada.

Os perfis de liberação foram integrados e os valores de eficiência de liberação das formulações de NC:ATZ, NC:AMT e NC:SIM foram calculados e observou-se valores de 56,5%, 47,2% e 18,7% respectivamente. Estes dados permitem uma comparação mais fidedigna entre os valores de liberação e foi possível observar que a liberação dos herbicidas segue a ordem decrescente de liberação atrazina, ametrina e simazina quando associados às NC de PCL.

CEA *et al.*, 2010 prepararam um sistema de liberação modificada para o herbicida atrazina utilizando microesferas de etilcelulose e argilas e observaram que a modificação na composição da matriz polimérica da microesfera foi responsável pela alteração na eficiência de encapsulação, no perfil de liberação e na interação do herbicida com o solo. O tempo para que 50% do herbicida fosse liberado ($t_{50\%}$) foi de aproximadamente 20 horas de análise.

LI *et al.*, 2008 utilizaram gel de carboximetilcelulose em diferentes tipos de argilas, a fim de promover uma liberação modificada do herbicida acetoclor e observaram um $t_{50\%}$ de 151 a 522 horas para a formulação contendo o gel seco.

Portanto diversos são os tipos de sistemas de liberação encontrados, sendo uns mais lentos e outros mais rápidos.

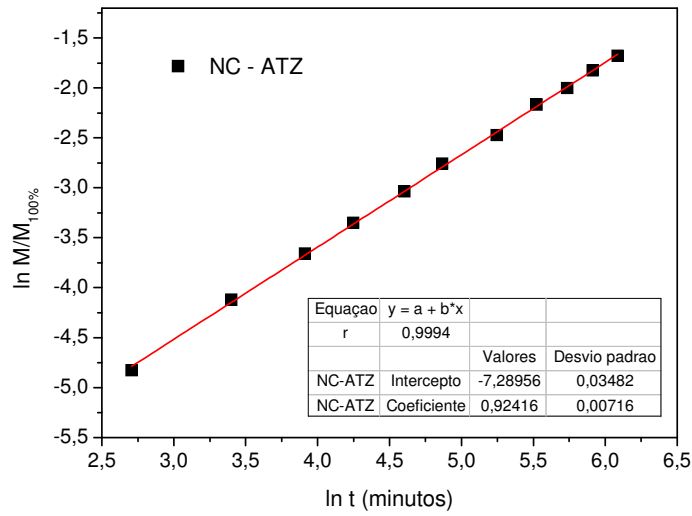
4.3.1 Modelo matemático para avaliação do mecanismo de liberação dos herbicidas a partir das nanocápsulas poliméricas

A investigação do mecanismo de liberação dos herbicidas das nanocápsulas poliméricas pode fornecer informações importantes a respeito dos fatores que governam a liberação destes ativos (POLAKOVIC *et al.*, 1999). A liberação de um herbicida associado à nanopartículas depende de vários fatores, tais como a desorção da superfície da partícula, difusão através de poros da matriz polimérica ou parede polimérica, desintegração do polímero e liberação do ativo, dissolução e erosão da matriz ou parede polimérica e conseqüentemente liberação do ativo. (POLAKOVIC *et al.*, 1999; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

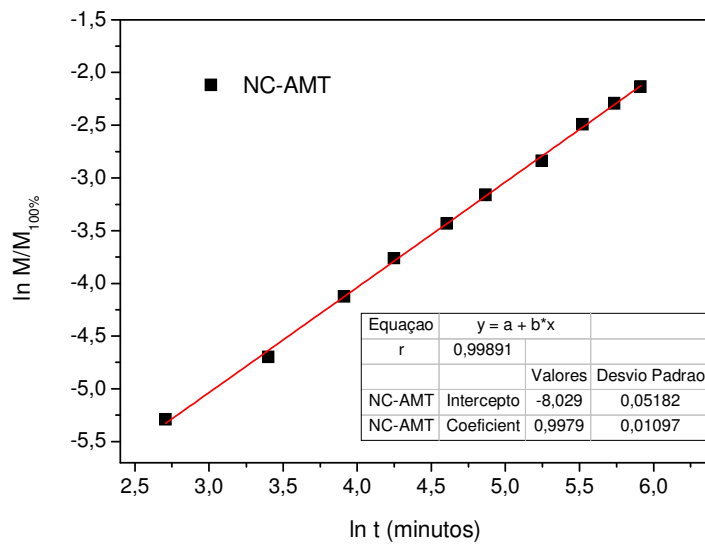
Alguns modelos matemáticos são utilizados extensivamente para analisar as características de liberação da substância ativa a partir de sistemas poliméricos (COSTA & LOBO, 2001). Um modelo que tem sido utilizado para verificar o tipo de liberação de bioativos em sistemas nanoestruturados tem sido o de Korsmeyer e Peppas, dentre vários modelos descritos na literatura (MELO *et al.*, 2010; GRILLO *et al.*, 2010a; DOMINGUES *et al.*, 2008; NAPPINNAI & KISHORE, 2007; AVACHAT & KOTWAL, 2007; FORTUNATO *et al.*, 2007; SRIAMORNSAK & SUNGTHONGJEEN, 2007).

O modelo de Korsmeyer e Peppas acaba sendo aplicado quando não se conhece nada a respeito do mecanismo de liberação do bioativo associado às nanopartículas. Neste contexto, a partir das curvas de liberação, e em função deste modelo foram realizadas regressões lineares a fim de se determinar os valores da constante cinética de liberação (k), bem como o coeficiente de correlação linear (r).

Os resultados obtidos das análises do modelo aplicado às curvas de liberação dos herbicidas nas NC de PCL, bem como os gráficos dos tratamentos estão apresentados na Figura 14 e Tabela 6.



(A)



(B)

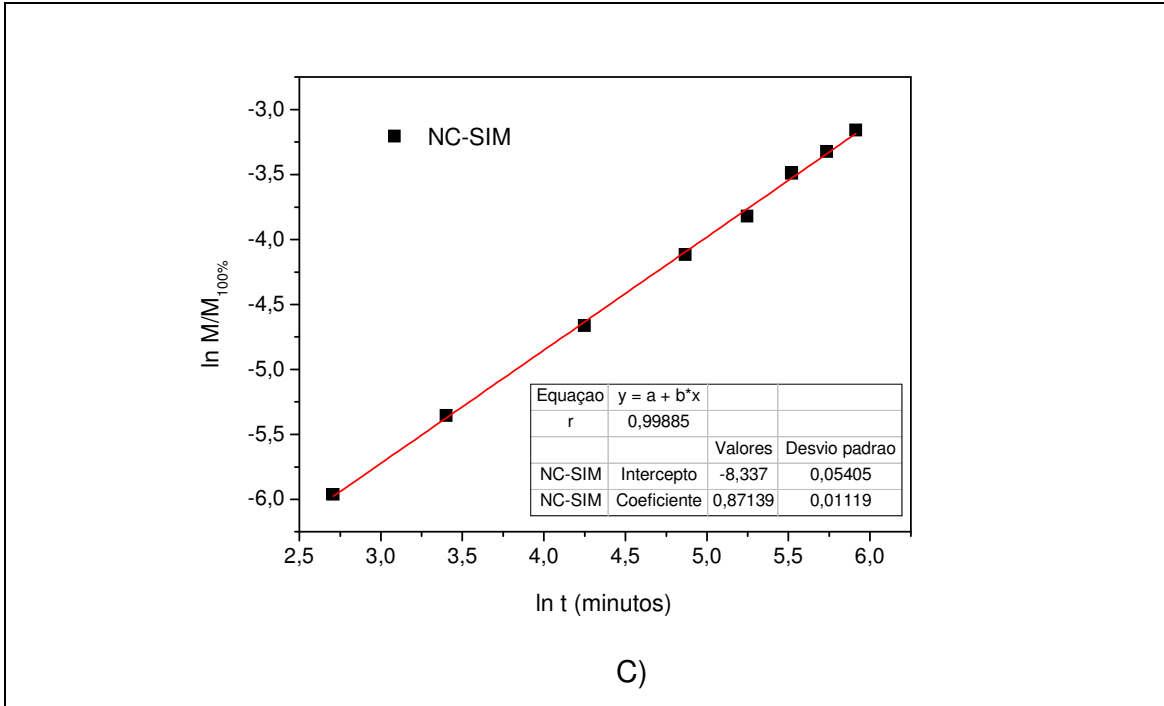


Figura 14. Resultados obtidos da análise do modelo matemático Korsmeyer-Peppas: A) NC-PCL:ATZ, B) NC-PCL:AMT e C) NC-PCL:SIM.

Tabela 6. Valores de constantes de liberação (k), expoente de liberação (n) e coeficiente de correlação (r) obtido pelos melhores ajustes das curvas das cinéticas de liberação dos herbicidas associados às nanopartículas de PCL.

Formulações	Constante de liberação (k)	Expoente de Liberação (n)	Coeficiente de correlação (r)
PCL-NC:ATZ	$6,8 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$	0,924	0,999
PCL-NC:AMT	$3,2 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$	0,997	0,998
PCL-NC:SIM	$2,4 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$	0,871	0,998

O modelo Korsmeyer-Peppas tem sido utilizado para prever qual o mecanismo que descreve a liberação de compostos bioativos de sistemas micro e nanoparticulados, e estes mecanismos podem ser por difusão do herbicida (transporte Fickiano) e/ou por transporte Caso II (não-Fickiano controlado pelo

relaxamento das cadeias poliméricas) (RITGER & PEPPAS, 1987; KORSMEYER & PEPPAS, 1991). Neste modelo leva-se em conta não só processos difusivos, mas também um componente que avalia o relaxamento da matriz polimérica como processos determinantes na liberação do herbicida.

KORSMEYER-PEPPAS (1983) determinou valores específicos de expoente de liberação, que foram: $n < 0,43$ indicam que o mecanismo que controla a liberação do herbicida no sistema polimérico é a difusão pura (difusão Fickiana clássica). Quando $n > 0,85$, a equação corresponde a liberação modificada por mecanismo de transporte de Caso II, ou seja, pelo fenômeno de intumescimento do polímero (relaxamento da matriz polimérica). Outros valores de n ($0,43 < n < 0,85$) indicam cinética de transporte anômalo, ou seja, uma combinação dos dois mecanismos de difusão e de transporte de Caso II.

Os valores de expoente de liberação para as formulações de nanocápsulas de PCL contendo ATZ, AMT e SIM foram 0,92, 0,99 e 0,87, respectivamente, indicando que o mecanismo de liberação que controla este sistema é o transporte de Caso II, ou seja, a liberação do herbicida se dá pelo relaxamento da cadeia polimérica.

Os valores de constante de liberação (k) das formulações de ATZ, AMT e SIM foram de $6,8 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$, $3,2 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ e $2,4 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$, respectivamente, e portanto desta maneira, observa-se que quanto maior são os valores de constante mais rápida ocorre a liberação do composto.

4.4 Avaliação da estabilidade físico-química das nanocápsulas contendo herbicidas

Para avaliação da estabilidade das suspensões de NC poliméricas foram determinadas algumas propriedades físico-químicas como diâmetro hidrodinâmico (tamanho), polidispersão, potencial zeta e pH em função do tempo (zero, 15, 30, 60 e 90 dias), sendo todas as formulações armazenadas em frascos âmbar e à temperatura de 25°C.

4.4.1 Tamanho e índice de polidispersão

MORA-HUERTAS *et al.*, 2010 observaram que o tamanho das nanocápsulas poliméricas está intimamente relacionado com o método de preparo delas, quando preparadas pelo método de nanoprecipitação observou a formação de nanocápsulas com tamanhos compreendidos entre 150 e 500 nm, mesmo utilizando diferentes tipo de polímeros.

Tabela 7. Valores de diâmetro (tamanho) para as formulações de nanocápsulas contendo os herbicidas, determinação em triplicata (n=3).

Tempo (dias)	NC	NC-AMT	NC-ATZ	NC-SIM
0	279,0 ± 8,7	263,2 ± 5,1	289,6 ± 17,0	231,6 ± 7,2
15	267,0 ± 12,4	231,8 ± 5,0	270,5 ± 12,7	253,7 ± 11,0
30	266,6 ± 7,3	250,6 ± 6,8	283,1 ± 3,4	261,2 ± 6,0
60	274,1 ± 5,4	267,7 ± 10,8	282,0 ± 16,6	260,8 ± 4,7
90	264,6 ± 9,4	256,8 ± 6,6	266,6 ± 10,8	261,3 ± 6,91

O diâmetro hidrodinâmico das NC sem e contendo herbicidas foram avaliados e observou que no tempo inicial todas as formulações apresentaram tamanhos compreendidos entre 232 e 290 nm (Figura 15). A tabela 7 mostra os valores de tamanho para todas as formulações e nenhuma diferença significativa no tamanho das NC foi observada com a encapsulação dos herbicidas.

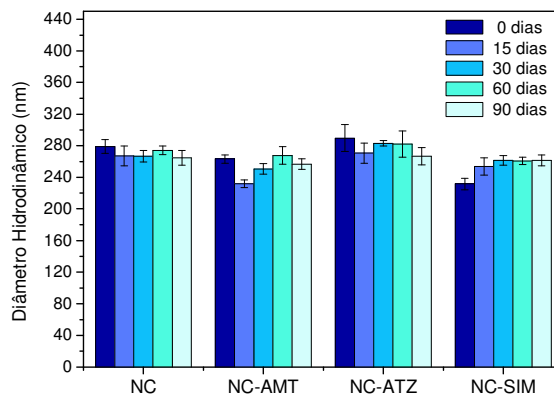


Figura 15. Distribuição do tamanho das nanopartículas de PCL contendo herbicidas analisadas durante 90 dias, temperatura de 25°C, determinação em triplicata (n=3).

As NC sem herbicidas apresentaram estáveis durante 90 dias sem qualquer alteração significativa e o mesmo ocorreu para as NC contendo herbicidas.

Todas as análises de distribuição de tamanho mostraram que as nanocápsulas apresentaram perfil monomodal, ou seja, possuíam apenas uma população de nanocápsulas (GUTERRES *et al.*, 2010). Estes dados são bastante importantes, pois quando se pretende preparar um sistema de liberação modificada, o tamanho das nanopartículas interfere no processo de liberação (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003), desta forma, quanto mais homogêneo for o sistema, maior a reprodutibilidade dos dados.

A figura 16 mostra a distribuição das nanocápsulas de PCL contendo SIM no período inicial de estabilidade (zero dias) e após 90 dias e nenhuma alteração significativa foi observada e nota-se que a intensidade máxima de distribuição de tamanho se mantém em 17% durante todo o período estudado. As mesmas análises foram realizadas para as demais nanocápsulas e os resultados obtidos foram semelhantes.

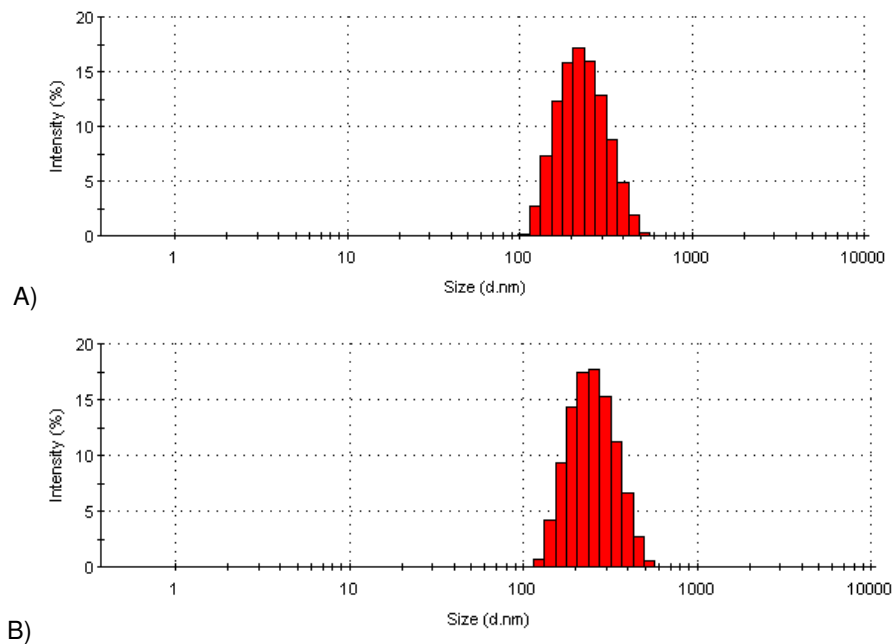


Figura 16. Distribuição de tamanho de NC-SIM em função do tempo de estabilidade: a) Tempo inicial (zero dias) e b) Tempo final (90 dias), temperatura 25°C, determinação em triplicata (n=3).

Outro parâmetro avaliado foi o índice de polidispersão, parâmetro esse que indica o quanto a distribuição de tamanho das nanopartículas desviou da distribuição média, ou seja, quanto menor o índice de polidispersão mais uniforme é a distribuição de tamanho das nanopartículas. Desta forma, valores altos de índice de polidispersão indicam não homogeneidade na distribuição de tamanho das partículas em suspensão que podem ser devido a formação de diferentes populações de tamanho de partículas, ou até mesmo decorrente da presença de agregados em suspensão. Valores de Índice de polidispersão menores que 0,2 são bons indicadores de uma boa distribuição no diâmetro das partículas (MORAES, 2009).

A figura 17 apresenta os valores de índice de polidispersão das nanopartículas de PCL contendo os herbicidas e observa-se, que todas as formulações apresentaram índice de polidispersão abaixo de 0,2, indicando uma boa homogeneidade na distribuição de tamanhos das nanocápsulas com ou sem herbicidas.

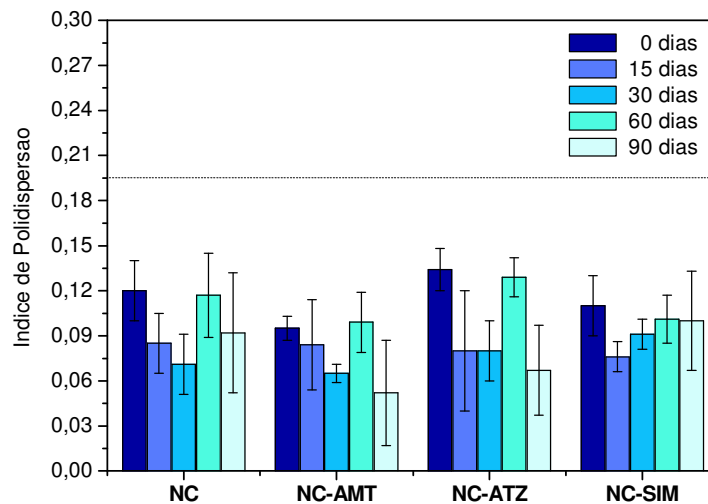


Figura 17. Valores de polidispersão avaliados em função do tempo para NC-PCL contendo herbicidas, determinação em triplicata (n=3).

Observou-se também que houve uma pequena variação nos valores do índice de polidispersão em função do tempo, no entanto estas variações podem ser devido

ao erro experimental, bem como uma pequena reorganização na distribuição do tamanho das partículas em função do tempo, porém os valores encontrados sempre foram menores que 0,2 para o índice de polidispersão.

FRIEDRICH *et al.*, 2008 prepararam nanocápsulas de PCL pelo método de nanoprecipitação de polímero pré-formado e associaram o fármaco dexametasona as nanopartículas e obtiveram valores de tamanho entre 183-252 nm, semelhantes aos apresentados neste trabalho. Os valores de polidispersão foram compreendidos entre 0,14-0,23, modificando de acordo com a concentração de princípio ativo utilizado.

MORAES *et al.*, 2010 avaliaram o tamanho de nanocápsulas poliméricas de PCL, através da execução de um planejamento fatorial, no qual variou-se alguns parâmetros de preparo das NCs, como polímero, núcleo oleoso e tensoativos. As melhores formulações resultantes deste planejamento produziram nanocápsulas com tamanho de 188 nm e índice de polidispersão abaixo de 0,1.

MELO *et al.*, 2011 prepararam diversas nanocápsulas utilizando o polímero poli (D,L-lático-co-glicólico) e estudaram a influência de diferentes óleos na estabilidade destas partículas e observaram que dependendo do óleo utilizado o tamanho e a polidispersão das partículas podem mudar, variando o tamanho entre 150-170 nm e 0,260-0,087 para o índice de polidispersão.

SCHAFFAZICK *et al.*, 2002 prepararam nanocápsulas de PCL pelo método de nanoprecipitação e utilizaram o mesmo óleo deste estudo (Miglyol 810) para compor a fase oleosa do sistema e encapsularam o fármaco diclofenaco nas NC. O tamanho médio das nanopartículas sem a encapsulação do princípio ativo foi de 271 nm, semelhante aos valores encontrados neste estudo, portanto quando encapsulado o ativo as nanocápsulas, esta aumentou de tamanho, chegando a 327 nm.

A partir dos dados apresentados nas figuras 15, 16 e 17 e através das informações contidas na literatura, pode-se dizer que as formulações de NC contendo os herbicidas até o presente momento apresentam-se estáveis.

4.4.2 Potencial Zeta

Além dos parâmetros já descritos acima, foi analisado ainda o valor de potencial zeta das nanopartículas contendo ou não herbicidas. Esse parâmetro pode ser influenciado pela composição das nanocápsulas, pelo meio dispersante, pH e força iônica do meio. (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010). Nanopartículas com zeta de aproximadamente (\pm) 30 mV são mais estáveis em suspensão (MOHANRAJ & CHEN, 2006), pois observa-se uma repulsão de cargas entre as partículas, que podem ser suficientes para impedir que as mesmas sofram agregação e desta forma coalesçam (COUVREUR *et al.*, 2002).

Estudos mostram que o potencial zeta é influenciado pela carga dos diferentes componentes das nanocápsulas, em especial tensoativos, que ficam localizados na interface com o meio de dispersão (COUVREUR *et al.*, 2002). Lecitina, poloxâmeros (TEWA-TAGNE *et al.*, 2007; TEWA-TAGNE *et al.* 2006, e os polímeros (CRUZ *et al.*, 2006) são os principais componentes que afetam este parâmetro. Muitos polímeros, especialmente os hidroxiácidos (como o PLA), os poliésteres (PCL) e lecitina, contribuem para formação de nanopartículas com valores de potenciais zeta negativos (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010). Tensoativos não iônicos, tais como poloxamer e álcool polivinílico (PVA) (PEREZ *et al.*, 2001), tendem a reduzir o valor do potencial zeta absoluto (MOSQUEIRA *et al.*, 2000).

A figura 18 mostra os valores de potencial zeta para as formulações de NC-PCL sem e contendo herbicidas e observa-se que todos os valores encontrados foram negativos e maiores que 30 mV (módulo). Para as NC sem herbicida o valor inicial foi de -33mV e para as formulações contendo herbicidas foram de -33mV para NC-AMT, de -24,1mV para NC-ATZ e -31,2mV para NC-SIM. O valor negativo do potencial zeta encontrado para as nanopartículas de PCL é devido à presença de grupos carboxílicos encontrados nas extremidades das cadeias poliméricas que quando expostas na superfície das nanocápsulas, expõem cargas negativas que fazem com que a carga líquida das partículas sejam negativas (MORA-HUERTAS *et al.* 2010). Dentre as formulações de nanocápsulas observa-se que a formulação de NC-ATZ é a que apresenta menor valor de potencial zeta (-24,1mV).

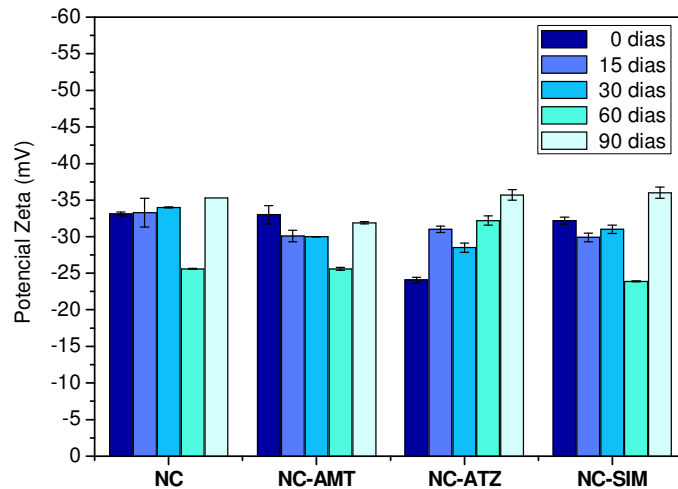


Figura 18. Valores de potencial zeta para as formulações de NC-PCL contendo os herbicidas em função do tempo, determinação em triplicata (n=3).

A figura 18 mostra ainda que os valores de potencial zeta das formulações de NC, NC:AMT e NC:SIM não apresentaram variações significativas em função do tempo, no entanto para as formulações contendo ATZ, observa-se que os valores de potencial zeta aumentaram em função do tempo o que pode ser devido a uma diminuição da interação entre o herbicida ATZ da superfície das nanocápsulas fazendo com que as cargas de superfície sejam aumentadas.

CALVO *et al.*, 1996 avaliaram o potencial zeta de nanocápsulas, nanoemulsões e nanoesferas poliméricas a fim de comparar suas cargas de superfície e foi observado que a fase oleosa contida nas nanocápsulas e nanoemulsões deixa o potencial mais negativo (-41,9 mV e -42,3 mV, respectivamente) em relação as nanoesferas (-16,3 mV), provavelmente devido ao delgado filme polimérico que se forma ao redor das gotículas de óleo da partícula. Portanto assim, pode-se explicar o alto valor de potencial zeta encontrado nas NC-PCL para os herbicidas.

4.4.3 Medida de estabilidade química do polímero (pH)

De acordo com MORA HUERTAS (2010) em geral as dispersões de nanocápsulas apresentam valores de pH compreendidos entre 3,0 e 7,5 preparadas pelo método de nanoprecipitação, porém poucos trabalhos estudam este parâmetro, apesar de ser um fator chave no controle do tamanho das partículas, potencial zeta e de sua biodistribuição. Alterações nos valores de pH podem indicar degradação das cadeias poliméricas onde os monômeros ou fragmentos em solução faz com que o valor de pH das formulações sejam alterados (CALVO *et al.*, 1996; GUTERRES *et al.*, 1995).

Neste trabalho, o pH das suspensões de nanopartículas foram avaliados em função do tempo sendo os resultados apresentados na Figura 19.

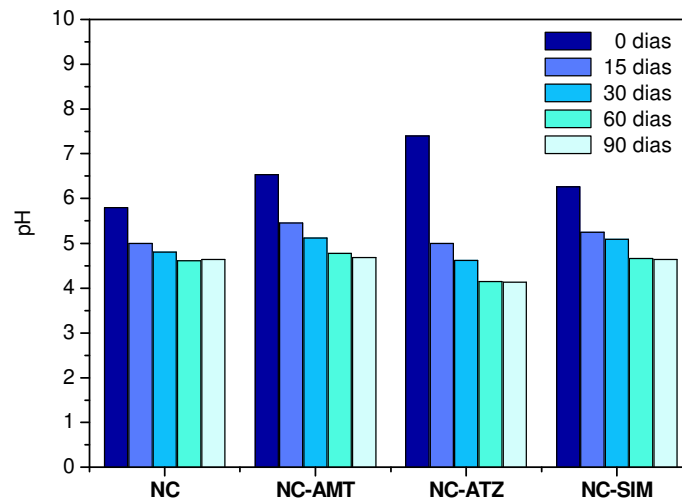


Figura 19. Perfil do pH das formulações de NC-PCL sem e contendo os herbicidas em função do tempo.

A partir da Figura 19 observa-se que para todas as formulações preparadas houve alteração nos valores de pH em função do tempo. Esta diminuição do pH pode estar relacionada com a oxidação das cadeias poliméricas, através da liberação de grupamentos carboxílicos para o meio. As nanocápsulas contendo ATZ foram as que apresentaram maior diminuição do pH no decorrer de 90 dias.

Variações de pH semelhantes foram descritas na literatura para degradação de polímeros biodegradáveis e observa-se que as maiores variações ocorreram para os polímeros (PLA) e (PCL) (POHLMANN *et al*, 2002;. CAUCHETIER *et al*, 2003; MELO *et al*, 2011).

Estas alterações observadas nos valores de pH, potencial zeta, distribuição de tamanho, índice de polidispersão podem ser indicadores que estes sistemas carreadores podem ter em função do tempo suas propriedades de liberação modificada, através de pequenas alterações na estrutura dos carreadores. No entanto, mesmo observando estas mudanças para as formulações preparadas, os dados apresentados corroboram com dados obtidos para sistemas carreadores nanoestruturados poliméricos descritos na literatura (CAUCHETIER *et al*, 2003;. ZILI *et al*, 2005;. PEREIRA *et al*, 2006;. LIMAYEM *et al*, 2006; POHLMANN *et al*, 2008, LERTSUTTHIWONG *et al*, 2008; DALENC *et al*, 1997).

FRIEDRICH *et al*, 2008 prepararam nanocápsulas de PCL e associaram o fármaco dexametasona as nanopartículas e observaram uma leve diminuição do pH das formulação no período de dois meses. Em específico, o pH da formulação de nanocápsulas utilizando óleo vegetal na fase oleosa da nanocápsulas foi de $4,85 \pm 0,30$ no primeiro mês para $3,98 \pm 0,27$ no segundo.

SCHAFFAZICK *et al*, 2002 avaliaram a estabilidade de suspensões de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas contendo o fármaco diclofenaco e observaram que em algumas formulações o pH mostrava tendência de redução com o passar do tempo. Este acontecimento ficou mais evidente quando os autores estudaram a estabilidade de nanocápsulas de eudragit-S90[®] contendo benzoato de benzila em que houve uma diminuição significativa deste parâmetro, uma vez que, o pH passou de $4,49 \pm 0,32$ para $3,88 \pm 0,17$ em 3,5 meses.

Portanto de acordo com os dados apresentados, observa-se que as nanocápsulas de PCL contendo os herbicidas apresentam valores adequados de pH e estão próximos aos encontrados na literatura.

4.4.3.1 Comportamento das nanocápsulas de PCL em diferentes pHs

As nanocápsulas poliméricas de PCL foram mantidas em soluções de diferentes pHs (2, 4, 7, 10 e 12) com a finalidade de estudar o comportamento da estabilidade destas partículas frente a diferentes concentrações hidrogeniônicas, e assim foi avaliado o diâmetro médio, a polidispersão e o potencial zeta das partículas.

A Figura 20 mostra que a variação de pH não interfere no tamanho das nanopartículas e que a polidispersão também pouco se altera, mostrando que a mudança no pH do meio não acarreta em grandes alterações no tamanho e no índice de polidispersão destas partículas.

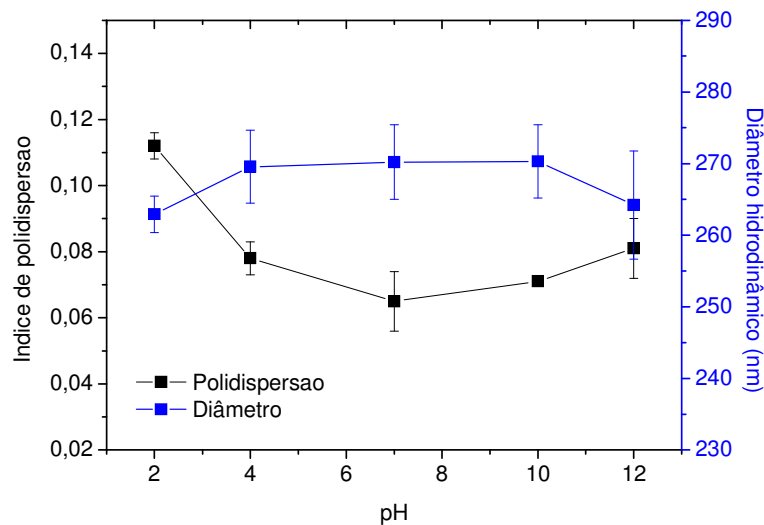


Figura 20. Variação do diâmetro hidrodinâmico e do índice de polidispersão de nanocápsulas de PCL em diferentes pH.

A figura 21 apresenta os valores de potencial zeta para nanocápsulas de PCL em diferentes pHs e observa-se que em meio básico o valor de potencial zeta das NC-PCL se torna mais negativo, isto ocorre, provavelmente devido ao aumento da concentração de hidroxila no meio (OH^-). Entretanto quando se acidifica o meio e aumenta concentração de H^+ , o potencial zeta diminui, porém continua com carga negativa ($-11,3 \text{ mV} \pm 2,2$).

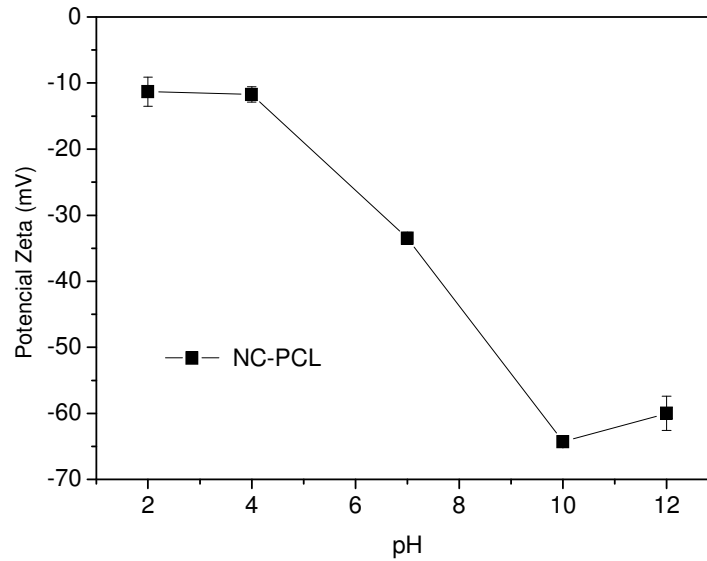


Figura 21. Valores de potencial zeta para nanocápsulas de PCL em diferentes pHs.

4.5 Avaliação da morfologia e estrutura das nanocápsulas poliméricas

4.5.1 Microscopia de força atômica

Para verificar os aspectos morfológicos das nanocápsulas de PCL sem e contendo os herbicidas foi utilizada a técnica de microscopia de força atômica e soluções de nanocápsulas foram depositadas e secas sobre um suporte de silício, conforme descrito em métodos item 3.2.6.1.2. As imagens foram coletadas para NC e NC contendo o herbicida AMT e são apresentadas na figura 22.

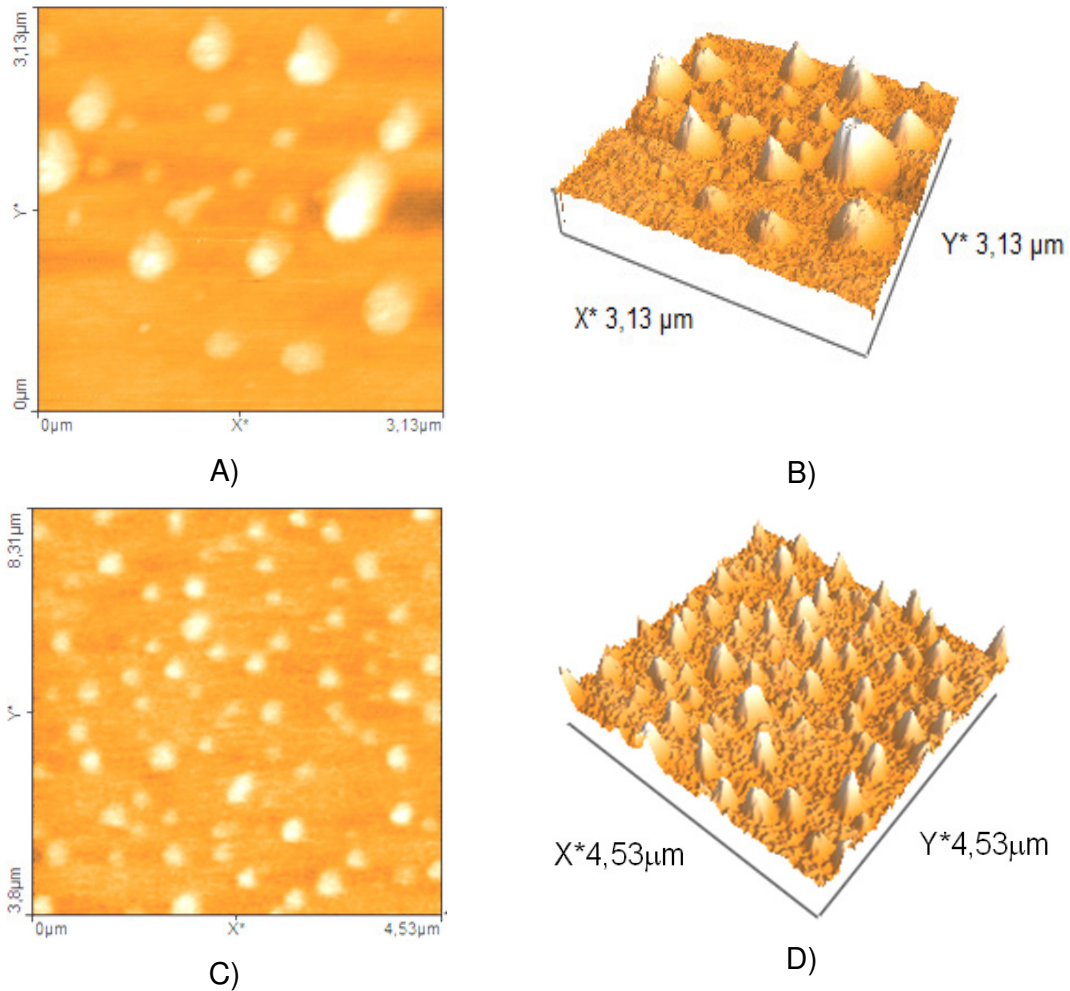


Figura 22. Imagens de microscopia de força atômica das nanocápsulas de PCL: A) NC sem herbicida (2D), B) NC sem herbicida (3D), C) NC-PCL:AMT (2D) e D) NC-PCL:AMT (3D).

A análise das imagens de MFA das nanocápsulas de PCL sem herbicida (Figura 22 - A e B) e contendo o herbicida ametryn (Figura 22 - C e D) mostra que as partículas apresentam-se esféricas com distribuição de tamanho uniforme, não sendo observada a presença de agregados. O tamanho médio das partículas está compreendido entre 200-300 nm. Assim como para as demais formulações apresentaram características semelhantes (dados não mostrados).

CUN *et al.*, 2011 prepararam nanopartículas de PLGA contendo RNAi e utilizaram MFA para avaliar o tamanho e a morfologia destas nanopartículas e

observaram tamanhos entre 218 nm e 258 nm, sem agregados e com características esféricas.

SHAHGALDIAN *et al.*, 2003 preparam géis utilizando quatro tipos de reagentes (carbopol 980, carbopol 2020, ácido hialurônico e xantanas) contendo dispersões de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e as micrografias mostraram que as nanopartículas estavam dispersas no gel, com partículas entre 150 nm de diâmetro sem nenhuma agregação.

SILVA *et al.*, 2010 preparam nanopartículas poliméricas de alginato/quitosana e alginato/AOT contendo o herbicida clomazone e utilizaram MFA para avaliar a morfologia das nanopartículas, observando partículas esféricas sem agregados. BUNIO *et al.*, 2011 também prepararam nanopartículas poliméricas com tamanho entre 165-220 nm, utilizando um novo tensoativo polimerizável e a fim de avaliar a morfologia das partículas foi utilizado microscopia de força atômica.

4.5.2 Microscopia eletrônica de transmissão

A morfologia das nanopartículas de PCL foi analisada também por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 23).

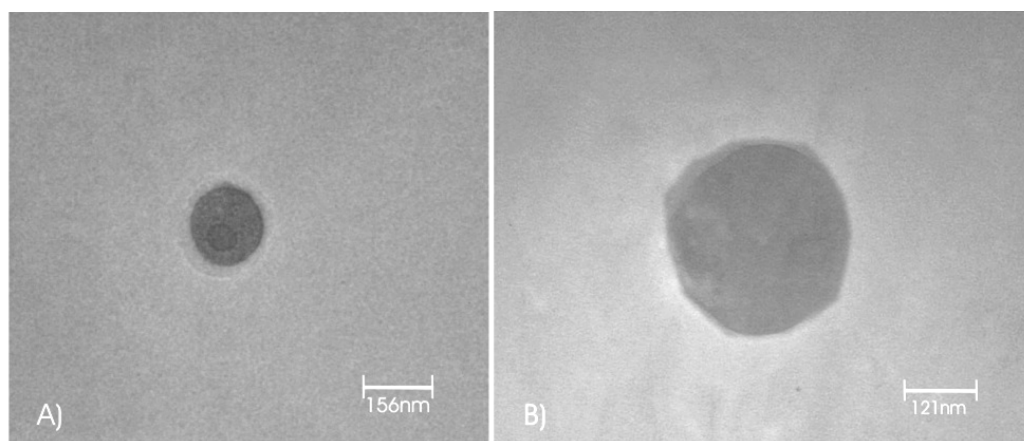


Figura 23. Micrografia de nanocápsulas polimérica de PCL: A) Aumento de 30.000 vezes e B) Aumento de 100.000 vezes.

A análise da micrografia obtida para as NC de PCL mostra que estas, assim como observados por MFA, são esféricas e não apresentam agregados. O tamanho

das nanocápsulas está compreendido entre 160 e 250 nm, observa-se que este valor é um pouco menor que os encontrados por espectroscopia de correlação de fótons (ECF), que foi de, aproximadamente 280 nm. Esta diferença de tamanho é devido à técnica de ECF medir o diâmetro hidrodinâmico da partícula, enquanto que o MET avalia as partículas secas, ou seja, no processo de microscopia as nanopartículas sofrem o fenômeno de desidratação e por isto ocorre a redução em seu tamanho. A mesma observação ocorreu para o estudo de SILVA *et al.*, 2011 em que nanopartículas de alginato/quitosana contendo o herbicida paraquat foram preparadas.

GUINEBRETIERE *et al.*, 2002 observaram a morfologia de nanocápsulas de PCL por coloração negativa e obtiveram valores de tamanho entre 200 e 1200 nm e observaram ainda que a espessura da parede da NC possuía cerca de 1-2nm.

FERNÁNDEZ-PÉREZ *et al.*, 2011 também utilizaram esta técnica para visualizar a morfologia de grânulos de lignina revestidos com etilcelulose contendo o herbicida cloridazona e observaram uma uniformidade e alta aderência do revestimento.

4.6 Caracterização por espectroscopia na região do infravermelho

As atribuições dos modos vibracionais observados nos espectros no infravermelho das amostras de herbicidas (ATZ, AMT e SIM) foram comparadas com as amostras de nanocápsulas de PCL sem e contendo os herbicidas, a fim de observar evidências na associação entre o herbicida e a cadeia polimérica das nanocápsulas.

A figura 24-A apresenta o espectro na região do infravermelho do herbicida ametrina e observa-se a existência de três bandas específicas, em 3240 cm^{-1} ocorre o estiramento da ligação N-H, referente a função amina presente na estrutura do herbicida, em 2960 cm^{-1} estiramento da ligação C-H do grupamento alquila e em 1520 cm^{-1} deformação angular da ligação N-H das aminas. A Figura 24-B (nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) sem herbicida) apresentou bandas no comprimento de onda de 3340 cm^{-1} , referente ao estiramento da ligação O-H, em 2960 cm^{-1} estiramento da ligação C-H do grupamento alquila, em 1740 cm^{-1}

estiramento da ligação C=O da função éster e em 1190 cm^{-1} deformação angular C-O. A Figura 24-C (nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona contendo AMT) apresentou bandas semelhantes ao espectro das nanocápsulas sem herbicida (Figura 23-B), portanto, é possível prever uma associação do herbicida com a nanocápsula polimérica.

Na região de 3340 cm^{-1} , a presença do grupamento O-H na estrutura, mostrado pela Figura 24 (B e C), muito provavelmente deve-se a interferência da banda de OH da água utilizada na formulação.

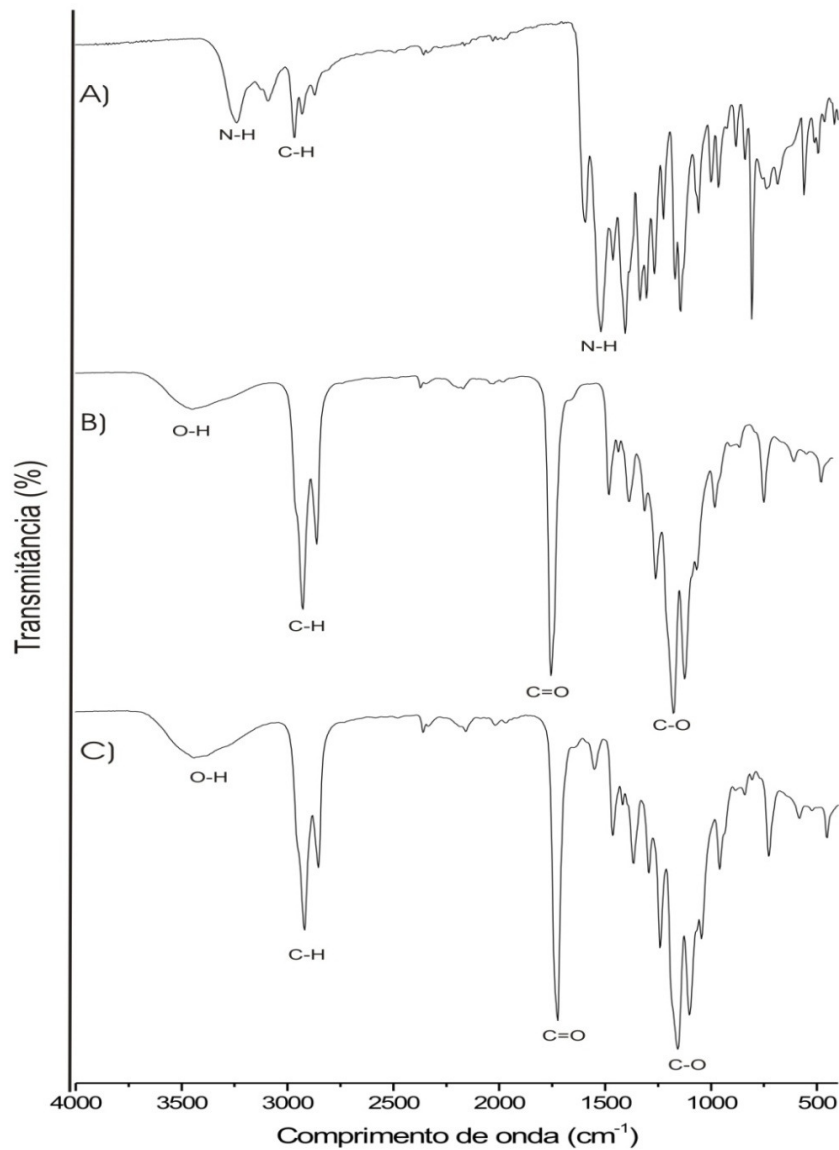


Figura 24. Espectro de absorção no infravermelho na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} para amostra de: A) ametrina; B) NC-PCL; C) NC-PCL:AMT.

SILVA *et al.*, 2011 também investigaram a interação do herbicida paraquat com nanopartículas de alginato/quitosana por espectroscopia de infravermelho, e neste estudo os autores mostraram que algumas bandas de absorção do herbicida paraquat foram alteradas quando avaliado o herbicida associado às nanopartículas, indicando uma possível interação das cargas positivas do paraquat com as cargas negativas presentes no polímero alginato presente na composição das nanopartículas.

4.7 Nanopartículas de PCL revestidas com quitosana contendo atrazina

Após preparar e caracterizar as formulações de nanocápsulas de PCL contendo os herbicidas triazínicos (ATZ, AMT e SIM), uma nova etapa foi realizada, a fim de abrir uma nova perspectiva para a liberação modificada de bioativos.

Nanocápsulas de PCL foram revestidas com o polímero quitosana, de acordo com a metodologia descrita no item 3.2.2.1. Neste método o polímero catiônico (quitosana) se liga por interações eletrostáticas com os grupamentos negativos (carboxílicos) das nanocápsulas e desta forma ocorrendo o revestimento das nanocápsulas com as moléculas do polímero quitosana (Figura 25).

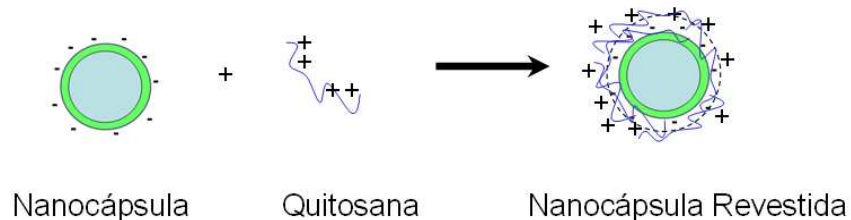


Figura 25. Representação esquemática da conformação das cargas das nanocápsulas revestidas com o polímero quitosana.

Alguns trabalhos na literatura abordam esta técnica como sendo bastante eficiente (CALVO *et al.*, 1997; PREGO *et al.*, 2006), pois com o revestimento das nanopartículas, novas interações podem ocorrer com o meio, já que sua carga de superfície é alterada.

CALVO *et al.*, 1997 revestiram nanocápsulas de poli (L-lisina) e poli(ϵ -caprolactona) com quitosana e associaram o fármaco antiinflamatório indometacina

nestas partículas, a fim de desenvolver um novo sistema de liberação modificada para aplicação ocular. Este sistema foi revestido com quitosana para aumentar a muco adesão destas partículas, já visto que o epitélio da córnea é negativamente carregado. Neste sistema o revestimento não alterou o perfil de liberação do composto bioativo, porém aumentou significativamente a quantidade de fármaco na região ocular em comparação com o produto comercial.

4.7.1 Eficiência de encapsulação da atrazina em nanocápsulas revestidas

Nanocápsulas de PCL revestidas com quitosana (NC-PCL-QUIT) foram preparadas e foram adicionadas a diferentes formulações de NC-PCL, com a finalidade de revesti-las e observar mudanças na taxa de encapsulação, no perfil de cinética de liberação *in vitro* e nos parâmetros de estabilidade. Em função da diluição da amostra as concentrações finais de quitosana nas formulações foram de 0 µg/mL, 0,8 µg/mL, 10µg/mL, 20µg/mL, 30µg/mL e 40µg/mL.

A tabela 8 mostra os valores de eficiência de encapsulação das formulações revestidas e observa-se que as nanocápsulas sem quitosana (0 µg/mL) tiveram a maior eficiência de encapsulação (86,7 %). O segundo maior valor de eficiência de encapsulação foi observado para as nanocápsulas contendo 40 µg/mL de quitosana. Observa-se na tabela 6 que as formulações contendo menores concentrações de quitosana tiveram encapsulação próxima aos 70%.

Tabela 8. Valores de eficiência de encapsulação das nanocápsulas de PCL revestidas com diferentes concentrações de quitosana contendo atrazina.

Amostras [Quitosana]	Eficiência de Encapsulação
NC-PCL-QUIT [0 µg/mL]	86,7 %
NC-PCL-QUIT [8 µg/mL]	64,1 %
NC-PCL-QUIT [10 µg/mL]	67,0 %
NC-PCL-QUIT [20 µg/mL]	64,7 %
NC-PCL-QUIT [30 µg/mL]	65,9 %
NC-PCL-QUIT [40 µg/mL]	72,8 %

As variações nas eficiências de encapsulação mostram que com o aumento da quantidade de quitosana adicionada às formulações observaram-se uma diminuição no valor da eficiência de encapsulação (exceto para as concentrações de 0 $\mu\text{g/mL}$ e 40 $\mu\text{g/mL}$ de quitosana), tal fato pode ser devido a uma diminuição da quantidade de moléculas de ATZ na superfície das partículas devido a interação entre o polímero quitosana e a superfície das nanocápsulas de PCL (Tabela 8). No entanto, para as maiores concentrações de quitosana o que pode ter ocorrido é que devido a este polímero proporcionar um maior revestimento (conforme discutido a seguir) as moléculas de ATZ podem estar interagindo com ambos os polímeros e desta forma um ligeiro aumento na taxa de encapsulação foi observada. No entanto para provar esta hipótese teríamos que realizar uma melhor investigação dos fatores que governam a interação ATZ, quitosana, nanocápsulas de PCL.

4.7.2 Cinética de liberação *in vitro*

Os ensaios de cinética de liberação foram realizados utilizando a metodologia proposta no item 3.2.4 e todos os resultados foram analisados por CLAE. Os valores das áreas dos cromatogramas foram transferidos em porcentagem e em seguida foram plotados em relação à porcentagem de liberação da ATZ versus o tempo.

A figura 26 mostra o perfil de cinética de liberação da ATZ nas nanocápsulas revestidas em função do tempo e das diferentes concentrações utilizadas para o preparo. Observa-se que em comparação com a ATZ apenas, todas as formulações se mantiveram seus perfis de liberação diminuídos em função do tempo. As formulações de NC sem revestimento e a NC revestida com a maior quantidade de quitosana tiveram perfis de liberação semelhantes e mais lentos em relação às outras concentrações de quitosana utilizadas.

Estes resultados podem ser explicados em função das diferenças nos valores de eficiência de encapsulação apresentados na Tabela 8. Já a formulação com menor concentração de quitosana (8 $\mu\text{g/mL}$) foi a que apresentou o perfil mais rápido de liberação de todas as formulações. Analisando estes dados pode-se concluir que baixas concentrações de quitosana desestabilizam o sistema nanoparticulado e faz com que a liberação seja mais acelerada, ou seja, devem

remover as moléculas de ATZ que ficam na superfície das NC de PCL o que faz com que a liberação seja mais rápida.

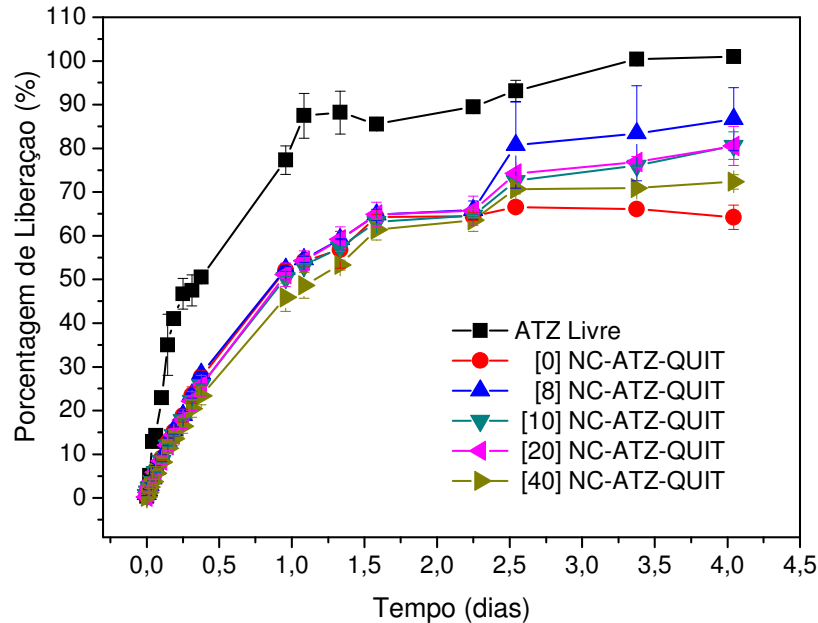


Figura 26. Cinética de liberação *in vitro* das nanocápsulas de PCL revestidas com diferentes concentrações de quitosana, temperatura de 25°C, determinação em triplicata (n=3).

Alguns autores utilizam um parâmetro chamado de eficiência de liberação para avaliar a porcentagem de liberação de um sistema nanoparticulado, este parâmetro consiste em comparar a área total do retângulo (100% de liberação), pela área sob a curva do real perfil de liberação (COSTA E LOBO, 2001; GRILLO *et al.*, 2010b). A eficiência de liberação foi calculada e os valores apresentados na tabela 9.

Tabela 9. Valores de eficiência de liberação das formulações de NC-PCL revestidas com quitosana.

Formulações [quitosana]	Eficiência de Liberação (EL)
NC-ATZ [0 µg/mL]	56,2 % ± 1,2
NC-ATZ [8 µg/mL]	63,9 % ± 0,9
NC-ATZ [10 µg/mL]	59,8 % ± 0,8
NC-ATZ [20 µg/mL]	60,0 % ± 1,1
NC-ATZ [40 µg/mL]	56,5 % ± 0,5

Através dos valores de EL (Tabela 9) observou-se que as formulações contendo 0 µg/mL e 40 µg/mL de quitosana apresentaram perfis semelhantes de liberação, mostrando que ambas retardaram em 43,5 % a liberação do herbicida ATZ em todo o tempo de estudo.

Valores entre 75% e 87% de EL foram encontrados na literatura para micropartículas poliméricas contendo ametrina, se mostrando semelhante com a eficiência destas nanocápsulas poliméricas (GRILLO *et al.*, 2011).

4.7.2.1 Modelo matemático para avaliação do mecanismo de liberação

Com o objetivo de investigar o mecanismo de liberação das diferentes nanocápsulas revestidas contendo ATZ, foi aplicado o modelo teórico de KORSMEYER-PEPPAS conforme já descrito anteriormente no item 3.2.4.1 (COSTA & LOBO, 2001). A partir das curvas de liberação foram feitas as regressões lineares para determinação dos coeficientes de correlação (r) e constante de liberação (k). Os resultados obtidos a partir da Figura 27 encontram-se na Tabela 10.

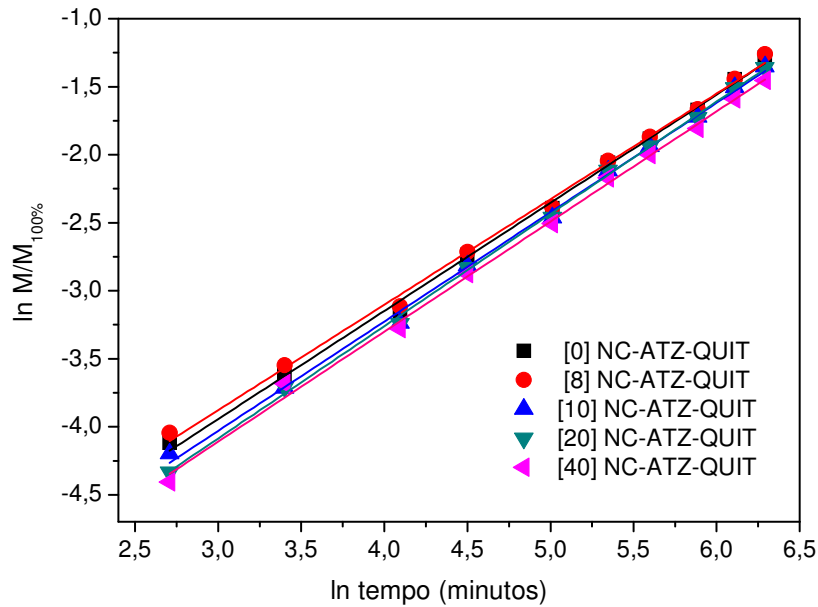


Figura 27. Resultados obtidos usando o modelo matemático de Korsmeyer-Peppas para as NC revestidas contendo diferentes concentrações de quitosana.

Tabela 10. Valores de constantes de liberação (k), expoente de liberação (n), coeficiente de correlação (r) obtido pelos melhores ajustes das curvas das cinéticas de liberação do herbicida associado às nanocápsulas revestidas de PCL.

Formulações [quitosana]	Constante de liberação (k)	Expoente de Liberação (n)	Coeficiente de correlação (r)
NC-ATZ [0 ug/mL]	$1,7 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$	0,85	0,997
NC-ATZ [8 ug/mL]	$2,0 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$	0,77	0,998
NC-ATZ [10 ug/mL]	$1,5 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$	0,80	0,997
NC-ATZ [20 ug/mL]	$1,4 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$	0,82	0,998
NC-ATZ [40 ug/mL]	$1,4 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$	0,81	0,997

A análise das curvas de liberação após o tratamento matemático de Korsmeyer-Peppas forneceu valores de constante (k) entre $1,4 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ e $2,0 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$, mostrando que quando maior o valor de constante mais rápido ocorre a

liberação do herbicida. Os valores de expoente de liberação (n) ficaram compreendidos entre 0,77 e 0,85, mostrando que a liberação do bioativo de dentro das nanocápsulas ocorreu por combinação entre os mecanismos de difusão (não fickiano) e relaxamento das cadeias poliméricas, mostrando que o sistema revestido alterou o mecanismo de liberação das nanocápsulas de PCL.

4.7.3 Avaliação da estabilidade físico-química das nanocápsulas revestidas

Para a avaliação da estabilidade das suspensões de NC de PCL revestidas com quitosana foram avaliadas algumas propriedades físico-químicas como tamanho, polidispersão, potencial zeta e pH em função do tempo (zero, 15, 30, 60 e 90 dias), sendo todas as amostras armazenadas em frascos âmbar e a temperatura de 25°C.

A Figura 28 mostra o diâmetro hidrodinâmico das nanocápsulas sob o efeito de diferentes concentrações de quitosana e observa-se que em todas as formulações contendo quitosana o tamanho foi aumentado, evidenciando a formação de revestimento. No tempo inicial (zero dias) as nanopartículas contendo 8 µg/mL e 10 µg/mL apresentaram tamanho acima do encontrado na literatura para estes tipos de nanopartículas (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010). Desta forma, pode-se justificar a liberação mais rápida para estas formulações, já que diversos autores descrevem que o tamanho das nanopartículas influencia na liberação do composto bioativo (RAO *et al.*, 2011).

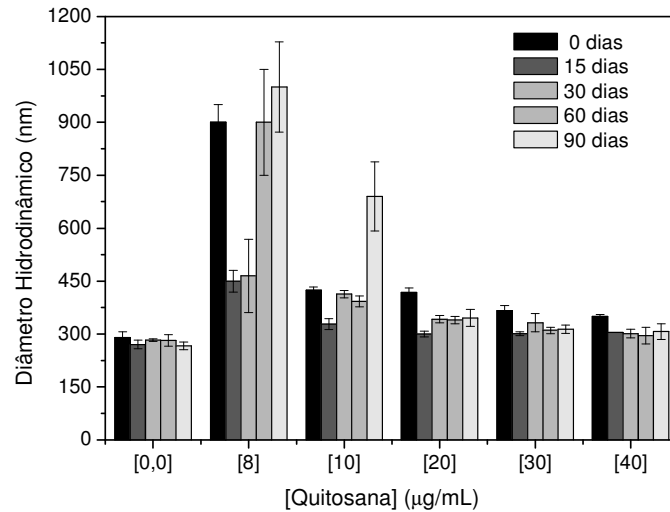
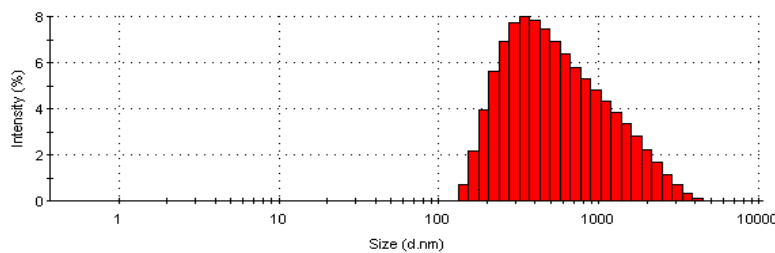
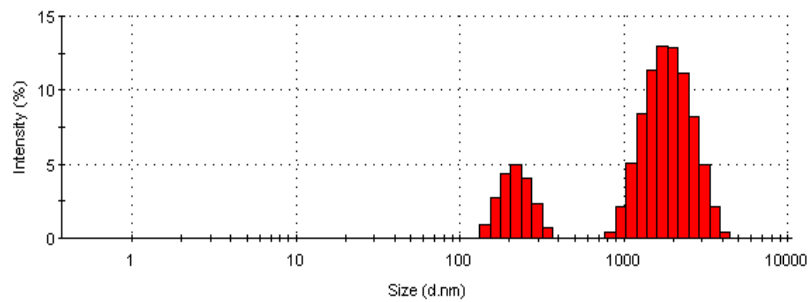


Figura 28. Distribuição do tamanho médio das nanopartículas de PCL revestidas com diferentes concentrações de quitosana contendo atrazina em função do tempo, em temperatura de 25°C, determinação em triplicata (n=3).

Para as formulações de NC sem revestimento (0 µg/mL de quitosana) o tamanho médio foi de 278 nm ± 9,51 e não houve diferença significativa dentro o período estudado, mostrando ser uma formulação bastante estável com apenas uma distribuição de tamanho.

Para as formulações com menor quantidade de quitosana (8 µg/mL e 10 µg/mL) observou que com o passar do tempo as formulações ficaram ainda maiores e apresentaram diferentes populações em sua distribuição de tamanho. A figura 29 representa a distribuição de tamanho das nanocápsulas revestidas com 8 µg/mL de quitosana.





B)

Figura 29. Distribuição de tamanho das nanocápsulas de PCL revestidas com quitosana (8 µg/mL) cotendo atrazina: a) tempo de zero dias, b) tempo de 90 dias.

Destaca-se que para os sistemas com menores concentrações de quitosana observa-se as maiores variações e erros experimentais, indicando assim que estes sistemas apresentam uma maior instabilidade, o que justifica a liberação mais rápida do herbicida ATZ das formulações, conforme discutimos na figura 25.

A figura 30 apresenta uma micrografia eletrônica de varredura das nanopartículas revestidas com 8 µg/mL de quitosana e é possível observar a presença de alguns agregados e de uma partícula bem maior que o normal para um sistema nanoparticulado, confirmando os dados apresentados na Figura 28 e 29.

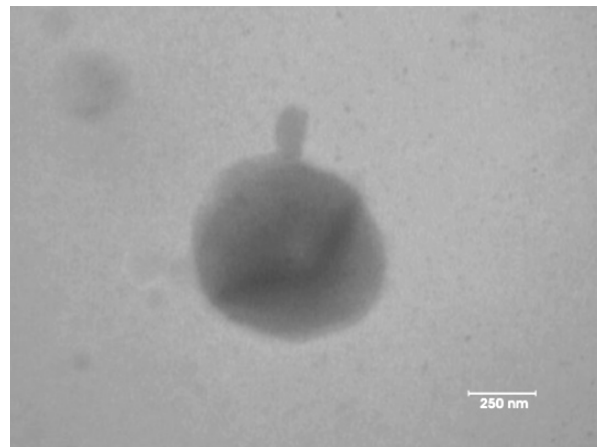


Figura 30. Micrografia de nanocápsulas polimérica de PCL revestidas com 8µg/mL de quitosana, aumento de 30.000 vezes.

Já para as formulações contendo maiores concentrações de quitosana (20 $\mu\text{g/mL}$, 30 $\mu\text{g/mL}$ e 40 $\mu\text{g/mL}$) foram observados tamanhos próximos aos encontrados para as nanocápsulas sem revestimento e uma distribuição única de tamanho (Figura 31).

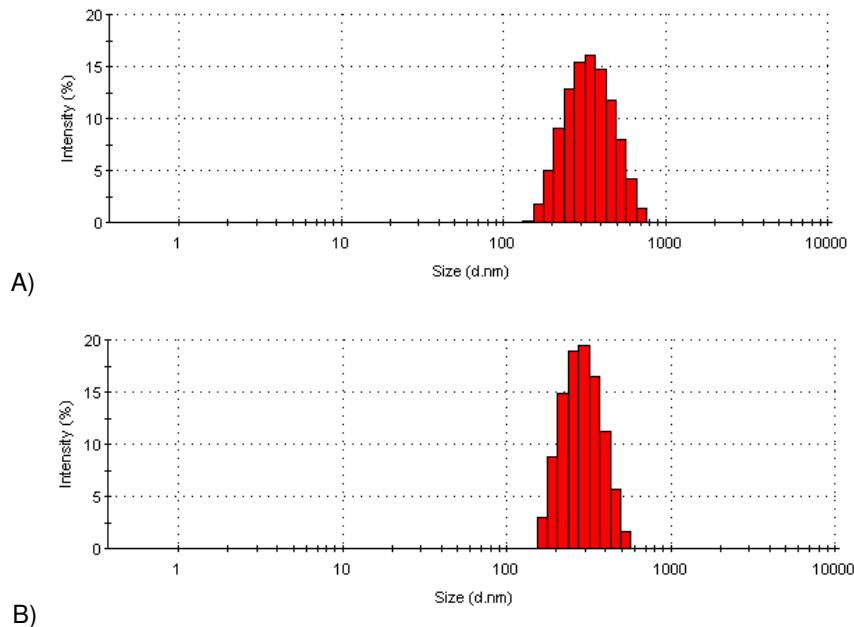


Figura 31. Distribuição de tamanho das nanocápsulas de PCL revestidas com quitosana (40 $\mu\text{g/mL}$) contendo atrazina: a) tempo de zero dias, b) tempo de 90 dias.

A avaliação do tamanho das nanocápsulas revestidas trouxe importantes informações, quanto à interação da quitosana com a parede polimérica da nanocápsula. Os experimentos mostraram que baixas concentrações de quitosana deixaram as partículas maiores e com baixa estabilidade em função do tempo, provavelmente devido a formação de agregados e conforme aumentou-se a concentração de quitosana as partículas foram revestidas com maior intensidade permanecendo mais estáveis e com tamanho regular.

A polidispersão também foi avaliada e observou que a maioria das formulações apresentou índice de polidispersão abaixo de 0,2, valor preconizado na literatura (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010), mostrando que as nanopartículas são homogêneas e estáveis. Apenas as formulações de NC revestidas com 8 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$ de quitosana apresentaram índice acima de 0,3, mostrando ser um

sistema com distribuição de tamanhos diferentes, dados este confirmados pelos resultados apresentados na figura 32.

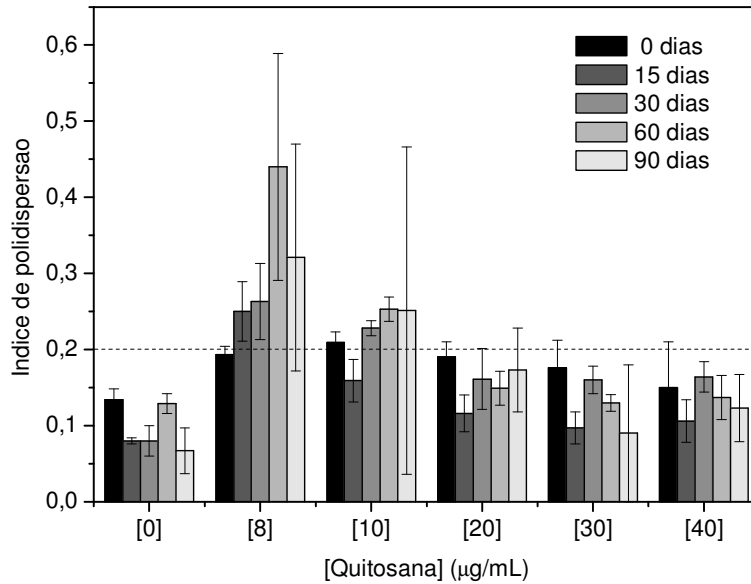


Figura 32. Valores de polidispersão avaliados em função do tempo para NC-PCL contendo herbicidas, determinação em triplicata (n=3).

Outro parâmetro investigado foi o potencial zeta, que analisa as cargas das superfícies de partículas. Este instrumento de análise foi muito importante para entender em que momento as nanocápsulas foram revestidas e quais delas apresentaram menor quantidade de agregados. Os valores de potencial zeta devem ser elevados, como preconizado na literatura (acima de +/- 30 mV), pois assim as partículas tendem a se repelir entre si, gerando uma suspensão mais estável sem agregados.

O potencial zeta foi avaliado para as formulações de NC revestidas contendo ATZ e um fato interessante foi observado. Quando analisada a formulação de NC sem revestimento (0 µg/mL de quitosana), observou valores de potencial zeta próximos a -40 mV, devido a presença dos grupamentos carboxílicos do polímero PCL. Porém quando avaliadas as formulações contendo quitosana, estas apresentaram valores positivos e crescentes de acordo com a quantidade de

quitosana adicionada em cada formulação (Figura 33), evidenciando a formação das nanocápsulas revestidas.

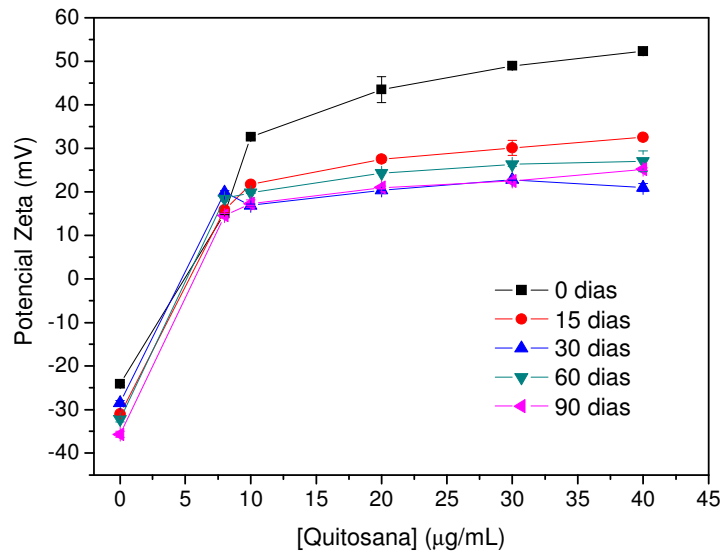


Figura 33. Potencial zeta (mV) das nanocápsulas revestidas com diferentes concentrações de quitosana em função do tempo (zero, 15, 30, 60 e 90 dias) contendo atrazina.

A figura 33 mostra que com o passar do tempo o valor de potencial zeta diminui, evidenciando a degradação do polímero, fato este, reportado na literatura (MELO *et al.*, 2011).

O pH também foi avaliado e foi observado que as formulações de NC revestidas apresentaram pH próximos a 3 e não mudaram significativamente durante 90 dias (Figura 34), provavelmente devido a solução de quitosana adicionada as formulações estarem já em pH ácido, fez com que a degradação do polímero não fosse evidenciada..

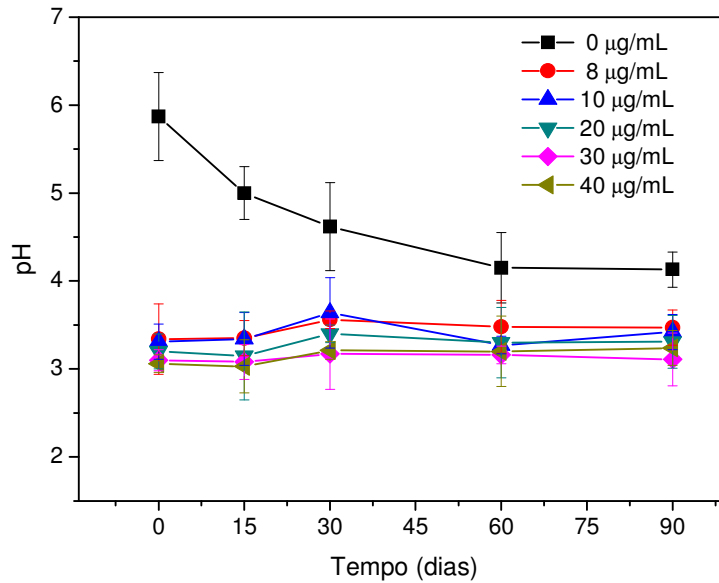


Figura 34. Valores de pH nas nanocápsulas revestidas em função do tempo (zero, 15, 30, 60 e 90 dias).

Avaliando todos os dados de estabilidade, foi possível construir um gráfico relacionando o tamanho das partículas com o potencial zeta e este revelou dados importantes para a caracterização destas nanocápsulas poliméricas (Figura 34). Conforme as formulações receberam quantidades crescentes de quitosana, estas aumentaram o seu valor de potencial zeta de forma crescente, entretanto houve uma variação no tamanho, ou seja, em baixas concentrações de quitosana o tamanho aumentou e em maiores concentrações diminuiu (Figura 35-A). Este fenômeno pode ser explicado devido ao baixo potencial zeta das nanocápsulas revestidas com baixa concentração de quitosana, ou seja, as formulações com baixo potencial zeta se agregaram e formaram partículas grandes (Figura 30), que causaram uma liberação mais acelerada, uma polidispersão alta, conforme citado anteriormente. CALVO *et al.*, 1997 preparam nanocápsulas revestidas de Poli(L-lático) (PLL) e PCL e obtiveram os mesmos valores.

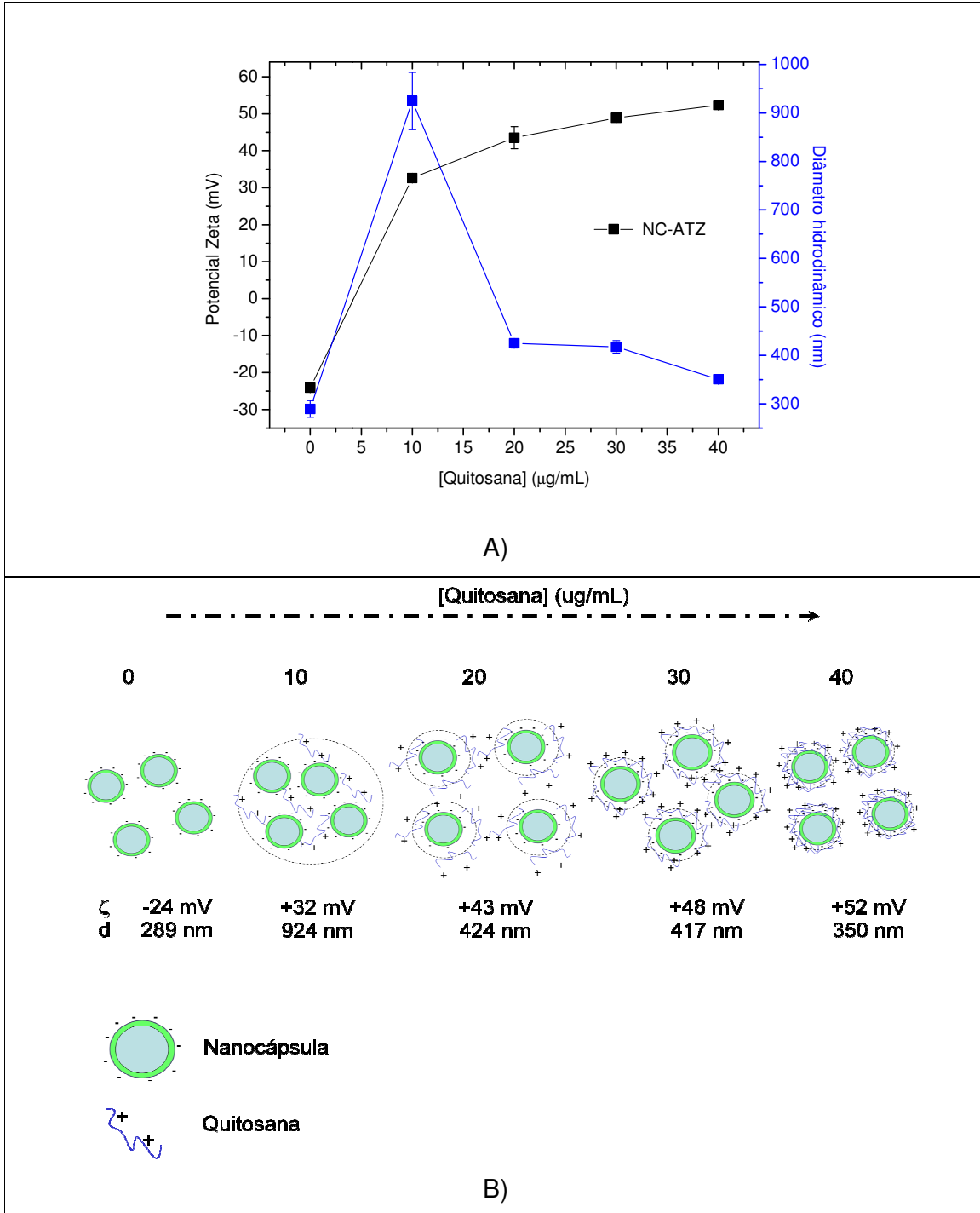


Figura 35. A) Dados de potencial zeta e tamanho das nanocápsulas revestidas contendo ATZ em função da concentração de quitosana e B) Representação esquemática das nanopartículas sendo revestidas por diferentes concentrações de quitosana. Conforme aumenta a concentração de quitosana as partículas ficam com

maior quantidade de cargas na superfície e então minimiza a formação de agregados por interações eletrostáticas.

A figura 35-b representa o que acontece em cada etapa de revestimento da NC de PCL contendo ATZ. Em um primeiro momento pouca concentração de quitosana é adicionada na formulação, causando formação de agregados e baixa estabilidade na suspensão, como demonstrado na Figura 28, 29 e 30. Quando a concentração de quitosana é aumentada observa-se que as moléculas de quitosana revestem as nanocápsulas e forma uma concentração de cargas elevadas na superfície, distanciando as NC por efeitos eletrostáticos, tornando a formulação mais estável e com um tamanho menor de partícula.

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho forneceu informações importantes referentes ao desenvolvimento de um sistema de liberação modificada para herbicidas triazínicos (AMT, ATZ e SIM) utilizando nanocápsulas de PCL normais e revestidas com quitosana, obtidas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado.

As suspensões de NC poliméricas foram preparadas e uma eficiência de encapsulação acima de 84% foi observada para as NC de PCL. O perfil de cinética de liberação dos herbicidas encapsulados nas NC foi mais devagar, quando comparados com o herbicida livre e o herbicida simazina foi o que apresentou perfil mais lento. O mecanismo de liberação foi dado pelo relaxamento das cadeias poliméricas. As nanocápsulas de PCL contendo os herbicidas apresentaram tamanho compreendido entre 232nm e 290 nm, polidispersão abaixo de 0,2 e potencial zeta de -30 mV e as formulações apresentaram-se estáveis durante 90 dias. As análises de microscopia mostraram que as nanocápsulas apresentaram-se esféricas com distribuição de tamanho uniforme, sem presença de agregados. As análises de infravermelho mostraram que os herbicidas estão associados as nanopartículas poliméricas.

As formulações de NC revestidas com quitosana contendo ATZ tiveram eficiência de encapsulação acima de 64% e mudanças neste valor ocorreram com alterações na concentração de quitosana. O perfil de liberação mostrou-se lento e sustentado em comparação com o herbicida livre e observou que quanto maior a quantidade de quitosana, mais lento ele se torna. O mecanismo de liberação foi dado pela difusão não fickiana e relaxamento das cadeias poliméricas. O tamanho e polidispersão foram altos para NC revestidas com baixa concentração de quitosana e menores para as formulações com maior concentração. O potencial zeta das formulações foi modificado de negativo para positivo com a adição de quitosana, evidenciando a mudança na conformação da parede polimérica. Este estudo abre novas perspectivas para um sistema de liberação modificada para herbicidas, uma vez que a maior eficácia dos nanoherbicidas abre novas possibilidades para o controle de pragas em plantações, podendo produzir um

menor impacto ambiental, bem como uma diminuição da quantidade de insumos a ser utilizado pelo uso destes sistemas carreadores.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES FILHO JP. **Uso de agrotóxicos no Brasil: controle social e interesse corporativo**. Annablume, São Paulo, 2002.
- ALVES, C.F.; MELO, N.F.S; FRACETO, F.C.; ARAÚJO, D.R.; NAPIMOGA, M.H. Effects of 15d-PGJ2-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanocapsules on inflammation. **British Journal of Pharmacology**, 2011, in press.
- AOUADA, F. A.; CHIOU, B.S; ORTS, W.J.; MATTOSO, L.H.C. Physicochemical and Morphological Properties of Poly(acrylamide) and Methylcellulose Hydrogels: Effects of Monomer, Crosslinker and Polysaccharide Compositions. **Polymer Engineering and Science**, v. 49, p. 2467-2474, 2009.
- AOUADA, F.A.; MOURA, M.R.; ORTS, W.J.; MATTOSO, L.H.C. Polyacrylamide and methylcellulose hydrogel as delivery vehicle for the controlled release of paraquat pesticide. **Journal of Materials Science**, v. 45, p. 4977-4985, 2010.
- ARMAS, E.D.; MONTEIRO, R.T.R; ANTUNES, P.M.; SANTOS, M.P.F.; CAMARGO, P.B. Uso de agrotóxicos em cana-de açúcar na bacia do rio Corumbataí e o risco de poluição hídrica. **Química Nova**, v. 30, p. 1119-1127, 2007.
- AULTON, M. **Dissolution and Solubility. Pharmaceuticals: the science of dosage from design**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2002.
- AVACHAT, A.; KOTWAL, V. Design and Evaluation of Matrix-Based Controlled Release Tablets of Diclofenac Sodium and Chondroitin Sulphate. **AAPS PharmSciTech.**, v. 8, p. 1-6, 2007.
- ÁVILA L.G.; LEITE S.B.; DICK D.P. Formulações de atrazina em xerogéis: síntese e caracterização. **Química Nova**, 32, 7, 1727-1733, 2009.
- AZEVEDO, V.V.C.; CHAVES, S.A.; BEZERRA, D.C.; FOOK, M.V.F.; COSTA, A.C.F. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 23, p. 27-34, 2007.
- BARIK, T. K.; SAHU, B.; SWAIN, V. Nanosilica—from medicine to pest control. **Parasitology Research**, v. 103, p. 253–258, 2008.
- BEALE D.J.; KASERZON, S.L.; PORTER, N.A.; RODDICK, F.A.; CARPENTER, P.D. Detection of s-triazine pesticides in natural waters by modified large-volume direct injection HPLC. **Talanta**, v. 82, p. 668-674, 2010.

- BEITZ, H.; BÖRNER, H.; SCHMIDT, H.; HERZEL, F. **Pesticides in ground and surface water**. Berlim: Springer-Verlag, 1994.
- BELLUCK, D.A.; BENJAMIN, S.L.; DAWSON, T. **Groundwater Contamination by Atrazine and Its Metabolites Risk Assessment, Policy, and Legal Implications**. Pesticide Transformation Products. Chapter 18, p. 254–273 ACS Symposium Series, v. 459, 1991.
- BONNELL, D.A.; HUEY, B.D. **Scanning Probe Microscopy and Spectroscopy. Theory, Techniques, and Applications**, 2.^a edição, D. A. Bonnell (ed.), Wiley-VCH, New York, 2001.
- BRASIL, **Anvisa**, Resolução RE nº 899, de 29 de Maio de 2003.
- BRECKENRIDGE, C.B.; ELDRIDGE, J.C.; STEVENS, J.T.; SIMPKINS, J.W. **Symmetrical Triazine Herbicides: A Review of Regulatory Toxicity Endpoints**. Cap. 79, Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology, 2010.
- BRUNA, F.; PAVLOVIC, I.; CELIS, R.; BARRIGA, C.; CORNEJO, J.; ULIBARRI, M.A. Organohydroxalates as novel supports for the slow release of the herbicide terbuthylazine. **Applied Clay Science**, v. 42, p.194-200, 2008.
- BUDHIAN, A.; SIEGEL, S. J.; WINEY, K. I. Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: Systematic study of particle size and drug content. **International Journal of pharmaceuticals**, v. 336, p. 367-375, 2007.
- BUNIO, P.; ZIELINSKA, K.; CHLEBICKI, J.; WILK, K.A. Preparation of polymeric nanoparticles using a new polymerizable surfactant. **Central European Journal of Physics**, v. 9, p. 570-575, 2011.
- CABRAL, M. F.; SOUZA, D. de; ALVES, C. R.; MACHADO, S. A. S. Estudo do comportamento eletroquímico do herbicida ametrina utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada. **Eclética Química**, v. 28, p. 41-47, 2003.
- CAL, X.; LIU, W.; CHEN, S. Environmental effects of inclusion complexation between methylated beta-cyclodextrin and diclofop-methyl. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 53, p. 6744-6749, 2005.
- CALVO, P.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J. Evaluation of cationic polymer-coated nanocapsules as ocular drug carriers. **International Journal of pharmaceuticals**, v. 153, p. 41–50, 1997.

- CAUCHETIER, E., DENIAU, M., FESSI, H., ASTIER, A., PAUL, M. Atovaquone-loaded nanocapsules: influence of the nature of the polymer on their in vitro characteristics. **International Journal of pharmaceutics**, v. 250, p. 273–281, 2003.
- CEA, M.; CARTES, P.; PALMA, G.; MORA, M.L. Atrazine efficiency in an andisol as affected by clays and nanoclays in ethylcellulose controlled release formulations. **Revista de la Ciencia del Suelo y Nutrición vegetal**, v. 10, p. 62 – 77, 2010.
- CELIS R, HERMOSÍN MC, CARRIZOSA MJ, CORNEJO J. Inorganic and organic clays as carriers for controlled release of the herbicide hexazinone. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 10, v. 2324-30, 2002.
- COBB, A. **Herbicides and plant physiology**, London: Chapman & Hall, p. 176, 1992.
- COBB, A.; KIRKWOOD, R.C. **Herbicides and Their Mechanisms of Action**, Sheffield Biological Sciences, 2000.
- COLLA, L.M.; PRIMAZ, A.L., DE LIMA, M.; BERTOLIN, T.E.; COSTA, J.A.V. Isolation and screening of fungi to bioremediation from triazine herbicide contaminated soil. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 809-813, 2008.
- COLLINS, C.H.; BRAGA, L.B.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**, 4ª ed., Editora unicamp, campinas, 1990.
- COLOMBO, G. PADERA, R.; LANGER, R.; KOHANE, D. S. Prolonged duration anesthesia with lipid-protein-sugar particles containing bupivacaine and dexamethasone. **Journal of Biomedical Material Research A**, v. 75, p. 458-464, 2005.
- COLOMBO, P.; BETTINI, R.; MASSIMO, G.; CATELLANI, P. L.; SANTI, P.; PEPPAS, N. A. Drug diffusion front movement is important in drug release control from swellable matrix tablets. **Journal Pharmaceutical Sciences**, v. 84, p. 991-997, 1995.
- CORNEJO, L.; CELIS, R.; DOMINGUEZ, C.; HERMOSIN, M.C.; CORNEJO, J. Use of modified montmorillonites to reduce herbicide leaching in sports turf surfaces: Laboratory and field experiments. **Applied Clay Science**, v. 42, p. 284-291, 2008.

- COSTA, C.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, p. 123–133, 2001.
- COSTA, M. A. **Biodegradação de ¹⁴C-ametrina em Areia Quartzosa com adição de palha de cana e solo rizosférico**. Piracicaba, Universidade de São Paulo, p. 107, 1992. (Dissertação de Mestrado).
- COUTINHO, C. F. B.; TANIMOTO, S. T.; GALLI, A.; GARBELLINI, G. S.; TAKAYAMA, M.; AMARAL, R. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Pesticidas: Mecanismo de ação, degradação e toxidez. Pesticidas: **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 15, p. 65-72, 2005.
- COUVREUR P, DUBERNET C, PUISIEUX F. Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, p. 2–13, 1995.
- COUVREUR, P., G. BARRATT, E. FATTAL, P. LEGRAND, AND C. VAUTHIER. Nanocapsule technology: A review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, p. 19, v. 99–134, 2002.
- CRUZ, L., SOARES, L.U., COSTA, T.D., MEZZALIRA, G., DA SILVEIRA, N.P., GUTERRES, S.S., POHLMANN, A.R. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. **International Journal of pharmaceutics**, v. 313, p. 198–205, 2006.
- CUN, D.; JENSEN, D.K.; MALTESEN, M.J.; BUNKER, M.; WHITESIDE, SCURR, D.; FOGED, C.; NIELSEN, H.M. High loading efficiency and sustained release of siRNA encapsulated in PLGA nanoparticles: Quality by design optimization and characterization. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 77, p. 26-35, 2011.
- DAILEY, O., DOWLER, C., MULLINIX, B. Polymeric microcapsules of herbicides atrazine and metribuzin: preparation and evaluation of controlled release properties. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 41,p. 1517 – 1522, 1993.
- DAILEY, O.D., AND C.C. DOWLER. Polymeric microcapsules of cyanazine: preparation and evaluation of efficacy. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 46, p. 3823-3827, 1998.

- DALENC, ON, F., AMJAUD, Y., LAFFORGUE, C., DEROUIN, F., FESSI, H. Atovaquone and rifabutine-loaded nanocapsules: formulation studies. **International Journal of pharmaceutics**, v. 153, p. 127–130, 1997.
- DELGADO A. V., GONZÁLEZ-CABALLERO F., HUNTER R. J., KOOPAL L. K., LYKLEMA J. Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena. **Pure and Applied Chemistry**, v. 77, p. 1753–1805, 2005.
- DOMINGUES, G. S; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R; POHLMANN, A. R. Micropartículas nanorrevestidas contendo um fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica. **Química Nova**, v. 31, p. 1966-1972, 2008.
- DUBEY, S.; JHELMUM V.; PATANJALI, P.K. **Controlled release agrochemicals formulations: A review**, v. 70, p. 105-112, 2011.
- DURÁN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. **Nanotecnologia**, São Paulo: Artliber, 2006.
- EISLER, R. Atrazine hazards to fish, wildlife and invertebrates: a sinoptic review. **Contaminant Hazardous Review**, v.18, p.1-55, 1989.
- EL BAHRI, Z.; TAVERDET, J. L. Elaboration and characterisation of microparticles by pesticide model. **Powder Technology**, v. 172, p. 30-40, 2007.
- EL BAHRI, Z.; TAVERDET, J. L. Optimization of an herbicide release from ethylcellulose microspheres. **Polymer Bulletin**, v. 54, p. 353–363, 2005.
- EXTOXNET (EXTENSION TOXICOLOGY NETWORK). **Pesticides information profiles**. Disponível em: <<http://extoxnet.orst.edu/pips/ametryn.htm>>. Acesso em: 24 abril 2011.
- EXTOXNET (EXTENSION TOXICOLOGY NETWORK). **Pesticides information profiles**. Disponível em: < <http://extoxnet.orst.edu/pips/simazine.htm>>. Acesso em: 24 abril 2011.
- FELIPPOTTI, T.T. ; DO CARMO, D.R. ; PAIM, L.L. ; STRADIOTTO, N.R. ; BICALHO, O.U. ; PARADA, C.A. ; GRILLO, R. ; FRACETO, L.F. ; COIMBRA, N.C. . Effect of a nanostructured dendrimer-naloxonazine complex on endogenous opioid peptides 1-receptor-mediated post-ictal antinociception. **Nanomedicine**, 2011, in press.

- FERNÁNDEZ-PÉREZ, M.; FLORES-CÉSPEDES, F.; GONZÁLEZ-PRADAS, E.; VILLAFRANCA-SÁNCHEZ, M.; PÉREZ-GARCÍA, S.; GARRIDO-HERRERA, F.J. Use of Activated Bentonites in Controlled-Release Formulations of Atrazine. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 52, p. 3888-93, 2004.
- FERNÁNDEZ-PÉREZ, M.; VILLAFRANCA-SÁNCHEZ, M.; FLORES-CÉSPEDES, F.; PÉREZ-GARCÍA, S.; DAZA-FERNÁNDEZ, I. Prevention of chloridazon and metribuzin pollution using lignin-based formulations. **Environmental Pollution**, v. 158, p. 1412–1419, 2010.
- FERNÁNDEZ-PÉREZ, M.; VILLAFRANCA-SÁNCHEZ, M.; FLORES-CÉSPEDES, F.; DAZA-FERNÁNDEZ, I. Ethylcellulose and lignin as bearer polymers in controlled release formulations of chloridazon. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1672-1679, 2011.
- FERRERO, C.; MUÑOZ-RUIZ, A.; JIMÉNEZ CASTELLANOS, M.R. Fronts movement as a useful tool for hydrophilic matrix release mechanism elucidation. **International Journal of pharmaceutics**, v. 202, p. 21-28, 2000.
- FESSI, H., PUISEIUX, F.; DEVISSAGUET, J-P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement **International Journal of pharmaceutics**, v. 55, R1-R4, 1989.
- FESSI, H.; PUISEIUX, F.; DEVISSAGUET, J-P. Procédé de preparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanocapsules. **European Patent**, 0274961 A1, 1988.
- FORTUNATO, K.A.; DOILE, M.M., SCHMUCKER, I.C.; SCHUCKO, S.K.; SILVA, M.A.S.; RODRIGUES, P.O. Influência da Complexação com ciclodextrina sobre a Liberação do Acetato de Dexametasona a partir de Matrizes Hidrofilicas de Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e Polioxetileno (PEO). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, p. 513-521, 2007.
- FRIEDRICH, R.B.; FONTANA, M.C.; BECK, R.C.R.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Development and physicochemical characterization of dexamethasone-loaded polymeric nanocapsule suspensions. **Quimica Nova**, v. 31, p. 1131-1136, 2008.
- GAMISANS, F.; LACOUILONCHE, F.; CHAUVET, A.; ESPINA, M.; GARCIA, M. L.; EGEEA, M. A. Flurbiprofen-loaded nanospheres: analysis of the matrix structure

- by thermal methods. **International Journal of pharmaceutics**, v. 179, p. 37–48, 1999.
- GARRIDO-HERRERA, F. J.; DAZA-FERNÁNDEZ, I.; GONZÁLEZ-PRADAS, E.; FERNÁNDEZ-PÉREZ, M. Lignin-based formulations to prevent pesticides pollution. **Journal of Hazardous Materials**, v. 168, p. 220–225, 2009.
- GINÉS, J. M.; PÉREZ, J. I.; ARIAS, M. J.; MOYANO, J. R.; MORILLO, E.; RUIZ-CONDE, A.; SÁNCHEZ-SOTO, P. J. Inclusion of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) with β -cyclodextrin by different processing methods. **Chemosphere**, v. 33, p. 321-334, 1996.
- GOVENDER, T.; RILEY, T.; EHTEZAZI, T.; GARNETT, M. C.; STOLNIK, S.; ILLUM, L.; DAVIS, S. S. Defining the drug incorporation properties of PLA–PEG Nanoparticles. **International Journal of pharmaceutics**, v. 199, p. 95–110, 2000.
- GRILLO, R. ; MELO, N.F.S. ; ARAÚJO, D.R.; DE PAULA, E. ; ROSA, A.H. ; FRACETO, L.F. Polymeric alginate nanoparticles containing the Local anesthetic bupivacaine. **Journal of Drug Targeting**, v. 18, p. 688-699, 2010a.
- GRILLO, R.; MELO, N. F. S.; LIMA, R.; LOURENÇO, R.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F. Characterization of atrazine-loaded biodegradable poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) microspheres. **Journal of Polymers Environment**, 2010b.
- GRILLO, R.; Pereira, A.E.S.; de Melo, N.F.S.; Porto, R.M.; Feitosa, L.O.; Tonello, P.S.; Filho, N.L.D.; Rosa, A.H.; Lima, R.; Fraceto, L.F. Controlled release system for ametryn using polymer microspheres: Preparation, characterization and release kinetics in water. **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, p. 1645-1651, 2011.
- GUINEBRETIERE, S.; BRIANCON, S.; FESSI, H.; TEODORESCU, V.S.; BLANCHIN, M.G. Nanocapsules of biodegradable polymers: preparation and characterization by direct high resolution electron microscopy. **Materials Science and Engineering C**, v. 21, p. 137–142, 2002.
- GUO, H.; ZHANG, J.; LIU, Z.; YANG, S.; SUN, C. Effect of Tween80 and β -cyclodextrin on the distribution of herbicide mefenacet in soil–water system. **Journal of Hazardous Materials**, v. 177, p. 1039-1045, 2010.

- GUTERRES, S. S.; FESSI, H.; BARRATT, G.; DEVISSAGUET, J-P.; PUISIEUX, F. Poly(DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac : I. Formulation and stability study. **International Journal of pharmaceuticals**, v. 113, p. 57-63, 1995.
- GUTERRES, S.S.; POLETTO, F.S.; COLOMÉ, L.M.; RAFFI, R.P; POHLMANN A.R. **Polymeric Nanocapsules for Drug Delivery An Overview**, 2010.
- HALLBERG, G. R. Pesticides pollution of groundwater in the humid United States. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, v. 26, p. 299-367, 1989.
- HARIHARAM, D.; PEPPAS, N. A.; BETTINI, R.; COLOMBO, P. Mathematical analysis of drug delivery from swellable systems with partial physical restrictions or impermeable coatings **International Journal of pharmaceuticals**, v. 112, p. 47-54, 1994.
- HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 5 ed. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos, 2001.
- HESS, F.D. Light dependent herbicides - An overview. **Weed Science**, v. 48, p.160-170, 2000.
- HODGES, C. S. Measuring forces with the AFM: polymeric surfaces in liquids. **Advances in Colloid And Interface Science**, v. 99 p. 13-75, 2002.
- HUANG, X.; BRAZEL, C.S. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 73, p. 121–136, 2001.
- HUERTAS-PÉREZ, J.F.; GARCIA-CAMPAÑA, A.M. Determination of N-methylcarbamate pesticides in water and vegetable samples by HPLC with post-column chemiluminescence detection using the luminol reaction. **Analytica Chimica Acta**, v. 630, p. 194-204, 2008.
- ICH. **Internacional Conference on Harmonization**; Guidance for Industry – Q2B. Validation of Analytical Procedures: Methodology; Londres, 1996.
- JACOMINI, AE., 2002. **Bioacumulação do herbicida atrazina pelas espécies de bivalves límnicos Anodontites trapesialis** (Lamarck, 1819) e *Corbicula fluminea* (Muller, 1774). Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo. 89 p. Dissertação de Mestrado em Biologia Comparada.

- JANDT, K. D. Developments and perspectives of scanning probe microscopy (SPM) on organic materials. **Materials Science and Engineering**, v. 21, p. 221-295, 1998.
- JOEL, D.M. The long-term approach to parasitic weeds control: manipulation of specific developmental mechanisms of the parasite. **Crop Protection**, V.19, 753-758, 2000
- KAFETZOULOS, D.; MARTINOV, A.; BOURIOTIS, V. **Chitin Enzymology**, ed., European Chitin Soc: Ancona, p. 147, 1993.
- KENAWY, E.R.; SHERRINGTON D.C. Controlled release of agrochemical molecules chemically bound to polymers. **European Polymer Journal**, v. 28, p. 841-862, 1992.
- KHAN, K.A.; RHODES, C.T. The concept of dissolution efficiency. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 27, p. 48-49, 1975.
- KILIC, A. C.; CAPAN, Y.; VURAL, I.; GURSOY, R. N.; DALKARA, T.; CUINE, A.; HINCAL, A. A. Preparation and characterization of PLGA nanospheres for the targeted delivery of NR2B-specific antisense oligonucleotides to the NMDA receptors in the brain. **Journal of Microencapsulation**, v. 22, p. 633–641, 2005.
- KODAMA, T.; DING, L.; YOSHIDA, M.; YAJIMA, M. Biodegradation of an s-triazine herbicide, simazine. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 103–1078, 2001.
- KOONTZ, J.L. Special delivery: **Controlled release of active ingredients from food and beverage packaging**. Italian Packaging Technology Award (IPTA) Paper Competition, 2006.
- KORSMEYER, R. W.; PEPPAS, N. A. **Macromolecular and modeling aspects of swelling-controlled systems**. In: Roseman TJ, Mansdorf SZ (Eds.). *Controlled release delivery systems*. New York, USA: Marcel Dekker Inc, 1991.
- KORSMEYER, R.W.; GURNY, R.; DOELKER, E.; BURI, P.; PEPPAS, N.A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **International Journal of pharmaceuticals**, v. 15, p. 25-35, 1983.
- LAABS, V.; AMELUNG, W.; PINTO, A.A.; WANTZEN, M.; DA SILVA, C.J.; ZECH, W. Pesticides in surface water, sediment, and rainfall of the northeastern Pantanal basin, Brazil. **Journal of Environmental Quality**, v. 31, p. 1636-1648, 2002.

- LABRADA, R.; CASELEY, J.C.; PARKER, Y.C. **Manejo de malezas para países en desarrollo** (Estudio FAO Producción y Protección Vegetal - 120). Departamento de Agricultura. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma, Italia, 1996.
- LAKKIS, J.M. **Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems**, July 2007, Wiley-Blackwell.
- LANCHOTE, V.L. **Relatório técnico enviado ao CNPMA/ EMBRAPA**. Jaguariúna. 1997.
- LEBRAON, H.M.; MCFARLAND, J.E.; BURNSIDE, O.C. **The Triazine Herbicides: 50 years Revolutionizing Agriculture**, 2008.
- LERTSUTTHIWONG, P., ROJSITTHISAK, P., NIMMANNIT, U. Preparation of turmeric oil-loaded chitosan-alginate biopolymeric nanocapsules. *Mater. Sci. Eng. C, Materials Science and Engineering: C*, v. 29, p. 856-860, 2009.
- LEZCANO, M.; AL-SOUFI, W.; NOVO, M.; RODRÍGUEZ-NUNEZ, E.; VÁSQUEZ, J.; Complexation of several benzimidazole-type fungicides with alpha- and beta-cyclodextrins. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, p. 108-112, 2002.
- LI, J.; LI, Y.; DONG, H. Controlled Release of Herbicide Acetochlor from Clay/Carboxymethylcellulose Gel Formulations. *J. Agric. Food Chem.*, v. 56, p. 1336–1342, 2008.
- LIMA, R.; FEITOSA, L.; PEREIRA, A. E. ; MOURA, M. R. ; AOUADA, F. A. ; MATTOSO, L. H. C. ; FRACETO, L. F. Evaluation of the Genotoxicity of Chitosan Nanoparticles for use in Food Packaging Films. *Journal of Food Science*, v. 75, p. 89-96, 2010.
- LIMAYEM, I., CHARCOSSET, C., SFAR, S., FESSI, H. Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for paediatric use. *Int. J. Pharm.*, v. 325, p. 124–131, 2006.
- LOBO, F.; AGUIRRE, C.L.; SILVA, M. S.; GRILLO, R. ; MELO, N.F.S; OLIVEIRA, L. K.; MORAIS, L.C.; CAMPOS, V.; ROSA, A.H.; FRACETO, L. F. Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) microspheres loaded with atrazine herbicide: screening of conditions for preparation, physico-chemical characterization and in vitro release studies. *Polymer Bulletin*, in press, 2011.

- LORENZI, H. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional**. Nova Odessa - SP: Plantarum, p. 240, 1994.
- MANOLIKAR, M. K.; SAWANT, M. R. Study of solubility of isoproturon by its complexation with α -cyclodextrin. **Chemosphere**, v. 51, p. 811-816, 2003.
- MAQUEDA, C.; VILLAVERDE, J.; SOPENA, F.; UNDABEYTIA, T.; MORILLO, E. Novel System for Reducing Leaching of the Herbicide Metribuzin Using Clay-Gel-Based Formulations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 11941–11946, 2008.
- MARCHI, G.; MARCHI, E. C. S.; GUIMARÃES, T. G. **Herbicidas: mecanismos de ação e uso**, Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2008.
- MELO, N.F.S., GRILLO, R., ROSA, A. H., DIAS FILHO N.L., de PAULA, E, de ARAUJO, D.R., FRACETO L.F. Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de poli(L-lactideo) contendo benzocaína. **Química Nova**, v. 33, p. 65-69, 2010.
- MELO, N.F.S.; GRILLO, R.; GUILHERME, V.A.; ARAUJO, D.R.; PAULA, E.; ROSA, A.H.; FRACETO, L.F. Poly(lactide-co-glycolide) nanocapsules containing benzocaine: influence of the composition of the oily nucleus on physico-chemical properties and anesthetic activity. **Pharmaceutical Research**, in press, 2011.
- MENTEN, J.O.M.; SAMPAIO, I.V.; MOREIRA, H.; FLÔRES, D.; MENTEN, M. O setor de defensivos agrícolas no Brasil. **Sindicato nacional da indústria de produtos para defesa agrícola (SINDAG)**, 2010.
- MITCHELL, C.; BRODIE, J.; WHITE, I. Sediments, nutrients and pesticide residues in event flow conditions in streams of the Mackay Whitsunday region, Australia. **Marine Polls B.**, v. 51, p. 2336, 2005.
- MOGUL. M.G.; AKIN, H.; HASIRCI, N.; TRANTOLO, D.J.; GRESSER, J.D.; WISE, DL. Controlled release of biologically active agents for purposes of agricultural crop management. **Resources Conservations and Recycling**, v. 16, p. 289-320, 1996.
- MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, p. 561-573, 2006.
- MORAES, C.M., de MATOS, A.P., de PAULA, E., ROSA, A.H., FRACETO, L.F. Benzocaine loaded biodegradable poly-(d,l-lactide-co-glycolide) nanocapsules:

- factorial design and characterization. **Materials Science and Engineering:B**, v. 165, p. 243-246, 2009.
- MORAES, C.M.; de PAULA, E. ; Rosa, A.H. ; FRACETO, L.F. Physicochemical stability of poly(lactide-co-glycolide) nanocapsules containing the local anesthetic bupivacaine. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 995-1000, 2010.
- MORAES, C.M.; MATOS, A.P.; GRILLO, R.; MELO, N.F.S. PAULA, E.; DIAS FILHO, N. L.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F. Screening of formulation variables for the preparation of poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules containing the local anesthetic benzocaine. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 11, p. 2450-2457, 2011
- MORA-HUERTAS, C.E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Pharmaceutical Nanotechnology Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutical**, v. 385, p. 113–142, 2010.
- MORALES, M. M. **Terapias Avançadas**, Editora Atheneu, 2007.
- MOSQUEIRA, V.C.F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRATT, G. Poly(d,l-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: Influence of the composition on physicochemical and structural properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, p. 614–626, 2000.
- NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymer Science**, v. 32, p. 762-798, 2007.
- NAPPINNAI, M.; KISHORE, V.S. Formulation and evaluation of microspheres of diltiazem hydrochloride. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.69, p. 511-514, 2007.
- OLIVEIRA JR, R.S de. Capítulo 7: Mecanismos de ação de herbicidas.Maringá, Departamento de Agronomia, Universidade Estadual do Maringá, 2001.
- PAAVOLA A.; YLIRUUSI, J.; KAJIMOTO, Y.; KALSO, E.; WAHLSTRÖM, T.; ROSENBERG, P. Controlled release of lidocaine from injectable gels and efficacy in rat sciatic nerve block. **Pharmaceutical Research.**, v. 12, p. 1997-2002, 1995.

- PATTY, P. J.; FRISKEN, B. Direct determination of the number-weighted mean radius and polydispersity from dynamic light-scattering data. **Applied Optics**, v. 45, p. 2209-2216, 2006.
- PEREIRA, N., CARNEIRO, S., SILVESTRE, M., TELES, N., FIGUEREIDO DA SILVA, J., MACHADO, C.M., PEREIRA, E.C., DA SILVA, N.H., HONDA, N.K., SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Nanoencapsulation of usnic acid: an attempt to improve antitumor activity and reduce hepatotoxicity. **European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics**, v. 64, p. 154–160, 2006.
- PÉREZ DE LUQUE, A.; RUBIALES, D. Nanotechnology for parasitic plant control. **Pest Management Science**, v. 65, p. 540–545, 2009.
- PEREZ, C., SANCHEZ, A., PUTNAM, D., TING, D., LANGER, R., ALONSO, M.J. Poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles as new carriers for the delivery of plasmid DNA. **Journal Controlled Release**, v. 75, p. 211–224, 2001.
- PERÉZ-MARTINÉZ, J. I.; ARIAS, M. J.; GINÉS, J. M.; MOYANO, J. R.; MORILLO, E.; SÁNCHEZ-SOTO, P. J.; NOVÁK, C. Preparation and characterization by thermal analysis. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 51, p. 965-972, 1998.
- PFEUFFER, R. J.; RAND, G. M. South Florida ambient pesticide monitoring program. **Ecotoxicology**, v. 13, p. 195-205, 2004.
- PICOS, D. R.; CARRIL, M. G.; MENA, D. F.; FUENTE, L. N. Microesferas biodegradables de liberación controlada para administración parenteral. **Revista Cubana Farmaceutica**, v. 34, p. 70-77, 2000.
- PLAKAS K.V.; KARABELAS, A.J. Triazine retention by nanofiltration in the presence of organic matter: The role of humic substance characteristics. **Journal of Membrane Science**, v. 336, p. 86–100, 2009.
- PLIMMER, J.R. Handbook of Pesticide Toxicology. In: Chemistry of Pesticides. Ed. JRP Consultants, 2001.
- POHLMANN, A. R.; WEISS, V.; MERTINS, O.; SILVEIRA, N. P.; GUTERRES, S. S. Sprayed-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability and nanostructure models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, p. 305-312, 2002.

- POHLMANN, A.R., MEZZALIRA, G., DE GARCIA VENTURINI, C., CRUZ, L., BERNARDI, A., JÄGER E., BATTASTINI, A.M.O., PESCE DA SILVEIRA, N. Determining the simultaneous presence of drug nanocrystals in drug-loaded polymeric nanocapsule aqueous suspensions: a relation between light scattering and drug content. **International Journal of Pharmaceutics.**, v. 359, p. 288–293, 2008.
- POLAKOVIC, M.; GORNER, T.; GREF, R.; DELLACHERIE, E. Lidocaine loaded biodegradable nanospheres II. Modelling of drug release. **Journal Controlled Release**, v. 60, p. 169-177, 1999.
- PREGO, C.M., TORRES, F.D.; ALONSO, M.D. Efficacy and Mechanism of Action of Chitosan Nanocapsules for Oral Peptide Delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 23, 2006.
- RAO, J.P.; GECKELERA, K.E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, in press, 2011.
- RAO, J.P.; GECKELERA, K.E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, in press, 2011.
- REIS, C. P.; NEUFELD, R. J.; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I: Methods preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 2, p. 8-21, 2006.
- RIBEIRO, A. B.; RODRÍGUEZ-MAROTO, J. M.; MATEUS, E.P.; GOMES, H. Removal of organic contaminants from soils by an electrokinetic process: the case of atrazine. **Experimental and modeling Chemosphere**, v. 59, p. 1229-1239, 2005.
- RITGER, P. & PEPPAS, N.A. A simple equation for description of solute release. II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **Journal Controlled Release**, v. 5, p. 37-42, 1987.
- RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. 4. ed. Londrina: Edição Autores, p. 648, 1998.
- RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná, p. 592, 2005.
- RODRÍGUEZ-CUESTA, M.J; BOQUÉ, R.; RIUS, F.X; VIDAL, J.L.M.; FRENICH, A.G. Development and validation of a method for determining pesticides in

- groundwater from complex overlapped HPLC signals and multivariate curve resolution. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 77, p. 251-260, 2005.
- ROMAN, E. S.; BECKIE H.; VARGAS L.; HALL, L.; RIZZARDI, M. A.; WOLF, T. M. **Como funcionam os herbicidas: da biologia à aplicação**. Passo Fundo: Berthier, p. 158, 2007.
- ROMERO-CANO, M.S.; VINCENT, B. Controlled release of 4-nitroanisole from poly(lactic acid) nanoparticles. **Journal Controlled Release**, v. 82, p. 127–135, 2002.
- ROMERO-CANO, M.S.; VINCENT, B. Controlled release of 4-nitroanisole from poly(lactic acid) nanoparticles. **Journal Controlled Release**, v. 18, p. 127-135, 2002.
- SÁNCHEZ – VERDEJO, T.; UNDABEYTIA, T.; NIRT T.; MAQUEDA, T.; MORILLO, E. Environmentally Friendly Slow Release Formulations of Alachlor Based on Clay-Phosphatidylcholine. **Environmental Science & Technology**, v. 42, p. 5779–5784, 2008.
- SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, p. 726-737, 2003.
- SCHAFFAZICK, S.R.; POHLMANN, A.R.; FREITAS, L.L.; GUTERRES, S.S. Caracterização e Estudo de Estabilidade de Suspensões de Nanocápsulas e de Nanoesferas Poliméricas Contendo Diclofenaco. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 21, p. 99-106, 2002.
- SCHNEIDER, K.; HERRMANN, V. Semi-quantitative mechanical characterizations of fibre composites in the sub-micron-range by SFM. **Composites: Part A**, v. 32, p. 1679-1687, 2001.
- SENE, L. ; CONVERTI, A.; SECCHI, G. A. R.; SIMÃO, R.C.G. New Aspects on Atrazine Biodegradation. **Brazilian Archives of Biology Technology**, v. 53, p. 487-496, 2010.
- SENESI, N. Binding mechanisms of pesticides to soil humic Substances. **The Science of the Total Environment**, v. 123, p. 63-76, 1992.

- SHAHGALDIAN, P.; QUATTROCCHI, L.; GUALBERT, J.; COLEMAN, A.W.; GORELOFF, P. AFM imaging of calixarene based solid lipid nanoparticles in gel matrices. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 55, p. 107-113, 2003.
- SIEPMANN, J.; PEPPAS, N.A. Modelling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, p. 139-157, 2001.
- SIEPMANN, J.; PEPPAS, N.A. Modelling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, p. 139-157, 2001.
- SIEPMANN, J.; SIEPMANN, F. Mathematical modeling of drug delivery. **International Journal Pharmaceutics**, v. 364, p. 328-343, 2008.
- SILVA, M.S.; COCENZA, D.S.; DE MELO, N.F.S.; GRILLO, R.; ROSA, A.H.; FRACETO, L.F. Nanopartículas de alginato como sistema de liberação para o herbicida clomazone. **Química Nova**, 2010.
- SILVA, M.S.; COCENZA, D.S.; GRILLO, R.; MELO, N.F.S.; TONELLO, P.S.; OLIVEIRA, L.C.; CASSIMIRO, D.L. ; ROSA, A.H.; FRACETO, L.F. Paraquat-loaded alginate/chitosan nanoparticles: preparation, characterization and soil sorption studies. **Journal of Hazardous Materials**, v. 190, p. 366-374, 2011.
- SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**, 5th ed., John Wiley & Sons: New York, 1991.
- SINGH, B.; SHARMA, D.K.; KUMAR, R.; GUPTA, A. Development of a new controlled pesticide delivery system based on neem leaf powder. **Journal of Hazardous Materials**, v. 177, p. 290–299, 2010.
- SINGLA, A. K.; CHAWLA, M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects - an update. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, p.1047, 2001.
- SINHA, V. R.; BANSAL, K.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; TREHAN, A. Poly-ε-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **International Journal Pharmaceutics**, v. 278, p. 1–23, 2004.

- SKIPPER, H. D.; GILMOUR, C. M.; FURTICK, W. T. Microbial versus chemical degradation of atrazine in soils. **Soil Science Society of America**, v.31, p.653-656, 1967.
- SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B.. **Química Orgânica**, 7^a ed., LTC - Livros Técnicos e Científicos Editora S.A: Rio de Janeiro, 2001.
- SOPEÑA, F., MAQUEDA, C., MORILLO, E. Norflurazon mobility, dissipation, activity, and persistence in a sandy soil as influenced by formulation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 3561-3567, 2007.
- SOPEÑA, F.; MAQUEDA C.; MORILLO E. Controlled release formulations of herbicides based on micro-encapsulation. **Ciencia e investigación agraria**, v. 35, p. 27-42, 2009.
- SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal Controlled Release**, v. 70, p. 1-20, 2001.
- SRIAMORNSAK, P.; SUNGTHONGJEEN, S. Modification of Theophylline Release With Alginate Gel Formed in Hard Capsules. **AAPS PharmSciTech.**, v. 8, p. E1-E8, 2007.
- SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E.C.; PEZZIN, A.P.T.; MEIER, M.M.; SILVA, D.A.K. Biodegradable Microspheres of Poly(3-hydroxybutyrate)/Poly(e-caprolactone) loaded with Malathion Pesticide: Preparation, Characterization, and In Vitro Controlled Release Testing. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 117, p. 3419–3427, 2010.
- TEWA-TAGNE, P., BRIANC, ON, S., FESSI, H. Spray-drying microparticles containing polymeric nanocapsules: formulation aspects, liquid phase interactions and particles characteristics. **International Journal Pharmaceutics**, v. 325, p. 63–74, 2006.
- TEWA-TAGNE, P., DEGOBERT, G., BRIANC, ON, S., BORDES, C., GAUVRIT, J.Y., LANTERI, P., FESSI, H. Spray-drying nanocapsules in presence of colloidal silica as drying auxiliary agent: formulation and process variables optimization using experimental designs. **Pharm. Res.**, v. 24, p. 650–660, 2007.
- TÓFOLI, G.R.; CEREDA, C.M.S.; GROPPPO, F.C.; VOLPATO, M.C.; MONTAN, M.F. ; RANALI, J. ; ARAÚJO, D.R.; de PAULA, E. . Efficacy of liposome-encapsulated

- mepivacaine for infiltrative anesthesia in volunteers. **Journal of Liposome Research**, v. 21, p. 88-94, 2011.
- TSAI, W.T.; LAI, C.W. Adsorption of herbicide paraquat by clay mineral regenerated from spent bleaching earth. **Journal of Hazardous Materials**, v. 134, p. 144-148, 2006.
- UEPA. **UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY**. Triazine Cumulative Risk Assessment, 2006.
- VAUTHIER, C.; COUVREUR P. **Development of nanoparticles made of polysaccharides as novel drug carrier systems**. In: Wise DL, editor. Handbook of pharmaceutical controlled release technology. New York: Marcel Dekker; p. 13–429, 2000.
- VENKATRAMAN, S. S.; JIE, P.; MIN, F.; FREDDY, B. Y, C.; LEONG-HUAT, G. Micelle-like nanoparticles of PLA–PEG–PLA triblock copolymer as chemotherapeutic carrier. **International Journal Pharmaceutics**, v. 298, p. 219–232, 2005.
- VERGER, M. L.; FLUCKIGER, L.; KIM, Y.; HOFFMAN, M.; MAINCENT, P. Preparation and characterization of nanoparticles containing an antihypertensive agent. **European Journal of Pharmaceutical Biopharma.**, v. 46, p. 137–143, 1998.
- VILA, A.; SÁNCHEZ, A.; TOBÍO, M.; CALVO, P.; ALONSO, M.J. Design of biodegradable particles for protein delivery. **Journal Controlled Release**, v. 78, p. 15-24, 2002.
- VILLAVERDE, J.; MAQUEDA, C.; MORILLO, E. Effect of the simultaneous addition of beta-cyclodextrin and the herbicide norflurazon on its adsorption and movement in soils. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 54, p. 4766-4772, 2006.
- VIVIAN, R.; QUEIROZ, M.E.L.R.; JAKELAITIS, A.; GUIMARÃES, A.A.; REIS, M.R.; CARNEIRO, P.M.; SILVA, A.A. Persistência e lixiviação de ametryn e trifloxysulfuron-sodium em solo cultivado com cana-de-açúcar. **Quimica Nova.**, v. 25, p. 111-124, 2007.
- WANG, T.; GUNASEKARAN, S. State of water in chitosan–PVA hydrogel. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 101, p. 3227-3232, 2006.

- WARE, G.W., AND D.M. WHITACRE. **The Pesticide Book**. 6th Ed. Meister Media Worldwide. Willoughby, Ohio (USA), p. 526, 2004.
- WIESENDANGER, R. **Scanning Probe Microscopy and Spectroscopy: Methods and Applications**, R. Wiesendanger (ed.), Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1994.
- WOODRUFF, M. A. & HUTMACHER, D.W. The return of a forgotten polymer: Polycaprolactone in 21th century. **Progress in Polyme Science**, in press, 2010.
- ZILI, Z., SFAR, S., FESSI, H. Preparation and characterization of poly- caprolactone nanoparticles containing griseofulvin. **International Journal Pharmaceutics.**, v. 294, p. 261–267, 2005.