

**ANDERSON DO ESPIRITO SANTO PEREIRA**

**“NANOPARTÍCULAS DE POLI-ÉPISLON CAPROLACTONA  
CONTENDO O HERBICIDA ATRAZINA: DO PREPARO E CA-  
RACTERIZAÇÃO A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HERBICIDA”**

**CAMPINAS**

**2013**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA**

**Anderson do Espirito Santo Pereira**

**“NANOPARTÍCULAS DE POLI-ÉPSILON CAPROLACTONA  
CONTENDO O HERBICIDA ATRAZINA: DO PREPARO E  
CARACTERIZAÇÃO A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
HERBICIDA”**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
*Anderson do Espirito Santo Pereira, Leonardo Fernando Fraceto*  
é aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto

**CAMPINAS**  
**2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

P414n Pereira, Anderson do Espírito Santo, 1985-  
Nanopartículas de poli-épsilon caprolactona contendo  
o herbicida atrazina: do preparo e caracterização a  
avaliação da atividade herbicida / Anderson do Espírito  
Santo Pereira. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

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

1. Nanopartículas poliméricas. 2. Agricultura. 3.  
Liberação controlada. I. Fraceto, Leonardo Fernandes.  
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de  
Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** Poly-epsilon caprolactone nanoparticles containing the herbicide atrazine: from the preparation and characterization until herbicide activity evaluation

**Palavras-chave em Inglês:**

Polymeric nanoparticles

Agriculture

Controlled release

**Área de concentração:** Bioquímica

**Titulação:** Mestre em Biologia Funcional e Molecular

**Banca examinadora:**

Leonardo Fernandes Fraceto [Orientador]

Marcelo Bispo de Jesus

Luciana de Matos Alves Pinto

**Data da defesa:** 18-02-2013

**Programa de Pós Graduação:** Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 18 de Fevereiro de 2013

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto (Orientador)

  
Assinatura

Dr. Marcelo Bispo de Jesus

  
Assinatura

Profa. Dra. Luciana de Matos Alves Pinto

  
Assinatura

Prof. Dr. Halley Caixeta de Oliveira

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck

\_\_\_\_\_  
Assinatura

*Dedico aos meus amigos, pais, irmãos e família.*

*Tenha fé, seja honesto e acredite em você mesmo!*

## **Agradecimentos**

Começo agradecendo primeiramente a Deus, por ter uma presença tão forte em minha vida, sendo sempre sinônimo de força, ao meu padroeiro São Miguel Arcanjo, a virgem mãe Maria Santíssima e meu anjo da guarda que sempre me guiam em luz.

Agradeço ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), UNICAMP e a UNESP/Sorocaba pelo apoio, formação e estrutura que foram fundamentais no desenvolvimento do trabalho.

Uma grande gratidão ao Prof. Dr. Leonardo Fraceto, por ter me aceitado como seu aluno, pelos ensinamentos, puxões de orelha e por ser uma pessoa íntegra e digna, que será com toda certeza um exemplo profissional e como pessoa para minha vida.

Aos meus companheiros e amigos de laboratório, Renato Grillo e Nathalie Melo, por dividirem seus conhecimentos, dedicarem de seu tempo para me ensinar o que sabem, muito aprendi com eles e muito do que apresento neste trabalho devo a eles.

Agradecer sempre aos meus pais, por me amarem muito, aos meus irmãos Marcio (Trambs), Alessandro (Lerdo) e Adriano (Drica) e que nunca esqueçamos o significado da palavra “irmão”, a minha cunhada Andréia e minhas sobrinhas lindas Camilla e Sarah que mesmo longe, sei que torcem por mim.

A Nathy Zocal por sempre estar ao meu lado, me ouvir e me entender, muitas vezes mesmo sem saber o motivo! Ao Roger, simplesmente por que ele é o Roger “grande amigo”, a Lu Vieira e Renan Monteiro por fazerem parte da minha vida, minha família há tantos anos, ao Edinho Riberio, meu grande irmão de todas as horas, as minhas primas Sil e Carla pelo carinho, atenção, preocupação e amizade, ao Dennis Maletich pelo qual tenho grande estima.

Aos meus grandes amigos, amigas, irmãos e irmãs da vida, a vocês que tanto me ensinam e que também não há como explicar a importância de todos vocês em minha vida.

A todos vocês, meus eternos agradecimentos!

## Resumo

A “Revolução Verde” ocorreu na década de 60 e previa o aumento da produção agrícola devido ao crescimento populacional, onde foi intensificado o estudo de novas tecnologias para o aumento da produção de alimentos e rentabilidade dos agricultores. Entre as várias tecnologias, destacou-se a utilização de defensivos agrícolas no controle, prevenção e na eliminação de doenças que interferem na produtividade agrícola. O uso de nanopartículas (NPs) para o carreamento de compostos bioativos para liberação sustentada aumenta o tempo de ação e estabilidade química do ativo no meio, bem como a disponibilidade para ação junto ao organismo alvo. Na agricultura, o uso de NPs visa reduzir a concentração efetiva do ativo a ser utilizado, reduzir de aplicações, reduzir a toxicidade, diminuir a periculosidade e os riscos de contaminação ambiental. O presente trabalho propôs o desenvolvimento de NPs poliméricas de poli-épsilon caprolactona (PCL) como sistemas carreadores para o herbicida atrazina (ATZ) bem como a avaliação das características físico-químicas destes sistemas, a atividade herbicida e a genotoxicidade das formulações preparadas. As nanocápsulas (NCs/ATZ) e as nanoesferas (NEs/ATZ) contendo ATZ apresentaram diâmetro médio de  $483,1 \pm 10,4$  nm e  $408,5 \pm 2,5$  nm, respectivamente. A ATZ apresentou uma eficiência de encapsulação acima de 90% para as formulações de NE e NC e foram observadas alterações no perfil de liberação da ATZ em comparação com o herbicida ATZ. A estabilidade coloidal e físico-química das formulações foi mantida por um período de 90 dias. O uso de NPs aumentou a retenção da ATZ em ensaios com coluna de solo, sendo que a atividade herbicida se mostrou mais eficaz quando comparada ao ativo ATZ apenas e ao de uma formulação comercial (Gesaprin). A investigação da genotoxicidade das formulações, utilizando o ensaio de aberração cromossômica *Allium cepa*, mostrou que a encapsulação da ATZ reduziu os efeitos sobre o número de aberrações cromossômicas quando comparadas ao ativo ATZ e à formulação comercial. As formulações de NPs contendo ATZ preparadas neste trabalho apresentam grande potencial para aplicação na agricultura, uma vez que estas podem ter ação herbicida utilizando menor concentração de ativo, reduzem a mobilidade da ATZ no solo e diminuem os efeitos genotóxicos, tornando-se mais seguras ao meio ambiente e reduzindo os riscos de contaminação.

**Palavras chaves:** nanopartículas poliméricas, agricultura, liberação sustentada.



## Abstract

The “Green Revolution” occurred during the decade of 60 and it aimed towards the rapid increase on agriculture production due to population growth, when was intensified the research and development to increase agriculture production and profitability. Among several technologies, herbicides and pesticides have emerged to control, prevent and destroy diseases that interfere in the agricultural productivity. The use of nanoparticles (NPs), as drug delivery system leads to modified drug release profile, increase time of action and increased chemical stability is wells increase in bioavailability. In agriculture the use of NPs can reduce the amount of chemical used and the number of applications with decrease in toxicity, minimizing the risks of an environmental contamination. This study aims to develop NPs prepared with poly- $\epsilon$ -caprolactone (PCL) as a carrier system for the herbicide atrazine (ATZ). The formulations were characterized and the herbicide activity and genotoxicity were investigated. The nanocapsules (NCs/ATZ) and nanospheres (NE/ATZ) containing ATZ showed a size average diameter of  $483.1 \pm 10.4$  nm and  $408.5 \pm 2.5$  nm respectively. The ATZ presented encapsulation efficiency over 90% on formulations of NC and NE. The release profiles of the ATZ encapsulated in NPs were changed in relation to the ATZ herbicide only. The colloidal stability over 90 days showed that the formulations were stable. The use of NPs increased the retention of ATZ on soil column and showing that the herbicide was more active when compared to ATZ or a commercial formulation (Gesaprin). The genotoxicity evaluation showed that the encapsulation of ATZ reduced the toxic effects on the number of chromosomal aberration when compared to active ATZ and commercial formulation. NPs formulation containing ATZ prepared in this study presented a great potential for application in agriculture, since these formulations have the same herbicide activity (using lower concentration of active compound), reduce the ATZ soil mobility and also decrease the genotoxicity effects of ATZ, and in this way, reducing the risks of environmental contamination.

Keywords: Polymeric nanoparticles, agriculture and controlled release.

## Lista de Figuras

- Figura 1: A) Estrutura química geral dos herbicidas triazínicos: os herbicidas triazínicos se diferenciam pelos grupos radicais  $R_1$ ,  $R_2$  e  $R_3$ ; B) Fórmula estrutural dos herbicidas S-triazínicos ATZ, ametrina e simazina, sendo as principais diferenças estruturais devidas as alterações nos grupamentos  $R_1$  e  $R_2$ . ..... 23
- Figura 2: Representação do processo de captação de luz no fotossistema II. A energia luminosa é captada pelos pigmentos fotossintéticos e transferida para o centro de reação  $P_{680}$ , fazendo com que ocorra a excitação de elétrons. Estes elétrons entram em uma cadeia transportadora dentro do sistema fotossintético II e posteriormente são transferidos ao fotossistema I. .... 24
- Figura 3: Representação do processo de inibição do processo fotossintético por Hb triazínicos. A partir da figura, é possível observar que os Hb triazínicos se ligam à proteína  $D_1$  e, conseqüentemente, interrompem o transporte dos elétrons do sistema  $Q_b$  para a plastoquinona, cessando o fluxo de elétrons do fotossistema II para o I. .... 25
- Figura 4: Nanopartículas poliméricas. A) Nanocápsulas poliméricas, sendo demonstrado o ativo tanto na parede polimérica como no núcleo oleoso. B) Nanoesferas poliméricas, sendo demonstrado o ativo retido na matriz polimérica. .... 29
- Figura 5: Método de preparo das NPs poliméricas de PCL contendo ATZ. Inicialmente, é formada uma fase orgânica contendo polímero e ATZ, seguida de formação de emulsão óleo/água pela adição desta fase sob fase aquosa contendo PVA e posterior sonicação. Após o preparo da emulsão, foi realizada a remoção do solvente e concentração da formulação até que a ATZ ficasse a 1 mg/mL. .... 35
- Figura 6: Representação esquemática da coluna de solo preparada para os ensaios de interação com solo e avaliação da atividade Hb. A coluna de solo foi dividida em 4 anéis denominadas por A, B, C e D, sendo a superfície do anel A o local de aplicação do Hb. . 41
- Figura 7: Representação esquemática de uma plântula de mostarda. Nesta figura podem-se observar as diferentes regiões (raiz, altura e número de folhas) que foram analisadas após o cultivo da mostarda nos diferentes anéis das colunas de solo. .... 45
- Figura 8: Representação esquemática das principais etapas para a confecção de lâminas do ensaio de genotoxicidade em *Allium cepa*. .... 47
- Figura 9: Distribuição de diâmetro hidrodinâmico das NPs de PCL com ou sem ATZ em função do tempo (0, 7, 30, 45, 60, 75 e 90 dias). Os valores representam a média de três análises ( $n=3$ ), sendo as amostras medidas à 25 °C. .... 55
- Figura 10: PDI das NPs de PCL com ou ATZ em função do tempo (0, 7, 30, 45, 60, 75 e 90 dias). Os valores são referentes à média de três análises ( $n=3$ ), sendo as amostras medidas à 25°C. .... 56

Figura 11: Valores de pH medidos nas suspensões coloidais contendo NPs de PCL com ou sem ATZ em função do tempo (0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias). Os valores são referentes à média de três análises (n=3), sendo as amostras medidas à 25°C. ....	57
Figura 12: Valores de EE para o ativo ATZ nas NPs de PCL em função do tempo (0, 7, 30, 45, 60, 75 e 90 dias). Os valores são referentes a média de três análises (n=3), sendo as amostras medidas à 25°C.....	58
Figura 13: Análise por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier para A) ATZ; B) polímero PCL; C) NCs; D) NEs; E) NCs/ATZ; F) NEs/ATZ. Para as Figuras E e F, os números em vermelho representam as bandas do polímero PCL e os números em preto, as bandas para a ATZ. Os espectros foram coletados de 4000 a 400 cm <sup>-1</sup> , e representam a média de 32 varreduras, cada com resolução espectral de 2 cm <sup>-1</sup> .....	60
Figura 14: Ensaio de cinética de liberação do herbicida ATZ. As curvas mostram o perfil da cinética de liberação da ATZ, NCs/ATZ e NEs/ATZ. Os dados representam a média de três experimentos realizados à 25 °C. ....	63
Figura 15: Análise do modelo matemático de Korsmeyer-Peppas para as NCs/ATZ (Equação 1 item 3.2.3.7).....	65
Figura 16: Análise do modelo matemático de Korsmeyer-Peppas para as NEs/ATZ (Equação 1 item 3.2.3.7).....	66
Figura 17: Perfil da umidade do solo medido para as diferentes frações da coluna de solo (A: 0-4 cm; B: 4-8 cm; C: 8-12 cm; D: 12-16 cm) para os diferentes tratamentos: negativo (apenas água), Comercial (formulação comercial de ATZ), ATZ, NC/ATZ, NE/ATZ. Valores expressos como a média de quintuplicatas determinados à temperatura de 25 °C.....	68
Figura 18: Avaliação da distribuição de ATZ (em %) ao longo do perfil das colunas de solo para as formulações de ATZ, comercial, NCs/ATZ e NEs/ATZ. Valores expressos como a média de cinco experimentos realizados à 25°C. ....	69
Figura 19: Plantas <i>Brassica sp</i> cultivadas nos anéis de solo após duas semanas do plantio. Na Figura, estão representados os diferentes anéis para cada um dos tratamentos a) Negativo; b) Formulação Comercial; c) ativo ATZ; d) NC/ATZ e e) NE/ATZ. As frações da coluna estão dispostas na figura da esquerda (topo da coluna) para direita (base da coluna), sendo as frações A (0 a 4 cm); B (4 a 8 cm); C (8 a 12 cm) e D (12 a 16 cm). ....	71
Figura 20: Plantas retiradas das frações das colunas de solo (A-D) após o período de duas semanas de cultivo. Na Figura, são apresentados resultados dos seguintes tratamentos: a) Formulação comercial; b) NCs/ATZ e c) NEs/ATZ. ....	72
Figura 21: Índice de germinação das sementes de <i>Brassica sp</i> nas diferentes frações de solo proveniente de cada tratamento. Valores representam a média do índice de	

germinação para 10 sementes plantadas. Ensaio realizado em quintuplicata e determinados à 25 °C. .... 73

Figura 22: Resultados das análises do comprimento da raiz observados ao longo do perfil da coluna de solo após a aplicação das formulações e crescimento das plantas por um período de duas semanas. A fim de realização de comparação entre os diferentes grupos foi feita análise estatística do parâmetro comprimento da raiz sendo representados em: a) comparação das formulações com o controle; b) comparação da formulação comercial e de NPs/ATZ com o ativo ATZ; c) comparação da formulação comercial com as NPs/ATZ. Valores representam a média de cinco determinações; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$ . .... 74

Figura 23: Resultado das análises da altura da parte aérea das plantas observados ao longo do perfil da coluna de solo após a aplicação das formulações e crescimento das plantas após um período de duas semanas. A fim de realizar comparação entre os diferentes grupos foi feita análise estatística do parâmetro altura da parte aérea sendo representados em: a) comparação das formulações com o controle; b) comparação da formulação comercial e de NPs/ATZ com o ativo ATZ; c) comparação da formulação comercial com as NPs/ ATZ. Valores representam a média de cinco determinações; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$ . .... 76

Figura 24: Resultados obtidos para a matéria verde das plantas observado ao longo do perfil da coluna de solo após a aplicação das formulações e crescimento das plantas sobre este solo. A fim de comparação entre os diferentes grupos foi feita análise estatística do parâmetro matéria verde, sendo representados em: a) comparação das formulações com o controle; b) comparação da formulação comercial e de NPs/ATZ com ATZ; c) comparação da formulação comercial com as NPs/ATZ. Valores representam a média de cinco determinações; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$ . .... 78

Figura 25: Resultados obtidos para a matéria seca das plantas observados ao longo do perfil da coluna de solo após a aplicação das formulações e crescimento das plantas sobre este solo. A fim de realização de comparação entre os diferentes grupos foi feita análise estatística do parâmetro massa de matéria seca, sendo representados em: a) comparação das formulações com o negativo; b) comparação da formulação comercial e de NPs/ ATZ com o ativo ATZ; c) comparação da formulação comercial as NPs/ ATZ. Valores representam a média de cinco determinações; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$ . .... 80

Figura 26: Comparação entre os pontos A (0-4 cm) e B (4-8 cm) para os parâmetros analisados: A) altura; B) comprimento das raízes; C) matéria verde; D) matéria seca, observados ao longo do perfil da coluna de solo após a aplicação das formulações e crescimento das plantas sobre este solo. A fim de realização de comparação entre os efeitos do ativo ATZ no ponto A da coluna de solo em relação aos efeitos da ATZ e as NPs no ponto B. Estatística: \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$ . .... 82

Figura 27: Resultados obtidos para os parâmetros analisados A) número de folhas; B) altura; C) comprimento das raízes; D) matéria verde; E) matéria seca, observados ao longo do perfil da coluna de solo após a aplicação das formulações e crescimento das plantas sobre este solo. A fim de realização de comparação entre os efeitos da formulação comercial no ponto A da coluna de solo em relação aos efeitos da formulação comercial e as NPs no ponto B. Estatística: \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$ . ..... 83

Figura 28: Imagem das células de *Allium cepa* obtidas por análise de microscopia ótica. A figura apresenta as principais fases de divisão celular (indicadas por setas) como: prófase, metáfase, anáfase e telófase. Imagem obtida com aumento de 40 vezes. .... 86

Figura 29: Valores dos índices mitóticos relativos, calculados para os diferentes tratamentos (controle, NPs/ATZ, NPs, ATZ e formulação comercial), obtido a partir das análises das lâminas de *Allium cepa*. Os dados representam a média das análises de três lâminas por tratamento. \* Os valores de concentração são um indicativo de que as NPs encontram-se na mesma diluição das NPs/ATZ e desta forma, não representam a concentração das NPs e do ativo ATZ, uma vez que estas encontram-se sem ativo. .... 88

Figura 30: Índice de aberrações cromossômicas obtidas a partir da análise das lâminas de *Allium cepa* expostas aos diferentes tratamentos (controle, NPs/ATZ, NPs, ATZ e formulação comercial). Foram realizadas análise de três lâminas por tratamento: a) comparação estatística do ativo ATZ, formulação comercial, NCs/ATZ e NEs/ATZ em relação ao controle; b) comparação estatística da formulação comercial, NCs/ATZ e NEs/ATZ em relação à ATZ; c) comparação estatística das NCs/ATZ e NEs/ATZ em relação à formulação comercial. \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$ . \*\*\*\* Os valores de concentração são um indicativo de que as NPs encontram-se na mesma diluição das NPs/ATZ e desta forma, não representam a concentração das NPs e do ativo ATZ, uma vez que estas encontram-se sem ativo. .... 91

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Condições cromatográficas para análise da ATZ por CLAE. ....	34
Tabela 2: Resultados da caracterização físico-química das NPs de PCL, contendo ou não ATZ. Dados de diâmetro (nm), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (PZ em mV), pH e eficiência de encapsulação da ATZ (EE) em %. Os valores apresentados indicam a média de três determinações. ....	51
Tabela 3: Ligações e faixas de absorção dos compostos ATZ, PCL, NCs, NEs, NCs/ATZ, NEs/ATZ encontradas por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier. Espectros coletados em uma faixa de 4000 a 400 $\text{cm}^{-1}$ , foram coletadas 32 varreduras com resolução de 2 $\text{cm}^{-1}$ . ....	62
Tabela 4: Valores da constante cinética de liberação (k) do expoente de liberação (n) coeficiente de correlação linear (r) das lineares obidas. ....	66
Tabela 5: Resultados obtidos a partir da análise das lâminas de <i>Allium cepa</i> para os diferentes tratamentos (controle, NPs/ATZ, ATZ e formulação comercial) em função de diferentes concentrações de ATZ, sendo as NPs sem ATZ avaliadas nas mesmas concentrações. Na tabela TCI, IM e IMR representam o total de células em intérfase, índice mitótico e índice mitótico relativo, respectivamente. Os valores de IM e IMR representam a média da análise de três lâminas. ....	87
Tabela 6: Resultados obtidos a partir da análise das lâminas de <i>Allium cepa</i> para os diferentes tratamentos (controle, NPs/ATZ, ATZ e formulação comercial) em função de diferentes concentrações de ATZ sendo as NPs sem ATZ avaliadas nas mesmas concentrações. Na tabela TDC = total de divisão celular; TAC = total de aberração cromossômica; TCI = total de células em intérfase MT = mutações; IAC = Índice de aberrações cromossômicas. Os valores representam a média da análise de três lâminas. ....	90

## **Lista de Abreviaturas:**

ANVISA: Agência de vigilância sanitária

ATZ: Atrazina

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

DA: Defensivos Agrícolas

EE: Eficiência de encapsulação

FTIR: Espectroscopia de infravermelho por tomada de Fourier

Hb: Herbicidas

IAC: Índice de aberração cromossômica

MAPA: Ministério da agricultura e meio ambiente

MT: Mutações

NCs/ATZ: Nanocápsulas de PCL encapsuladas com ATZ

NCs: Nanocápsulas

NEs/ATZ: Nanoesferas de PCL encapsuladas com ATZ

NEs: Nanoesferas

NPs/ATZ: NCs e NEs encapsuladas com ATZ

NPs: Nanopartículas

PCL: Poli-ε-caprolactona

PDI: Índice de polidispersão

TCI: Total de célula em interfase

TDC: Total de divisão celular

# Sumário

1. Introdução .....	17
1.1 Aumento da produção e rentabilidade na Agricultura.....	17
1.2 Defensivos agrícolas: uso e impactos.....	18
1.3 Plantas daninhas e herbicidas.....	21
1.3.1 <i>Herbicidas inibidores fotossintéticos: S-Triazínicos</i> .....	23
1.3.2 <i>Herbicida Atrazina</i> .....	25
1.4 Nanotecnologia e aplicações na agricultura .....	27
1.4.1 Nanopartículas poliméricas e aplicação na agricultura .....	29
2. Objetivos .....	31
2.1 Objetivos Gerais .....	31
2.2 Objetivos Específicos.....	31
3 Materiais e Métodos .....	33
3.1 Materiais.....	33
3.2 Métodos.....	34
3.2.1 <i>Quantificação da ATZ por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência</i> .....	34
3.2.2 <i>Preparo de nanocápsulas e nanoesferas de PCL contendo ATZ</i> .....	34
3.2.3.1 <i>Medidas de polidispersão e de diâmetro hidrodinâmico</i> .....	36
3.2.3.2 <i>Determinação do potencial zeta das suspensões de NPs</i> .....	36
3.2.3.3 <i>Estabilidade físico-química do polímero</i> .....	37
3.2.3.4 <i>Medida de eficiência de encapsulação</i> .....	37
3.2.3 <i>Avaliação da estabilidade das NPs</i> .....	38
3.2.3.5 <i>Caracterização por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i> .....	38
3.2.3.7 <i>Modelagem matemática dos ensaios de liberação</i> .....	40



3.2.4 Ensaio de interação com solo e avaliação da atividade herbicida .....	41
3.2.4.1 Ensaio em coluna de solo.....	41
3.2.4.2 <i>Umidade do Solo</i> .....	43
3.2.4.3 <i>Análise de concentração de ATZ ao longo do perfil do solo</i> .....	43
3.2.4.4 <i>Avaliação da atividade herbicida ao longo do perfil da coluna de solo</i> .....	44
3.2.5 <i>Ensaio de aberração cromossômica em Allium cepa</i> .....	46
3.2.5.1 <i>Análises das lâminas obtidas no ensaio Allium cepa</i> .....	48
<b>4. Resultado e Discussão .....</b>	<b>51</b>
4.1 Caracterização das NPs de PCL.....	51
4.2 Medidas de estabilidade das formulações.....	54
4.3 Estudo da interação entre ATZ e NPs de PCL por espectroscopia de infravermelho .....	59
4.4 Ensaio de cinética de liberação da ATZ.....	63
4.5 Ensaio de interação com solo e avaliação da atividade herbicida da atrazina ..	68
4.5.1 Índice de germinação.....	72
4.5.2 <i>Avaliação de parâmetros quantitativos do efeito dos herbicidas ao longo da coluna de solo</i> .....	74
4.5.3 Efetividade das formulações de NPs .....	81
4.6 Ensaio de Allium Cepa.....	85
4.6.1 Análise do efeito das formulações sobre o índice mitótico.....	85
4.6.2 Análise do efeito das formulações sobre o índice de Aberração Cromossômica ..	89
<b>5. Conclusões.....</b>	<b>95</b>
<b>6 Referências .....</b>	<b>97</b>

## 1. Introdução

### 1.1 Aumento da produção e rentabilidade na Agricultura

A “Revolução Verde” ocorrida na década de 1960, movida pelo aumento da necessidade da produtividade rural, modernizou o campo com a intensificação do uso de máquinas agrícolas, equipamentos modernos, fertilizantes, defensivos agrícolas, sementes e matrizes melhoradas. Essa revolução foi importante para a expansão do setor agrícola, sendo fundamental para os avanços na área de química, engenharia mecânica e genética (AGUIAR & MONTEIRO, 2005).

Os usos destas tecnologias contribuíram para o aumento da produção e estima-se que até 2030 o mundo deverá aumentar em 40% sua produção agrícola para suprir a demanda de alimentos em escala mundial. Estima-se ainda que em 2030 a oferta de recursos naturais como água potável, disponibilidade de solo agriculturável, energética entre outros serão limitados e comprometidos pelas ações indiscriminadas do uso das tecnologias atuais (BEDDINGTON, 2010).

Estas tecnologias são escolhidas pela eficiência e rentabilidade para os produtores rurais, porém algumas delas são impactantes ao meio ambiente, afetando recursos naturais, que indiretamente afetam a população. Este fato gera discussões e debates sobre as vantagens da rentabilidade econômica *versus* impacto ambiental, na qual muitas vezes as escolhas levam em conta apenas o aumento da rentabilidade (RODRIGUES, 2005).

Atualmente, devido ao aumento da demanda na produção de alimentos, existe ainda a necessidade de desenvolvimento de novas tecnologias para aplicação em agricultura (ZEIGHER & MOHANTY, 2010). Os organismos geneticamente modificados são umas das tecnologias empregadas que trazem benefícios devido à redução dos custos e ao aumento da produtividade agrícola (SILVEIRA *et al.*, 2005).

## 1.2 Defensivos agrícolas: uso e impactos

Defensivos agrícolas (DA) são substâncias químicas ou a mistura de substâncias utilizadas para o controle, prevenção e eliminação de vetores de doenças que interferem na produção, elaboração, armazenamento, transporte e comercialização de alimentos, produtos agrícolas, madeiras entre outros (MAPA, 2012; ALONZO & CORREIA, 2003).

Os DA podem ainda ser divididos em diferentes classes, de acordo com o foco de aplicação, dentre os quais, destacam-se: inseticidas, larvicidas, formicidas, acaricidas, carrapaticidas, nematicidas, moluscicidas, rodenticidas, raticidas, avicidas, fungicidas e herbicidas. Outros produtos também entram nesta lista, dentre os quais, agentes desfolhantes, antibrotantes, dessecantes e os conservadores de madeira (ALMEIDA *et al.*, 1985). Dentre os DA, praguicidas ou pesticidas são classificados em quatro classes de acordo com o potencial tóxico, sendo: Classe I extremamente tóxicos, Classe II altamente tóxicos, Classe III mediamente tóxicos e por último a Classe IV considerados pouco tóxicos (SIQUEIRA & KUSE, 2008).

Na década de 1970, o uso de DA foi estimulado por políticas de estado, vinculados com a imagem da redução de trabalho, controle a pragas e benefícios na produção. A partir deste momento, esses produtos passaram a ser utilizados rotineiramente por trabalhadores rurais (SOUZA *et al.*, 2011).

Desde então, os DA tem se tornado necessário à maioria dos sistemas rurais, sendo uma prática aplicada na maioria das culturas agrícolas, possibilitando o aumento da produção, com a diminuição do manejo e uso de recursos mecânicos por área cultivada (VEIGA, 2007). A não aplicação das normas de segurança básica, a falta de informação sobre os riscos do uso destes produtos são quadros que agravam a contaminação humana e ambiental no Brasil (PERES & MOREIRA, 2002). Desta forma, o aumento do uso de DA no Brasil deve levar em consi-

deração não só a aplicação, mas também o impacto que estes causam sobre o meio ambiente e a saúde humana (PEDLOWSKI *et al.*, 2012).

Como exemplo, os recursos hídricos que atuam como integradores em processos biogeoquímicos superficiais ou subterrâneos são um dos principais destinos dos DA (RIBEIRO & LOURENCETTI, 2007). A contaminação de recursos hídricos por DA tem sido alvo de estudo na literatura (MILHOME *et al.*, 2009; BRITTO *et al.*, 2012; COPATTI *et al.*, 2009) e tem demonstrado que no Brasil a maioria dos DA utilizados são encontrados nos corpos hídricos em concentrações dentro dos limites estabelecidos pelos órgãos regulatórios brasileiros, mas muitas vezes ultrapassam os limites estabelecidos por agências reguladoras da Europa (BRITTO *et al.*, 2012; COPATTI *et al.*, 2009).

Além da preocupação com a contaminação dos recursos hídricos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2006), tem discutido a questão dos resíduos de DA em alimentos, somente em anos mais recentes com os avanços tecnológicos, a quantificação dos resíduos de insumos utilizados na agricultura vem permitindo avaliar a qualidade dos alimentos que chegam ao consumidor.

No Brasil, o programa para análise de DA em alimentos (PARA) tem levantado dados que chamam a atenção em relação à utilização desses produtos de produtores e de autoridades. O monitoramento de resíduos de DA em alimentos no período de 2001 a 2010 revelou que 48,3% das amostras se encontravam contaminadas com algum tipo de DA. Desses, 13,2% apresentavam irregularidades como o uso de compostos não autorizados pela legislação brasileira, e menos de 3% apresentavam concentração de resíduos acima do recomendado. Destes 3%, a maioria dos alimentos estavam contaminados com DA da classe dos ditiocarbamatos (41,6%) e dos organofosforados (30,8%) (JARDIM & CALDAS, 2012).

Atualmente o conhecimento sobre os efeitos dos DA tem demonstrado os riscos que estes trazem à saúde humana e ao ambiente (GUILLETTE & IGUSHI, 2012). Devido a sua intensa utilização, os DA são alvo de diversos estudos por

causa dos danos gerados a saúde humana, em especial dos trabalhadores rurais que são os que apresentam maiores riscos de contaminação por DA. Estes podem ser absorvidos principalmente pela via dérmica e respiratória, podendo assim causar intoxicações agudas ou crônicas (SILVA *et al.*, 2005).

A exposição dos agricultores aos DA muitas vezes deve-se ao fato destes não utilizarem equipamentos de proteção individual, a falta de informação e conhecimento sobre a toxicidade dos produtos aumentando desta forma, o risco da exposição ocupacional que pode gerar efeitos genotóxicos e por consequência o desenvolvimento de neoplasias (PEREIRA *et al.*, 2010; PACHECO & HACKEL 2002; BREGA *et al.*, 1998).

Estudos sobre o impacto dos DA na saúde humana têm sido realizados, porém, ainda não é possível correlacionar à intensidade dos danos gerados com a quantidade de DA a que um indivíduo foi exposto, de forma aguda ou até mesmo, pelo seu uso prolongado (FARIA *et al.*, 2007). Os efeitos dos DA no organismo permanecem por longos períodos, mesmo após a interrupção da exposição. A manutenção destes compostos químicos no organismo deve-se ao tempo de meia-vida do ativo e de seus metabólitos e também a fatores como a lipossolubilidade da molécula que facilita o seu armazenamento no tecido adiposo (SOUZA *et al.*, 2011). A concentração elevada de DA no organismo podem causar anomalias congênitas, doenças mentais e problemas relacionados à reprodução humana (SIQUEIRA & KRUSE; 2008).

Estes efeitos tóxicos apontados na literatura mostra que se fazem necessárias alternativas que tornem mais seguro a aplicação destes produtos como também uma maior fiscalização da utilização destes produtos por agricultores (GARCIA *et al.*; 2005).

### 1.3 Plantas daninhas e herbicidas

Plantas que infestam áreas agrícolas as quais não são do interesse do cultivo, são definidas como “daninhas”. São plantas com características pioneiras, possuem grande capacidade de reprodução e adaptação em diversos ambientes (PITELLI, 1987). Plantas daninhas não são capazes de produzir alimentos e habitam espontaneamente culturas agrícolas causando competição por luz, água e nutrientes e desta forma, reduzem o desenvolvimento das culturas agrícolas, ocasionando resultados indesejáveis como plantas menores, queda na produção agrícola por hectare, redução no tamanho dos frutos e grãos, bem como retardam a maturação desses no campo (HERNANDEZ *et al.*, 2007). Para o controle de plantas daninhas se usam DA denominados de herbicidas (Hb). O Brasil é um dos países que mais comercializam pesticidas, dentre os quais aproximadamente 50% são Hb (PEIXOTO *et al.*, 2012).

Para o controle de plantas daninhas existem diferentes metodologias, dentre as quais se destacam o controle mecânico (capinar) e o controle químico com a utilização de Hb. O controle mecânico possui alguns inconvenientes como alta demanda de tempo e mão de obra, altera a estrutura física do solo e pode danificar plantas não alvo. Por outro lado, os Hb atingem locais inacessíveis na área de plantio, reduzem ou eliminam os riscos de danos às raízes ou plantas novas, não alteram a estrutura física do solo (evitando assim a erosão), reduzem a mão de obra humana, aumentam a rapidez e eficiência da operação de controle de ervas daninhas. No entanto, demandam equipamentos para aplicação nas culturas e podem causar efeitos tóxicos ao ambiente e aos seres humanos (GOMES & CHRISTOFFOLETI, 2008).

Os Hb possuem a capacidade de provocar alterações metabólicas nas plantas daninhas levando as mesmas à morte, enquanto as plantas não alvo apresentam resistência a estes produtos, fazendo com que os mesmos tenham uma ação seletiva (CAMPBELL & FARREL *et al.*, 2007).

Normalmente após a aplicação à ação dos Hb depende de sua absorção e translocação na planta daninha e do metabolismo e sensibilidade da planta ao Hb e/ou aos seus metabólitos. Muitos Hb são classificados dependendo da forma de absorção e translocação no interior da planta, fazendo com que atinja o alvo celular específico (SILVA *et al.*, 2007).

Os Hb atuam principalmente de duas maneiras: inibindo a atividade enzimática, levando células vegetais à morte ou inibindo o crescimento celular. Cada Hb (ou classe) tem um mecanismo de ação específico, por exemplo, o Hb benzoato de sódio 2,6-bis ((4,6-dimetoxipirimidim-2-i) oxi) (nome comercial: byspibac de sódio) inibe a enzima acetolactato sintase (ALS, EC 2.2.1.6), enzima responsável pela síntese de aminoácidos de cadeia ramificada, além de bloquear fases do ciclo celular (MACHADO *et al.*, 2006). O Hb clomazone inibe a síntese de carotenoides e pode gerar espécies reativas de oxigênio, causando assim estresse oxidativo nas células das plantas daninhas. Neste caso, são formadas espécies reativas de oxigênio como oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), superóxido ( $O^{2-}$ ), radical hidroxila ( $OH^*$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) que são capazes de peroxidar as membranas lipídicas, levando a reação em cadeia que leva as células à morte (MACHADO *et al.*, 2006).

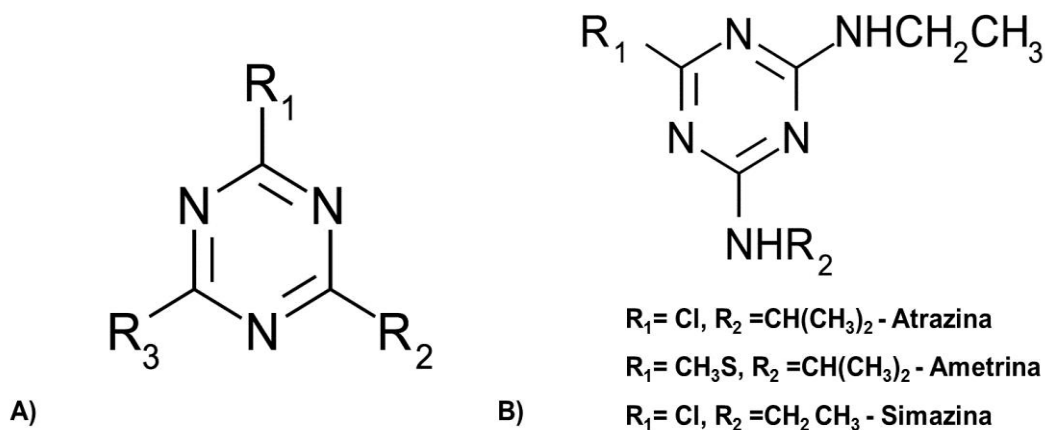
No caso do Hb anitrol, seu mecanismo de ação visa inibir a síntese de carotenóides e, além disso, a de clorofila, fazendo com que as plantas sofram perda de pigmentação e por consequência sejam levadas à morte. Outros Hb, como o diuron, atuam no fotossistema, inibindo a transferência de elétrons no fotossistema II, enquanto outros Hb, como o diquat e paraquat, atuam no fotossistema I, competindo com os aceptores de elétrons (CAMPBELL & FARREL, 2007).

Os processos de metabolização de Hb nas plantas podem ser classificados em quatro fases. A *primeira fase* é a transformação, na qual o composto pode sofrer processos de oxidação, redução e hidrólise. Na *segunda fase*, ocorrem reações de conjugação do Hb com açúcares, devido à formação de uma ligação gli-

cosídica pela ação de enzimas glicosiltransferases. Este metabólito pode sofrer ação da enzima glutationa-S-transferase, que resulta em produtos menos fitotóxicos e mais solúveis em água. Na *terceira fase*, ocorre a compartimentalização, em que há o transporte do Hb (metabólitos) para dentro do vacúolo ou à matriz extracelular. Já na *quarta fase*, ocorre o processamento completo destes compostos (COLEN, 1994).

### 1.3.1 Herbicidas inibidores fotossintéticos: S-Triazínicos

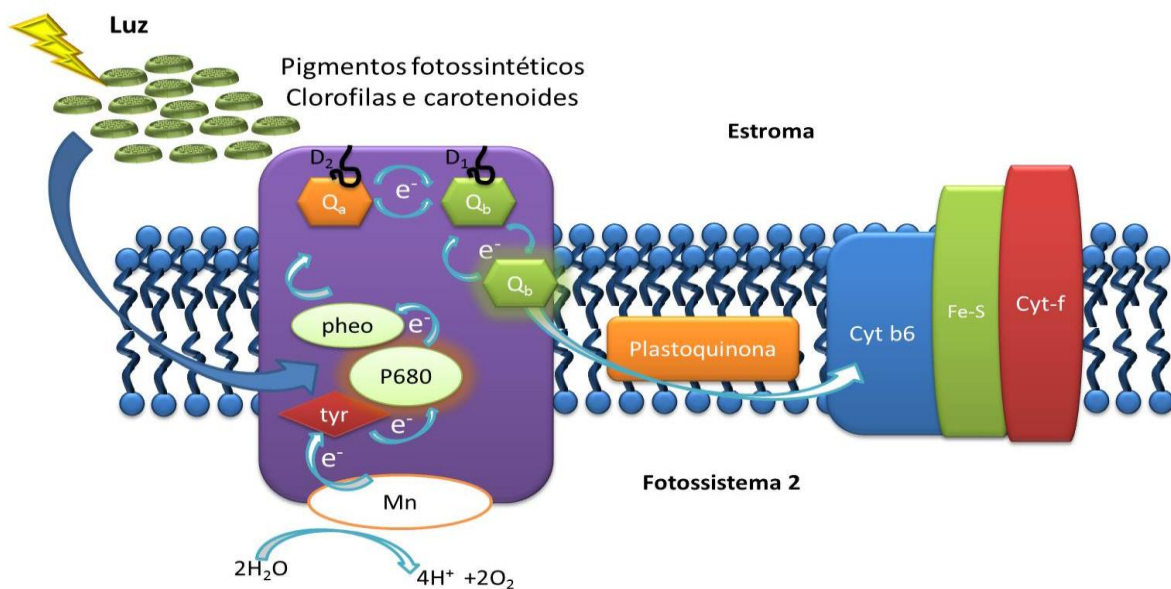
Os Hb triazínicos (Figura 1) são usados na agricultura para o controle de plantas daninhas, possuindo como mecanismo de ação a inibição do processo fotossintético. Entre os Hb triazínicos, destacam-se a atrazina (ATZ), a ametrina, a simazina e a propazina. Os Hb triazínicos possuem amplo espectro de aplicação e desta forma, podem ser utilizados em diferentes tipos de culturas para o controle pré e pós-emergente de ervas daninhas (COUTINHO *et al.*, 2005).



**Figura 1:** A) Estrutura química geral dos herbicidas triazínicos: os herbicidas triazínicos se diferenciam pelos grupos radicais  $R_1$ ,  $R_2$  e  $R_3$ ; B) Fórmula estrutural dos herbicidas S-triazínicos ATZ, ametrina e simazina, sendo as principais diferenças estruturais devidas as alterações nos grupamentos  $R_1$  e  $R_2$ .

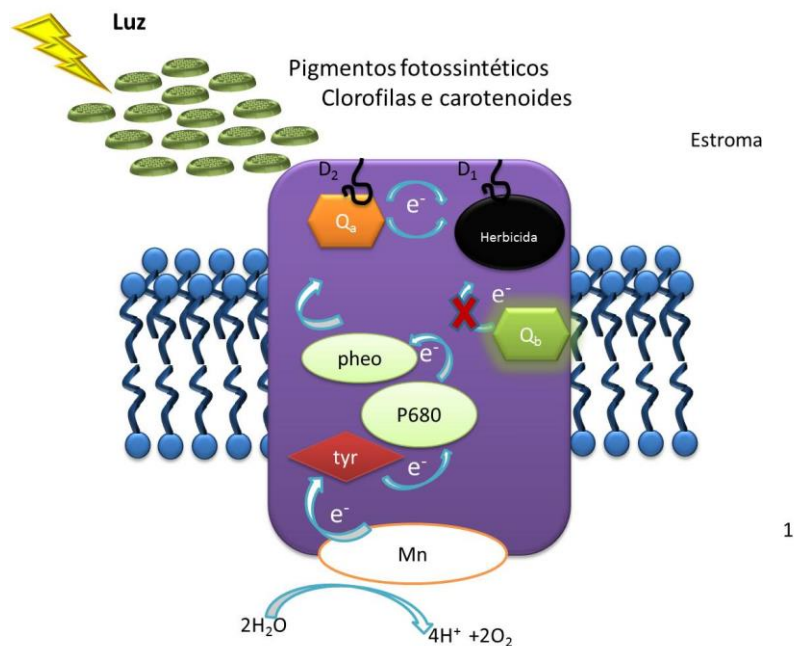


Na fotossíntese, a energia luminosa é capturada pelos pigmentos fotossintéticos (clorofilas e carotenóides), transferida ao centro de reação  $P_{680}$  do fotossistema II, que oxida uma molécula de  $H_2O$  gerando um elétron (Figura 2). Este elétron é transferido à plastoquinona  $Q_a$  que transfere o elétron à plastoquinona  $Q_b$  que se move através da membrana para a plastoquinona que transporta o elétron do fotossistema II para o I. No fotossistema I, a absorção de luz pelo centro de reação  $P_{780}$  leva às series de reações de transferência de elétrons que ativa a enzima *ferredoxina NADP<sup>+</sup> redutase*, gerando NADPH (CAMPBELL & FARREL, 2007). Os íons de hidrogênio e a coenzima NADPH formados, respectivamente, nos fotossistemas II e I, reduzem o pH no espaço tilacóide ativando a *ATP sintase* que inicia a produção de ATP.



**Figura 2:** Representação do processo de captação de luz no fotossistema II. A energia luminosa é captada pelos pigmentos fotossintéticos e transferida para o centro de reação  $P_{680}$ , fazendo com que ocorra a excitação de elétrons. Estes elétrons entram em uma cadeia transportadora dentro do sistema fotossintético II e posteriormente são transferidos ao fotossistema I.

Os Hb s-triazínicos competem pelo sítio da proteína D1 impedindo a transferência de elétrons do fotossistema II para o I (ACHIM, 2008), conforme mostra a Figura 3. Desta forma, inibem a cadeia de transporte de elétrons, impedindo a oxidação da água no PSII e a produção de NADPH no PSI.



**Figura 3:** Representação do processo de inibição do processo fotossintético por Hb triazínicos. A partir da figura, é possível observar que os Hb triazínicos se ligam à proteína D<sub>1</sub> e, conseqüentemente, interrompem o transporte dos elétrons do sistema Q<sub>b</sub> para a plastoquinona, cessando o fluxo de elétrons do fotossistema II para o I.

### 1.3.2 Herbicida Atrazina

Entre os Hb triazínicos, a atrazina - ATZ (6-cloro-N<sup>2</sup>-etil-N<sup>4</sup>-isopropil-1, 3, 5-triazina-2, 4-diamina) (Figura 1B) possui caráter básico devido aos seus grupos amino e a baixa solubilidade em água (33 mg/L) (MARTINAZZO *et al.*, 2011). A aplicação de ATZ pode ser pré e pós emergente nas culturas de abacaxi, cana de

açúcar, milho, pinos, seringueira, sisal e sorgo, e ainda apresenta cerca de 40 diferentes produtos formulados com registro no Brasil (MAPA, 2012). A ATZ atua no fotossistema II, inibindo indiretamente a oxidação da água no fotossistema II, consequentemente impede formação de íons de hidrogênio e oxigênio. O bloqueio na transferência de elétrons para o fotossistema I impede a formação da coenzima NADPH. O bloqueio na transferência de elétrons tem como consequência a não ativação da ATP sintase, que gera energia para a célula vegetal, levando esta à morte (CAMPBELL & FARRELL, 2007).

As características do solo determinam a retenção da ATZ e o tempo de permanência, sendo que fatores como alta temperatura e chuva ajudam na degradação desse composto por aumento de atividade microbiana (BRIGHENTI *et al.*, 2002). O uso da ATZ pode afetar plantas não alvo, reduzindo o desenvolvimento e a produtividade, gerando bioacumulação, podendo assim causar danos aos seres humanos (Li *et al.*, 2012).

Além disso, a composição do solo influencia no efeito da ATZ em plantas daninhas, como exemplo, solos ricos em matéria orgânica causam uma redução na atividade Hb devido ao aumento da sorção no solo e consequentemente diminuindo a biodisponibilidade deste composto para sua ação (DE SIMONE *et al.*, 1992).

A sua ampla aplicação e a alta persistência em solo são frequentemente citadas na literatura como principais fontes de contaminação de recursos hídricos (BORTOLLUZI *et al.*, 2006; GRAYMORE *et al.*, 2001). A contaminação de corpos hídricos por ATZ tem afetado o desenvolvimento de espécies aquáticas, levando a uma diminuição das taxas de reprodução destes (HAYES *et al.*, 2002). Neste sentido, o desenvolvimento de sistemas que minimizem a contaminação de recursos naturais por ATZ é importante para redução de custos com processos de remediação de áreas contaminadas (CORREIA & LANGEMBACH, 2006). Para minimizar os impactos causados por estes Hb tem-se descrito na literatura a utilização de

sistemas carreadores baseados em micropartículas e NPs. Esses carreadores se apresentam como uma alternativa interessante, pois além de reduzir efeitos tóxicos, melhoram as propriedades físico-químicas destes compostos (CEA *et al.*, 2010; GRILLO *et al.*, 2012, SILVA *et al.*, 2010).

#### **1.4 Nanotecnologia e aplicações na agricultura**

A nanotecnologia envolve várias áreas da ciência como a biologia, farmácia e física, tendo a química como base para o seu desenvolvimento, devido os conhecimentos relacionados à estrutura, composição e propriedades da matéria em nível atômico e molecular (REY, 2003). Essa tecnologia consiste no uso de materiais na escala nanométrica que possuem propriedades físico-químicas diferenciadas como aumento da área superficial, mudanças nas propriedades mecânicas, ópticas, magnéticas ou químicas quando comparadas com o mesmo material em escala macroscópica (QUINA, 2004).

Existe uma grande diversidade de nanomateriais na forma de nanopartículas (NPs) que podem ser classificados de acordo com o material de origem, como por exemplo os com bases carbonáceas, os de óxidos metálicos, os de materiais semi-condutores e os de metais como prata, ouro e ferro. Destaca-se ainda o desenvolvimento de novos materiais como as nanofibras, nanofolhas e nanofios (KLAINE *et al.*, 2008).

O emprego da nanotecnologia tem crescido exponencialmente e hoje se podem encontrar produtos no mercado que utilizam materiais em escala nanométrica em sua composição, assim como informações sobre a caracterização destes materiais, modelagem e simulação de suas propriedades (GALEMBECK *et al.*, 2007; MCNEIL, 2005).

O desenvolvimento de nanomateriais pela indústria visa aplicações em medicina, como exemplo seguem as NPs para diagnóstico de doenças, próteses con-

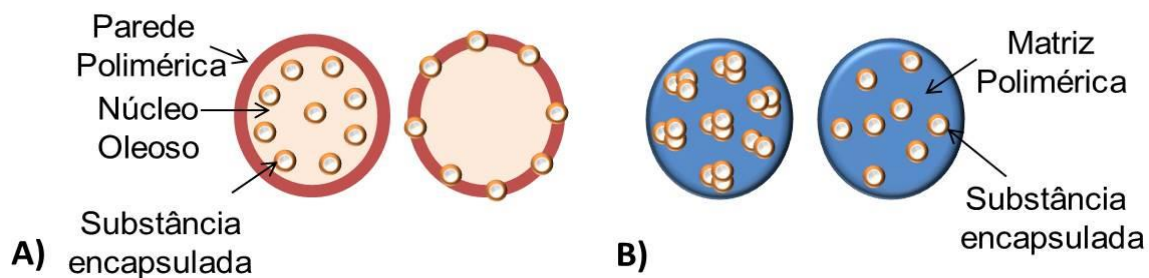
tendo materiais nanoestruturados que aumentam a resistência mecânica e a durabilidade do material, bem como os sistemas de liberação de fármacos. Destaca-se que a aplicação destes materiais na área farmacêutica/médica deve ocupar o terceiro lugar do setor de nanotecnologia até 2015 (REDIGUIERI, 2009).

A mesma estratégia que está sendo utilizada para a área farmacêutica/médica tem sido aplicada visando melhorar problemas da agricultura. A nanotecnologia aplicada à agricultura é bastante recente e procura promover o desenvolvimento de produtos/processos/dispositivos que aumentem as vantagens em relação aos sistemas convencionais. As aplicações de nanotecnologia em agricultura vão desde a detecção de doenças através do uso de nanosensores, passando pela liberação/direcionamento de nutrientes às plantas, aumento do tempo de armazenamento de alimentos, até a redução da quantidade de DA utilizados, causando assim menor contaminação ambiental e à saúde humana (CHEN & YADA *et al.*, 2011; GARCIA *et al.*, 2010; NAIR *et al.*, 2010; RAMOS *et al.*, 2009).

Um exemplo do uso de nanomateriais em agricultura é o desenvolvimento de filmes comestíveis para revestimento de frutas e legumes que utilizam materiais nanoestruturados em sua composição, fazendo assim com que o tempo de armazenamento em prateleira seja aumentado devido a proteção desses alimentos da degradação por microrganismos (MEDEIROS *et al.*, 2011).

### 1.4.1 Nanopartículas poliméricas e aplicação na agricultura

As NPs poliméricas podem ser encontradas na forma de nanoesferas (NEs) e nanocápsulas (NCs) devido às diferenças em seus aspectos estruturais. As NCs são constituídas por um invólucro polimérico, disposto ao redor de um núcleo oleoso. A substância a ser encapsulada pode ser encontrada interagindo com a parede polimérica ou distribuída no núcleo oleoso. Já as NEs diferem das NCs, pois em sua composição não há óleo, sendo a partícula formada apenas pela matriz polimérica. Nestas partículas a substância pode ser encapsulada na matriz polimérica ou adsorvida na superfície da partícula (Figura 4) (MÜLLER *et al.*, 2002).



**Figura 4:** Nanopartículas poliméricas. A) Nanocápsulas poliméricas, sendo demonstrado o ativo tanto na parede polimérica como no núcleo oleoso. B) Nanoesferas poliméricas, sendo demonstrado o ativo retido na matriz polimérica.

As NPs poliméricas podem ser utilizadas como sistemas carreadores de compostos bioativos, levando a uma liberação modificada, podendo prolongar o tempo de ação deste ativo, bem como, direcionar o ativo ao organismo alvo com maior eficiência.

Sistemas de carregamento baseados em NPs podem resultar em produtos com maiores benefícios para agricultura (WANYIKA *et al.*, 2012), podendo aumentar a distribuição desses produtos na área foliar proporcionando uma maior efici-

ência (LIU *et al.*, 2008). A utilização de NPs como sistemas carreadores de Hb pode trazer benefícios, dentre eles a diminuição de processos de lixiviação, minimizando assim possíveis contaminações de recursos hídricos subterrâneos (CEA *et al.*, 2010).

Tradicionalmente, os DA são aplicados várias vezes ao longo do período de cultivo de uma cultura. Esta estratégia é realizada muitas vezes, pelo fato da concentração do ativo que chega aos organismos alvos não atingir a quantidade mínima efetiva em uma primeira aplicação, fato este devido a fatores como: degradação do ativo, sorção em solo, processos de lixiviação entre outros (NAIR *et al.*, 2010).

O uso de NPs para inseticidas além de se apresenta como uma alternativa mais eficiente e econômico para a proteção de lavouras (SARKAR *et al.*, 2012; POPAT *et al.*, 2012), reduzindo a concentração efetiva e prolongando o tempo de ação quando comparado com produtos não baseados em NPs, promovendo maior controle de insetos (LOHA *et al.*, 2012) e também pode reduzir a intoxicação de organismos não alvo (LI *et al.*, 2012).

Vários sistemas de NPs preparadas utilizando diferentes tipos de polímeros como poli-(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV), poli( $\epsilon$ -caprolactona), alginato/quitosana possuem grande potencial para aplicação de DA na agricultura, uma vez que por serem biodegradáveis poderão melhorar o direcionamento destes compostos aos organismos alvos, causando assim menores impactos ao ambiente (CEA *et al.*, 2010; GRILLO *et al.*, 2012; LOBO *et al.*, 2011; POPAT *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2012; SARKAR *et al.*; 2012).

## 2. Objetivos

### 2.1 *Objetivos Gerais*

O presente trabalho teve como objetivo preparar e caracterizar NCs e NEs poliméricas de poli-épsilon-caprolactona como sistema carreador para o Hb ATZ, visando futuras aplicações em agricultura de forma a gerar alternativas mais seguras para o uso desse Hb.

### 2.2 *Objetivos Específicos*

- ✓ Preparo das NPs poliméricas (NCs e NEs) contendo o Hb ATZ pelo método de emulsificação seguida de evaporação do solvente;
- ✓ Determinação da eficiência de encapsulação do Hb ATZ nas NPs poliméricas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- ✓ Caracterização físico-química através da medida de distribuição de tamanho e potencial zeta das NPs por espectroscopia de correlação de fótons, microeletroforese e espectroscopia de infravermelho por tomada de Fourier (FTIR);
- ✓ Avaliação do perfil de liberação através dos ensaios de cinética de liberação da ATZ encapsulada ou não e avaliação do mecanismo de liberação através da aplicação de modelo matemático de Korsmeyer-Peppas;
- ✓ Avaliação da atividade Hb, através de ensaios em coluna de solo para avaliar o comportamento da ATZ encapsulada nas NPs ou não em solo, seguido da avaliação da atividade Hb ao longo do perfil da coluna de solo;
- ✓ Avaliação da genotoxicidade da ATZ encapsulada nas NPs ou não através do ensaio de aberração cromossômica em *Allium cepa*.





### 3 Materiais e Métodos

#### 3.1 Materiais

ATZ (grau de pureza 95%)-Pestanal<sup>®</sup>

Poli( $\epsilon$ -caprolactona) PCL 65.000 Da Da-Sigma<sup>®</sup>

Triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico (Myritol<sup>®</sup> 318)- Cognis<sup>®</sup>

Diclorometano (grau espectroscópico analítico)- Cetus<sup>®</sup>

Acetona (grau espectroscópico analítico)- Merck<sup>®</sup>

Poli (vinil álcool), 87- hidrolisado 90%- (PVA)- Da Sigma

Agitador magnético- Tecnal<sup>®</sup>

Dispositivo de ultracentrifugação de celulose regenerada de 30 kDa-Millipore

Microcentrífuga-Ministar<sup>®</sup>

Evaporador Rotativo AL 390-American Lab<sup>®</sup>

Bomba à vácuo A12- Simbol<sup>®</sup>

pHmetro Tecnal<sup>®</sup>

Analisador de partículas Zetasizer modelo Nano ZS90- Malvern<sup>®</sup>

Sistema de cromatografia de alta eficiência- Varian<sup>®</sup> Pro star

- ✓ Bomba PS 210 – Módulo de controle de solvente- Varian<sup>®</sup>
- ✓ Detector UV-Vis PS 210-Varian<sup>®</sup>
- ✓ Coluna Cromatografica Varian<sup>®</sup> C<sub>18</sub> fase reversa, 5 $\mu$  110A ,
- ✓ Injetor Manual
- ✓ Software Galaxie Workstation

### 3.2 Métodos

#### 3.2.1 Quantificação da ATZ por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A metodologia analítica para a quantificação da ATZ foi previamente descrita por Grillo (2011), que permitiu obter um pico simétrico com boa resolução para quantificação deste ativo. As condições cromatográficas utilizadas neste estudo estão apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1:** Condições cromatográficas para análise da ATZ por CLAE.

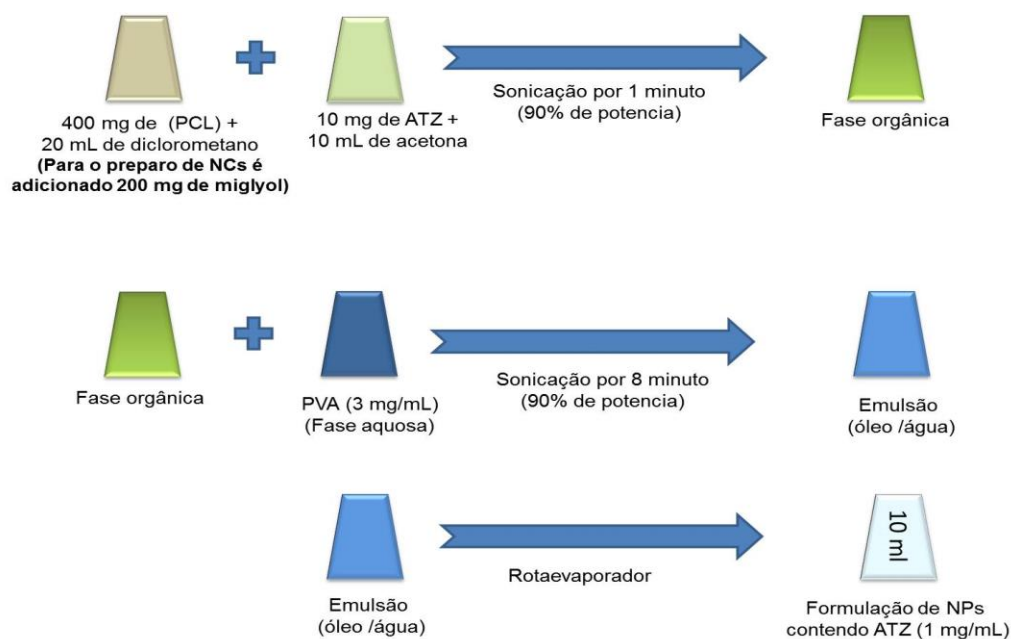
<b>Amostra</b>	<b>ATZ</b>
<b>Fase Móvel</b>	<i>Acetonitrila/água (50/50) v/v</i>
<b>Volume de injeção</b>	<i>100 µL</i>
<b>Fluxo</b>	<i>1 mL/minuto</i>
<b>Temperatura</b>	<i>25°C</i>
<b>Detector</b>	<i>Ultravioleta (UV), λ=225 nm</i>
<b>Coluna cromatográfica</b>	<i>PPhenomenex, Gemini 5 µm C<sub>18</sub> 110Angstrom, 250x 4,60 mm</i>

As condições cromatográficas descritas na Tabela 1 foram utilizadas para quantificação da ATZ a fim de determinar a eficiência de encapsulação, a avaliação do perfil de liberação, bem como da quantificação deste ativo nos ensaios com coluna de solo.

#### 3.2.2 Preparo de nanocápsulas e nanoesferas de PCL contendo ATZ

O preparo das NPs (NEs e NCs) foi realizado pelo método descrito por Zhao e colaboradores (2011). Inicialmente, foi preparada uma fase orgânica com-

posta da mistura de duas soluções, uma com 400 mg de polímero (PCL) dissolvidos em 20 mL de diclorometano e outra com 10 mg de ATZ dissolvida em 10 mL de acetona. As duas soluções foram misturadas e sonicadas por 1 minuto (com 90% de potência) para melhor solubilização das fases orgânicas. Em seguida, foi adicionada a esta fase orgânica uma solução aquosa de PVA (3 mg/mL) sendo, em seguida, sonicada por 8 minutos na mesma condição de potência para obtenção das NEs, formando assim uma emulsão óleo/água. Em seguida, esta emulsão foi colocada em rotaevaporador para remoção do solvente e redução do volume até 10 mL a fim de que a concentração final de ATZ fosse de 1 mg/mL. Após esta etapa as NPs foram armazenadas em frascos âmbar e a temperatura ambiente. Para o preparo das NCs foi realizado o mesmo procedimento, no entanto, adicionando 200 mg de Myrtilol na solução orgânica contendo o polímero (Figura 5).



**Figura 5:** Método de preparo das NPs poliméricas de PCL contendo ATZ. Inicialmente, é formada uma fase orgânica contendo polímero e ATZ, seguida de formação de emulsão óleo/água pela adição desta fase sob fase aquosa contendo PVA e posterior sonicação. Após o preparo da emulsão, foi realizada a remoção do solvente e concentração da formulação até que a ATZ ficasse a 1 mg/mL.

### **3.2.3.1 Medidas de polidispersão e de diâmetro hidrodinâmico**

A partir da técnica de espalhamento de luz dinâmico ou espectroscopia de correlação de fótons foi possível determinar o diâmetro hidrodinâmico de NPs coloidais, sendo o mesmo calculado pela equação de Stokes-Einstein (FORMARIZ *et al.*, 2007). A aplicação desta técnica permite avaliar como é a distribuição de tamanho de uma suspensão coloidal, bem como, a avaliação do índice de polidispersão das amostras a fim de verificar o quão homogêneo é o sistema. Esta técnica pode ser utilizada ainda para a avaliação da estabilidade coloidal em função do tempo, uma vez que pode se verificar a formação de possíveis agregados.

A espectroscopia de correlação de fótons foi aplicada para determinação do diâmetro hidrodinâmico das NPs de PCL contendo ou não ATZ. As suspensões coloidais foram diluídas em água deionizada (1:1000, v:v), seguida de análise no equipamento Zetasizer modelo Nano ZS 90 (Malvern), utilizando um ângulo fixo de 90° para detecção. As amostras foram analisadas a temperatura de 25°C sendo as medidas realizadas em triplicata e em função do tempo (0, 7, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias).

### **3.2.3.2 Determinação do potencial zeta das suspensões de NPs**

O potencial zeta apresenta a carga superficial de uma partícula, esta carga pode ser influenciada pelas alterações na interface dependendo do meio dispersante. Estas mudanças são geradas devido à dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou à adsorção de espécies iônicas. Um alto valor de potencial zeta representa maior estabilidade físico-química da suspensão coloidal, uma vez que grandes forças repulsivas evitam agregações ocasionadas em função das colisões das NPs (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

O potencial zeta das formulações foi determinado utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern), sendo as suspensões coloidais diluídas em água deionizada (1:1000, v:v). As análises foram realizadas em triplicata e em função do tempo (0, 7, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias).

### **3.2.3.3 Estabilidade físico-química do polímero**

Alterações nos valores de pH de suspensões coloidais de NPs poliméricas pode ser um indicativo de degradação do polímero (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Afim de, avaliar a estabilidade química do polímero, foi realizada a medida de pH das suspensões de NPs e NPs/ATZ utilizando um potenciômetro (pHmetro Tecnal<sup>®</sup>) acoplado a um eletrodo de pH previamente calibrado utilizando-se soluções tampão padrão em pH 4 e 7. As medidas foram realizadas em função do tempo (0, 7, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias).

### **3.2.3.4 Medida de eficiência de encapsulação**

Para a determinação da eficiência de encapsulação (EE) da ATZ nas NPs de PCL, inicialmente, determinou-se o total de ATZ presente na formulação. Para isso, as suspensões de NPs foram dissolvidas em acetonitrila e, posteriormente, foram filtradas em membrana Millipore<sup>®</sup> de 0,22  $\mu\text{m}$ . O filtrado foi, em seguida, analisado por CLAE de acordo com as condições cromatográficas descritas no item 3.2.1 para a quantificação dos 100% de ATZ presente nas NPs.

A medida da EE foi determinada de maneira indireta, uma vez que uma suspensão de NPs (1000  $\mu\text{L}$ ) foi submetida a centrifugação (6200 rpm) por 30 minutos utilizando um sistema de ultrafiltração constituído de celulose regenerada

com poro de exclusão molecular de 30 kDa (Microcon-Millipore®), sendo o filtrado (ATZ livre) quantificado por CLAE (item 3.2.1).

Desta forma, a partir do valor da quantidade de ATZ total e livre pode-se determinar a EE do ativo ATZ nas NPs, demonstrando que estas mantêm o ativo encapsulado em relação ao tempo. Esta metodologia tem sido utilizada na literatura para determinação da EE de compostos bioativos em NPs (GRILLO *et al.*, 2011; MELO *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2012). A EE foi medida em triplicata em função do tempo (0, 7, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias).

### **3.2.3 Avaliação da estabilidade das NPs**

A avaliação da estabilidade das NPs de PCL contendo ou não ATZ foram realizadas a partir das medidas dos parâmetros de estabilidade coloidal como o tamanho (diâmetro hidrodinâmico), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta e a estabilidade físico química das NPs através de medidas de pH das formulações em função do tempo (0, 7, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias).

### **3.2.3.5 Caracterização por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)**

As medidas de FTIR foram realizadas utilizando o equipamento Varian 660-R, sendo os espectros coletados em uma faixa de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ . Cada espectro foi obtido como uma média de 32 varreduras e com resolução de 2  $\text{cm}^{-1}$ . O preparo das amostras de NPs para análises de FTIR foi realizado a partir de 2 mL de cada formulação (NCs, NEs, NCs/ATZ e NEs/ATZ) submetidas à centrifugação para formação de *pellet* que foi seco em estufa. Após essa etapa, as amostras foram submetidas à análise por FTIR com ATR (reflexão total atenuada). Devido

às características sólida e granular do polímero PCL, não foi possível realizar a mistura física com ATZ.

### ***3.2.3.6 Ensaio de cinética de liberação***

Para a avaliação do perfil de liberação da ATZ e NPs/ATZ foram realizados ensaios de cinética de liberação. Esse se baseia em um sistema com dois compartimentos, um chamado de doador, onde foi inserida a formulação/solução contendo ATZ, separado do compartimento acceptor, por uma membrana de celulose (Spectrapore, com poro de exclusão molecular de 1200 Da).

O compartimento acceptor foi preparado em condição de diluição sink com água e mantido sob agitação leve durante todo o tempo do experimento (AULTON, 2002). As amostras foram coletadas em função do tempo, em intervalos de 15 minutos na primeira hora, de 30 minutos nas duas horas seguintes, e depois em intervalos de uma hora. As amostras coletadas foram analisadas por CLAE de acordo com as condições descritas no item 3.2.1. Os dados obtidos de concentração foram convertidos em porcentagem de liberação em função do tempo. Os ensaios de liberação foram realizados em triplicata.



### 3.2.3.7 Modelagem matemática dos ensaios de liberação

O mecanismo de liberação da ATZ foi avaliado utilizando a equação semi-empírica proposta por Korsmeyer-Peppas de acordo com a Equação 1:

(Equação 1)

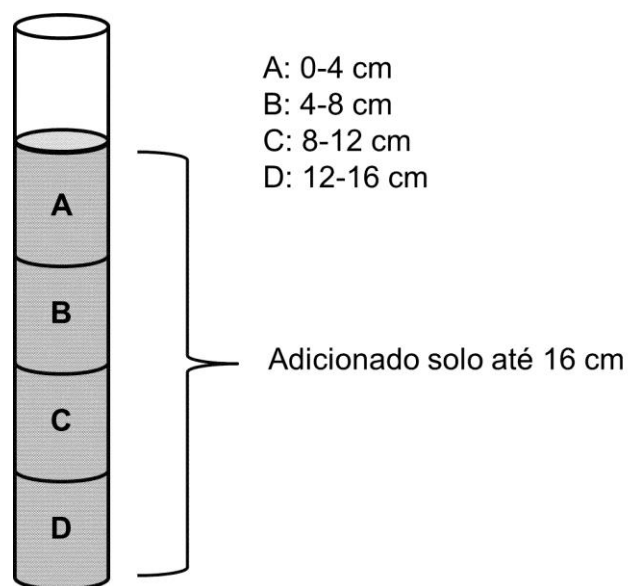
$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n$$

Onde  $M_t$  representa a quantidade total absoluta de ATZ liberada no tempo  $t$  e  $M_\infty$  corresponde a quantidade total de ATZ incorporado ao sistema polimérico no tempo  $t = 0$ ,  $k$  é a constante cinética de liberação e  $n$  o expoente de liberação. O expoente de liberação  $n$  se relaciona a forma geométrica do sistema de liberação e a partir do seu valor é possível determinar o tipo de mecanismo de liberação da ATZ das NPs. Valores de  $n$  iguais a 0,45 indicam que o ativo é liberado por um processo de difusão que segue a lei de Fick; valores de  $n$  acima de 0,89 indicam que a liberação do ativo se deve ao relaxamento da matriz polimérica e/ou liberação mediante a erosão da partícula; valores de  $n$   $0,45 < n < 0,89$  indicam que o ativo é liberado por transporte anômalo, ou seja, é a combinação dos processos de difusão e relaxamento das cadeias poliméricas/erosão da partícula (COSTA & LOBO, 2005; KORSMEYER & PEPAS; 1983).

### 3.2.4 Ensaios de interação com solo e avaliação da atividade herbicida

#### 3.2.4.1 Ensaios em coluna de solo

Para avaliação da mobilidade e distribuição da ATZ em solo foi realizado o ensaio em coluna de solo. Para isso foram utilizados tubos de PVC com 3 centímetros de diâmetro e 20 cm de comprimento, cortados em partes de 4 cm formando 5 anéis, unidos por fita adesiva para que não houvesse vazamento (Figura 6). A cada coluna foi adicionada a mesma quantidade de solo (162 mg) de forma a preencher 4 anéis (A a D), formando uma coluna de 16 cm de solo. Na extremidade terminal da coluna, foi fixado papel de filtro para manter o solo na coluna.



**Figura 6:** Representação esquemática da coluna de solo preparada para os ensaios de interação com solo e avaliação da atividade Hb. A coluna de solo foi dividida em 4 anéis denominadas por A, B, C e D, sendo a superfície do anel A o local de aplicação do Hb.

O solo utilizado para o preparo das colunas de solo é originário de uma remanescente florestal, longe de área rural (coordenadas cartesianas: - 23,432628 (latitude), -47,369862 (longitude) e 601 metros de altitude). O solo foi previamente caracterizado pelo grupo de pesquisa do laboratório de química ambiental da UNESP/ Sorocaba sendo do tipo argissolo vermelho, constituído aproximadamente por 3,8 % de silte, 11,29 % de argila e 84,8 % de areia, possuindo 3 % de matéria orgânica, com pH em torno de 5,4. O solo para preparo da coluna foi peneirado em malha de 2 mm e armazenado ao ar livre.

Após a construção das colunas, foi aplicada sobre a superfície do solo de cada coluna: formulação comercial de ATZ da marca GESAPRIM 500 CG (SYNGENTA), ativo ATZ, NCs/ATZ, e NEs/ATZ na concentração recomendada por fabricantes de formulações comerciais de 2,5 kg/ha. Foram preparadas também colunas como controle, onde nestas foram aplicadas apenas água.

Após a aplicação da formulação no topo da coluna foram simuladas condições de irrigação, adicionando água destilada, equivalente a 70 mm de irrigação (50 mL), dividida em duas partes de 25 mL, sendo os primeiros 25 mL aplicados com 24 horas e os outros 25 mL com 48 horas. A irrigação visou avaliar a distribuição da ATZ (encapsulado ou não) através da coluna. Após a aplicação dos 50 mL de água e passado um período de 24 horas da última irrigação os quatro anéis da coluna de solo foram separadas para posterior quantificação da ATZ em cada fração e também para a avaliação da atividade Hb ao longo do perfil da coluna de solo. Estes ensaios foram realizados em quintuplicata.

### 3.2.4.2 Umidade do Solo

Após o fracionamento da coluna de solo em partes de 4 cm (item 3.2.4.1), foram coletadas 2 gramas de solo de cada anel para análise da porcentagem de umidade do solo ( $h$ ), conforme Equação 2.

(equação 2)

$$h = \frac{P - P_s}{P_s} \times 100$$

Onde  $P$  representa a massa do solo úmido,  $P_s$  a massa de solo seca em estufa após um período de 24h mantidas a 100 °C

### 3.2.4.3 Análise de concentração de ATZ ao longo do perfil do solo

Após a separação das colunas em partes de 4 cm (item 3.2.4.1), foram coletadas 5 g de solo de cada anel. Neste solo foi realizada a extração da ATZ com metanol para quantificação do ativo nos diferentes anéis da coluna de solo. Para a extração da ATZ do solo foi utilizada uma adaptação do método descrito por Vasconcelos e colaboradores (2008). Nesse, 5 g de solo foram colocados em um erlenmeyer de 25 mL, sendo adicionado a este 5 mL de metanol que foi mantido sob agitação orbital em incubadora por 20 minutos a 25 °C. Após o período de agitação, a suspensão foi mantida em repouso por 30 minutos, sendo o sobrenadante retirado. Este procedimento foi realizada por mais duas vezes, a fim de garantir que toda ATZ fosse removida do solo. Após esta etapa, as frações foram unidas e evaporadas até um volume final de 5 mL, sendo a quantidade de ATZ determinada por CLAE, conforme condições descritas no item 3.2.1.

Para a avaliação dos resultados obtidos após a quantificação da ATZ em cada ponto da coluna de solo entre os diferentes tratamentos, foi utilizado a análise estatística por análise de variância (ANOVA) com teste posterior de Tukey-Kramer, com significância estatística de  $p < 0,05$ , utilizando para isso o software Graph Pad InStat 3.

#### **3.2.4.4 Avaliação da atividade herbicida ao longo do perfil da coluna de solo**

A fim de avaliar o perfil de migração da ATZ ao longo da coluna de solo, foi realizado o cultivo da mostarda lisa da Flórida (*Brassica sp*) (planta alvo do Hb ATZ) em cada um dos anéis da coluna de solo, separados conforme descrito no item 3.2.4.1.

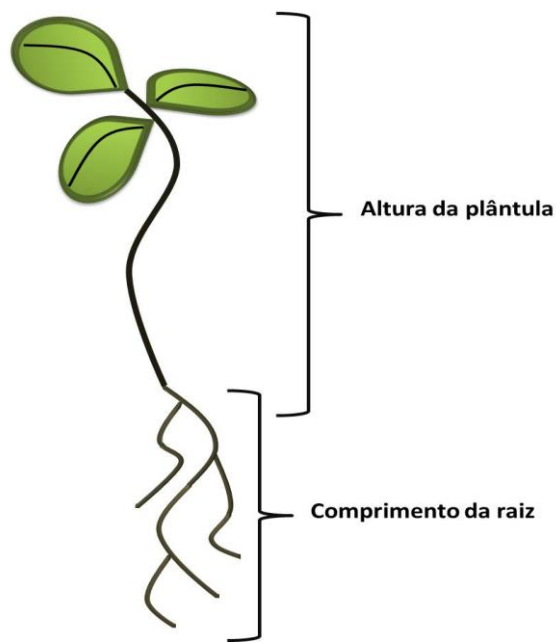
Para este estudo, em cada anel foram plantadas 10 sementes, sendo estas cultivadas por duas semanas em uma casa de vegetação. Após este período foi determinado o índice de germinação em porcentagem (**IG**) calculado conforme Equação 3.

(Equação 3)

$$IG = \frac{SG}{TSS} \times 100$$

Onde, **SG** o número total de sementes germinadas e **TSS** o número total de sementes semeadas inicialmente.

Além do índice de germinação foram também avaliados outros parâmetros como: a média da altura das plântulas e o tamanho da raiz (Figura 5), bem como, a determinação da massa média de matéria seca e verde das plântulas.



**Figura 7:** Representação esquemática de uma plântula de mostarda. Nesta figura podem-se observar as diferentes regiões (raiz, altura e número de folhas) que foram analisadas após o cultivo da mostarda nos diferentes anéis das colunas de solo.

Para a avaliação dos resultados dos diferentes tratamentos sobre os parâmetros descritos acima em cada anel da coluna de solo foi realizada análise de variância (ANOVA) com teste posterior de Tukey-Kramer, com significância estatística de  $p < 0,05$ , utilizando para isso o software Graph Pad InStat 3.

### **3.2.5 Ensaio de aberração cromossômica em *Allium cepa***

Para avaliar o possível efeito genotóxico das formulações produzidas utilizamos o teste de *Allium cepa* que é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS), e pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP), como um teste eficaz para a avaliação e monitoramento de substâncias químicas em sistemas ambientais (Rodrigues *et al.*, 1999).

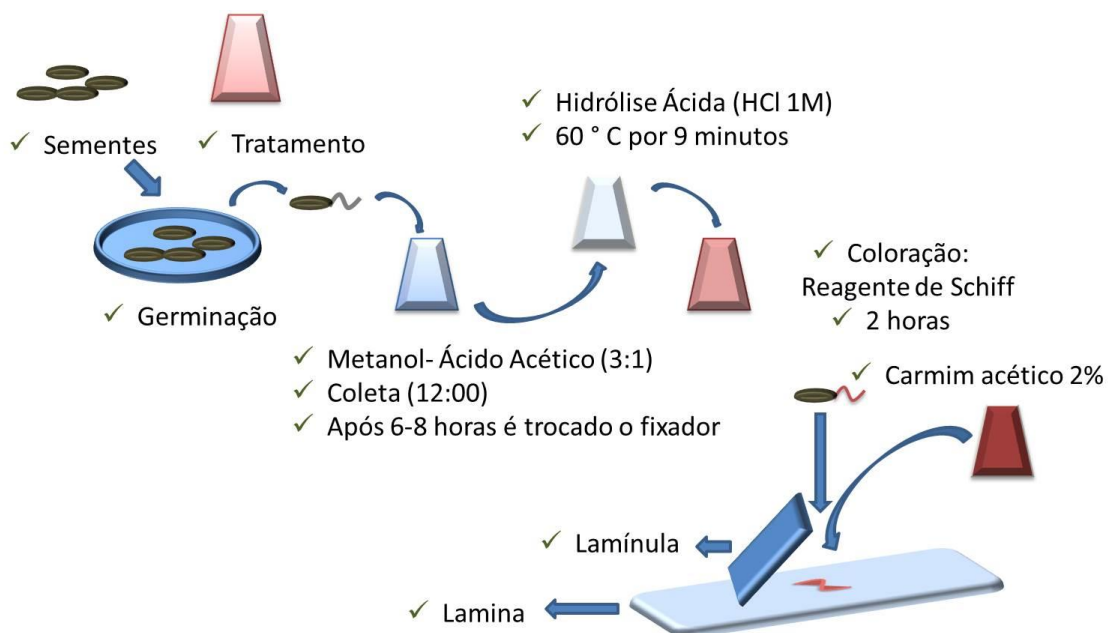
O objetivo desse experimento foi avaliar a genotoxicidade do ativo ATZ, da formulação comercial, das formulações de NPs/ATZ e NPs de PCL. Foram testadas cinco diferentes concentrações (0,7, 2,1, 6,3, 18 e 54 µg/mL) sendo estas concentrações determinadas a partir do valor de LC<sub>50</sub> do ativo ATZ (MAPA, 2012), sendo diluída e concentrada duas vezes o valor da LC<sub>50</sub>, as mesmas concentrações testadas foram usadas para a avaliação das NPs sem ATZ.

Neste ensaio, as raízes de *Allium cepa* cresceram em meio à exposição da substância teste em temperatura ambiente. Quando as raízes atingiram aproximadamente 2 cm de comprimento, foram coletadas para os procedimentos de preparo das lâminas. As raízes foram fixadas entre 12:00 e 14:00 horas e transferidas para frascos identificados (para cada concentração de amostra) com o fixador Carnoy I.

Para o preparo das lâminas, retirou-se uma quantidade de raízes dos frascos com o auxílio de uma pinça, sendo estas lavadas com água destilada por três vezes, com um período de 5 minutos entre cada lavagem. Após esta etapa, foi retirado o excesso de água das raízes e realizada a hidrólise das mesmas através da exposição das raízes em frascos contendo HCl 1 mol/L mantidos à 60 °C por nove minutos. Após a etapa de hidrólise, as raízes foram novamente submetidas a três lavagens com água destilada para remoção do excesso de ácido das raízes. As raízes foram então coradas com o reagente de Schiff e mantidas por duas horas em local escuro.

Passadas essas etapas, sobre uma lâmina limpa e identificada, colocou-se uma raiz com seu meristema intacto (porção terminal corada de roxo, destacando-se do resto da raiz corada de rosa), recortando a parte corada em roxo e eliminando o restante da raiz corada em rosa, aplicou-se uma gota de carmim acético 2% sobre o meristema e cobriu se com uma lamínula, pressionando-a cuidadosamente sobre o material até que o meristema se transforme em uma pequena mancha de células espalhadas (esmagamento).

Após esta etapa, a lâmina, foi flambada em chama com auxílio de uma lamparina e retirou-se o excesso de carmim acético da lâmina pressionando de forma suave a lâmina e a lamínula envolvidas por um papel filtro. A Figura 8 representa as principais etapas realizadas no ensaio de genotoxicidade.



**Figura 8:** Representação esquemática das principais etapas para a confecção de lâminas do ensaio de genotoxicidade em *Allium cepa*.



### 3.2.5.1 Análises das lâminas obtidas no ensaio *Allium cepa*

A partir das análises das lâminas foi possível calcular o índice mitótico (IM), conforme Equação 4. Este índice é calculado a partir do número total de células em divisão (prófase, metáfase, anáfase, telófase) dividido pelo número total de células na fase intérfase.

(Equação 4)

$$IM = \frac{TDC}{TCI}$$

Onde **TDC** é o total de divisões celulares e o **TCI** o total de células em intérfase.

A partir do cálculo do IM é possível ainda determinar o Índice Mitótico Relativo (**IMR**) sendo este calculado baseado no valor da média do **IM** de cada tratamento pelo valor do **IM** do controle (água) (Equação 5).

(Equação 5)

$$IMR = \frac{IMT}{IMN}$$

Onde o **IMT** é o valor da média de cada tratamento e o **IMN** é a média do **IM** do controle. A avaliação dos dados foi baseada na comparação do controle com o produto comercial e o ativo ATZ (encapsulado ou não).

Além do índice mitótico, pode-se determinar também o índice de aberrações cromossômicas causados por cada tratamento sobre as células de *Allium Cepa*. O índice de aberração cromossômica é determinado a partir do número de alterações cromossômicas (pontes, quebras, perdas cromossômicas, c-metáfase entre outras) dividido pelo número total de divisões (Equação 6).

(Equação 6)

$$IAC = \frac{TAC}{TDC} \times 100$$

Onde **TAC** representa o total de divisões com alterações cromossômicas e **TDC** o total de divisões cromossômicas.

Para a avaliação dos resultados em relação ao **IMR** e o **IAC** para cada um dos tratamentos foi realizada análise de variância (**ANOVA**) com teste posterior de Tukey-Kramer, com significância estatística de  $p < 0,05$ , utilizando o software Graph Pad InStat 3.



## 4. Resultado e Discussão

### 4.1 Caracterização das NPs de PCL

Para a caracterização de NPs são avaliados parâmetros os quais permitem determinar a estabilidade como o diâmetro hidrodinâmico, ao índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (PZ), em relação ao pH das suspensões coloidais e a eficiência de encapsulação (EE) (SCHAFFAZICK *et al.*; 2003) Neste trabalho, foram preparadas NCs e NEs de PCL contendo ou não ATZ (NCs/ATZ e NEs/ATZ), os dados obtidos desta caracterização estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2:** Resultados da caracterização físico-química das NPs de PCL, contendo ou não ATZ. Dados de diâmetro (nm), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (PZ em mV), pH e eficiência de encapsulação da ATZ (EE) em %. Os valores apresentados indicam a média de três determinações.

	<u>Diâmetro (nm)</u>	<u>PDI</u>	<u>PZ (mV)</u>	<u>pH</u>	<u>EE (%)</u>
NC	513,2 ± 7,5	0,21 ± 0,02	-25,6 ± 0,64	5,5	
NC/ATZ	483,1 ± 10,4	0,16 ± 0,02	-25,2 ± 0,32	6,3	93,4 ± 1,2
NE	365,1 ± 0,16	0,16 ± 0,01	-23,9 ± 0,26	6,0	
NE/ATZ	408,5 ± 2,5	0,17 ± 0,02	-25,6 ± 0,14	6,6	92,7 ± 1,2

A análise dos resultados apresentados na Tabela 2 mostra que o diâmetro das NCs (513 ± 7,5 nm) é significante maior ( $p < 0,001$ ) que das NEs (365 ± 0,16). Este resultado pode ser devido à incorporação do óleo no interior das NCs de

PCL, fazendo com que ocorra um aumento de massa destas partículas e, consequentemente, aumento do tamanho (RAO & GECKELER, 2011, SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Os valores de diâmetro determinados para as NPs preparadas nesse estudo foram compatíveis com valores descritos em trabalhos na literatura (JAIN, 2010; BEHERA *et al.*, 2012). Quando a ATZ foi encapsulada, as NCs/ATZ ( $483,1 \pm 10,4$  nm) apresentaram uma redução nos valores de diâmetro hidrodinâmico em relação às NCs sem ATZ ( $p < 0,001$ ). Já para as NEs/ATZ ( $408,5 \pm 2,5$  nm) houve aumento nos valores de diâmetro hidrodinâmico ( $p < 0,01$ ). As diferenças observadas nos tamanhos podem ser devido à rearranjos nas cadeias poliméricas, bem como alterações de interações entre os demais componentes utilizados no preparo das NPs quando na presença de ATZ.

Silva e colaboradores (2010) prepararam NPs de alginato/quitosana e alginato/AOT encapsuladas ou não com o Hb clomazone e observaram variações de aumento (NPs de alginato/quitosana) e diminuição (NPs de alginato/AOT) de tamanhos devido à presença do Hb como componente da formulação. Destaca-se que pequenas alterações metodológicas no preparo das NPs fazem com que os parâmetros que determinam suas características coloidais sejam alteradas, como exemplo, mudanças de tamanho e morfológicas (RAO & GECKELER, 2011). O mesmo efeito foi observado para as NCs e NEs para o ativo ATZ em que foi avaliado que houve aumento e redução das NPs.

Byun e colaboradores (2011), pela técnica de dupla emulsão, observaram alteração no diâmetro devido ao tipo de solvente utilizado para o preparo de NEs de PCL, sendo que uma mistura de cloreto de metileno: acetonitrila produziram NPs menores que quando preparadas apenas com cloreto de metileno.

Foram observados que as partículas preparadas neste estudo apresentaram-se monodispersas e com valores de PDI próximos ou abaixo de 0,2 (Tabela

2), valor este que indica homogeneidade na distribuição de tamanho (SCHAFFA-ZICK *et al.*, 2003).

A partir da análise dos dados da Tabela 2, pode-se ainda observar que os valores de potencial zeta das NPs ficaram entre -23 mV e -26 mV, não havendo diferenças significativas entre NCs e NEs, bem como pela presença ou ausência de ATZ nas formulações. Os valores de potencial zeta observados refletem a carga das partículas, no entanto, em relação a estabilidade destas em solução, o principal fator neste caso não é o valor de potencial zeta e sim o fato da presença do tensoativo PVA nas formulações, uma vez que este causa um efeito de estabilidade estérico (MORANRAJ *et al.*, 2006).

As suspensões coloidais preparadas contendo NPs sem ATZ apresentaram valores de pH levemente ácidos, sendo 5,5 e 6,0 para NCs e NEs respectivamente. Já quanto o ativo ATZ foi encapsulado, os valores de pH das formulações aumentaram para 6,3 e 6,6 para as NCs/ATZ e NEs/ATZ, respectivamente. Este aumento nos valores de pH é devido ao fato do ativo ATZ possuir um caráter básico, gerando aumento do pH da suspensão coloidal em relação ao sistema sem ATZ (JAVARONI *et al.*, 1999).

Khoei & Yaghoobian (2009) verificaram que o tipo do tensoativo e a quantidade utilizada afetam o diâmetro hidrodinâmico das NPs e a EE. A EE das NPs preparadas nesse trabalho foi acima de 90%, mostrando que o método de preparo das NPs foi eficaz uma vez que apresentou uma boa encapsulação da ATZ. Este fato deve-se a possibilidade de formação de interações intermoleculares entre a ATZ e os componentes utilizados para o preparo das NPs, como por exemplo, o polímero PCL e os ácidos graxos presentes no óleo Mygliol.

Souza e colaboradores (2012), utilizando o método de nanoprecipitação para preparo de NCs de PCL contendo o ativo ATZ, observaram que um aumento da quantidade de fase oleosa causa um aumento na EE da ATZ, bem como um aumento no diâmetro hidrodinâmico. Estes autores descreveram que este aumento

de EE foi devido a uma maior incorporação de óleo no núcleo das NCs, fazendo com que uma maior quantidade de ATZ pudesse ser encapsulada, fato este devido a ATZ ser hidrofóbica. No presente estudo houve uma alta EE para ambas NPs, independente do uso de óleo, indicando que o método para o preparo pode ter aumentado a EE porém as NCs reduziram o diâmetro.

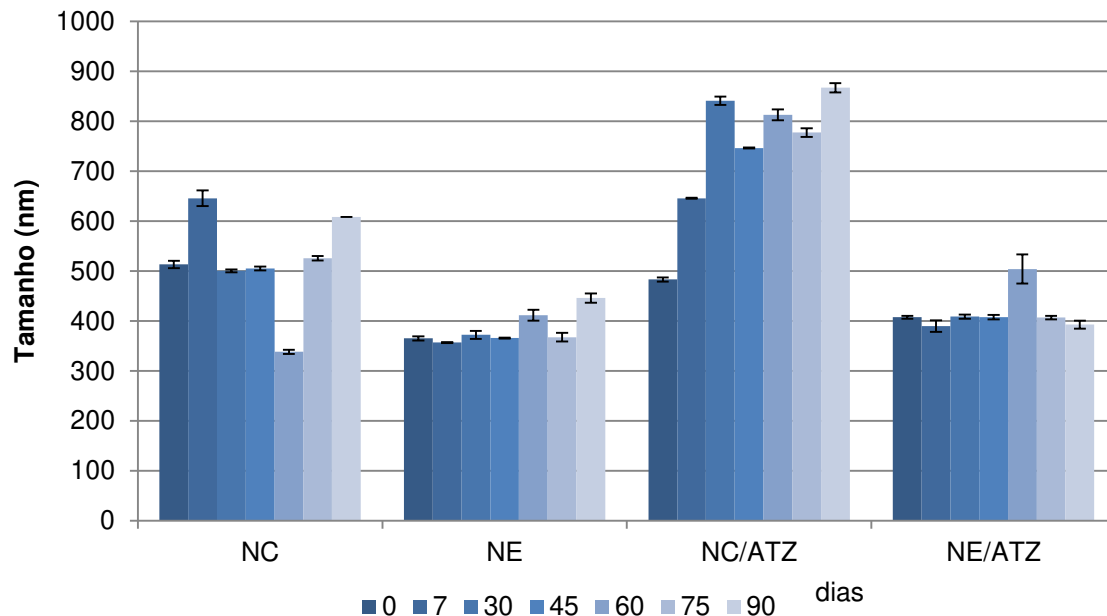
Estudos nesta área indicam que metodologias para preparo de NPs por sonicação são mais eficientes para associação de ativos (JAIN, 2000). ZHOU e colaboradores (2010) observaram para os anestésicos ropivacaína e bupivacaína, utilizando o mesmo tipo de metodologia de preparo deste estudo, valores de EE em torno de 60-70% para NPs preparadas com o polímero PLGA. A técnica quando empregada neste estudo para o polímero PCL e o ativo ATZ, apresentou uma alta EE, demonstrando ser uma técnica eficaz para a encapsulação da ATZ.

Grillo e colaboradores (2012), utilizando o método de nanoprecipitação, obtiveram valores de EE da ATZ em NCs de PCL ao redor de 87 %. Já Cea e colaboradores (2010) mediram valores de EE para ATZ em NPs de etilcelulose ao redor de 35%, fato este justificável pelas características hidrofílicas da etilcelulose e hidrofóbica da ATZ. Isto reforça o ponto que o polímero PCL para o ativo ATZ, é ideal para o preparo de NPs por aumentar a EE.

#### **4.2 Medidas de estabilidade das formulações.**

A investigação de parâmetros como diâmetro hidrodinâmico, PDI permitem avaliar a estabilidade coloidal das NPs, uma vez que é possível verificar processos de agregação das partículas em função do tempo. Da mesma forma a investigação da EE e pH em função do tempo podem dar informações sobre a interação do ativo com as NPs e possíveis processos de degradação do polímero (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). A Figura 9 apresenta as medidas de distribuição de tamanho das NPs num período de 90 dias.

## Distribuição de diâmetro hidrodinâmico

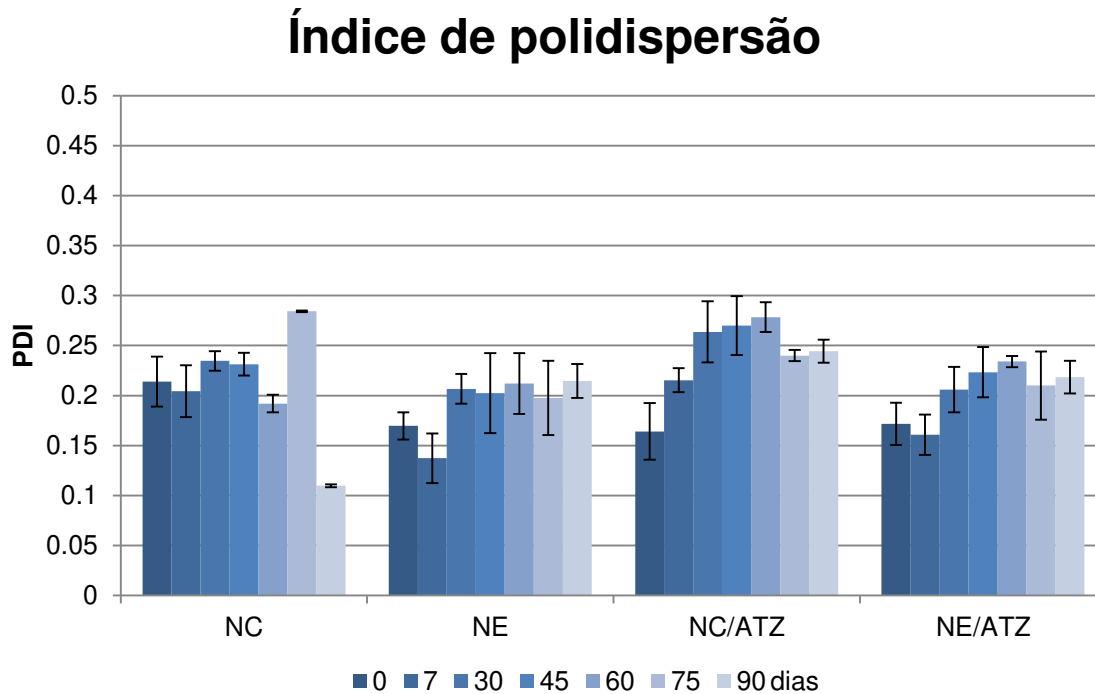


**Figura 9:** Distribuição de diâmetro hidrodinâmico das NPs de PCL com ou sem ATZ em função do tempo (0, 7, 30, 45, 60, 75 e 90 dias). Os valores representam a média de três análises (n=3), sendo as amostras medidas à 25 °C.

A análise dos dados de estabilidade de tamanho das NPs mostra que para as NEs (com ou sem ATZ) a distribuição média de tamanho não sofreu alterações significativas em função do tempo, mostrando assim que as proporções dos componentes destas NPs produziram um sistema coloidal bastante estável. Já para as NCs, observam-se alterações na média da distribuição de tamanho destas (com ou sem ATZ), no entanto, as alterações iniciais foram mais pronunciadas para as formulações contendo ATZ, onde pode-se observar que o tamanho das NCs tiveram um aumento de quase duas vezes. Este fato indica que as NCs contendo ATZ apresentaram algum tipo de agregação durante o período de de 90 dias, indicando assim que este sistema não se apresenta tão estável quanto as formulações de NEs com ATZ.



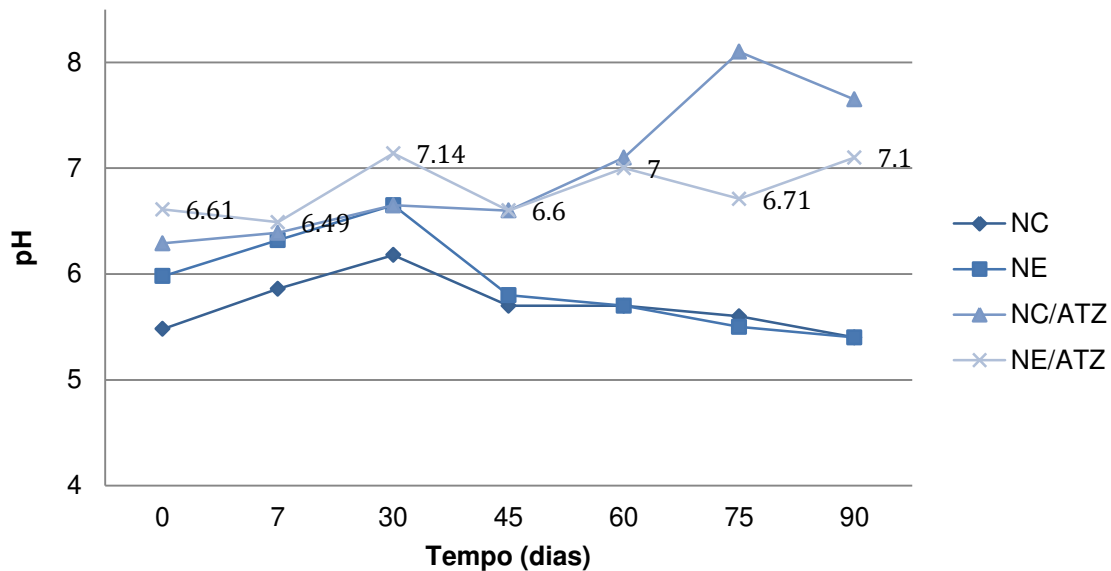
Assim como o valor médio de distribuição de tamanho, foi acompanhado a investigação do índice de polidispersividade das suspensões coloidais em função do tempo, sendo os valores medidos apresentados na Figura 10.



**Figura 10:** PDI das NPs de PCL com ou ATZ em função do tempo (0, 7, 30, 45, 60, 75 e 90 dias). Os valores são referentes à média de três análises ( $n=3$ ), sendo as amostras medidas à 25°C.

Os valores de PDI para todas as NPs ficaram entre 0,2 e 0,3 em função do período de 90 dias. Destaca-se que no caso das NEs os valores ficaram próximos a 0,2 e para as NCs mais próximos a 0,3, fato este que corrobora com os dados de distribuição de tamanho das partículas não seja tão homogênea como no caso das NEs (SCHAFFAZICK *et al.* 2003).

Por fim foi aferida valores de pH das suspensões coloidais em função do tempo (Figura 11).



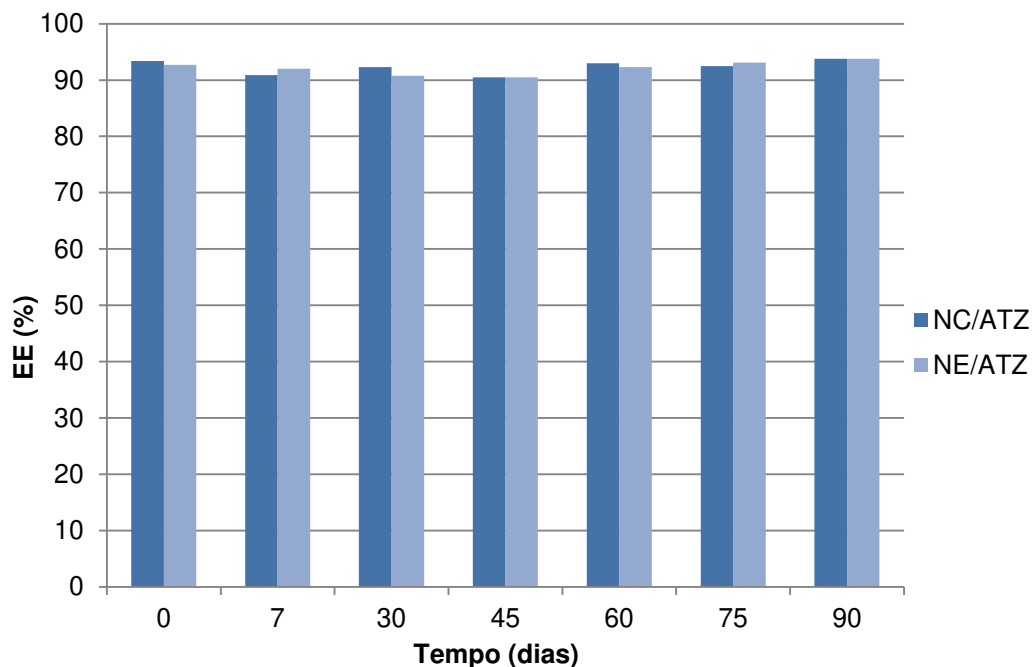
**Figura 11:** Valores de pH medidos nas suspensões coloidais contendo NPs de PCL com ou sem ATZ em função do tempo (0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias). Os valores são referentes à média de três análises (n=3), sendo as amostras medidas à 25°C.

Observa-se que as NCs e NEs sem ATZ apresentam um perfil similar de valores de pH em função do tempo, diminuindo em relação ao valor inicial, indicando assim que as cadeias poliméricas podem estar sendo hidrolisadas, ocasionando a redução do pH da solução (SHAFFAZICK *et al.*, 2003). Estudos mostram que NPs de PCL após 3-5 meses começam apresentar diminuição do pH, devido a hidrólise das cadeias poliméricas que promove um aumento da exposição de grupos ácidos carboxílicos (LEMOINE *et al.*, 1996; GUTERRES *et al.*, 1995).

No caso das NPs/ATZ, os valores de pH tiveram um comportamento oposto, onde o valor de pH aumentou em função do tempo, fato este que pode estar relacionado a exposição da ATZ na superfície das NPs produzindo um aumento no pH devido a exposição dos grupamentos amino destas moléculas. No entanto,

mais estudos, dentre eles morfológicos, necessitam ser realizados para confirmação desta hipótese.

Outro parâmetro investigado foi a EE da ATZ nas NPs ao longo do tempo, uma vez que este pode indicar se possíveis alterações na estabilidade coloidal das formulações ou processos de degradação do polímero irão afetar a EE do ativo nos sistemas carreadores. A EE das NPs/ATZ foi avaliada em função do tempo, sendo os valores determinados apresentados na Figura 12.



**Figura 12:** Valores de EE para o ativo ATZ nas NPs de PCL em função do tempo (0, 7, 30, 45, 60, 75 e 90 dias). Os valores são referentes a média de três análises (n=3), sendo as amostras medidas à 25°C.

A análise dos dados mostra que não houveram alterações significativas nos valores de EE da ATZ em função do tempo, permanecendo entre 90 e 94%. Estes resultados indicam que a ATZ continua encapsulada nas NPs e que as alterações físico-químicas (diâmetro, PDI e pH) não foram suficientes para alterar a EE, mesmo que processos de hidrólise estejam ocorrendo. Destaca-se, no entan-

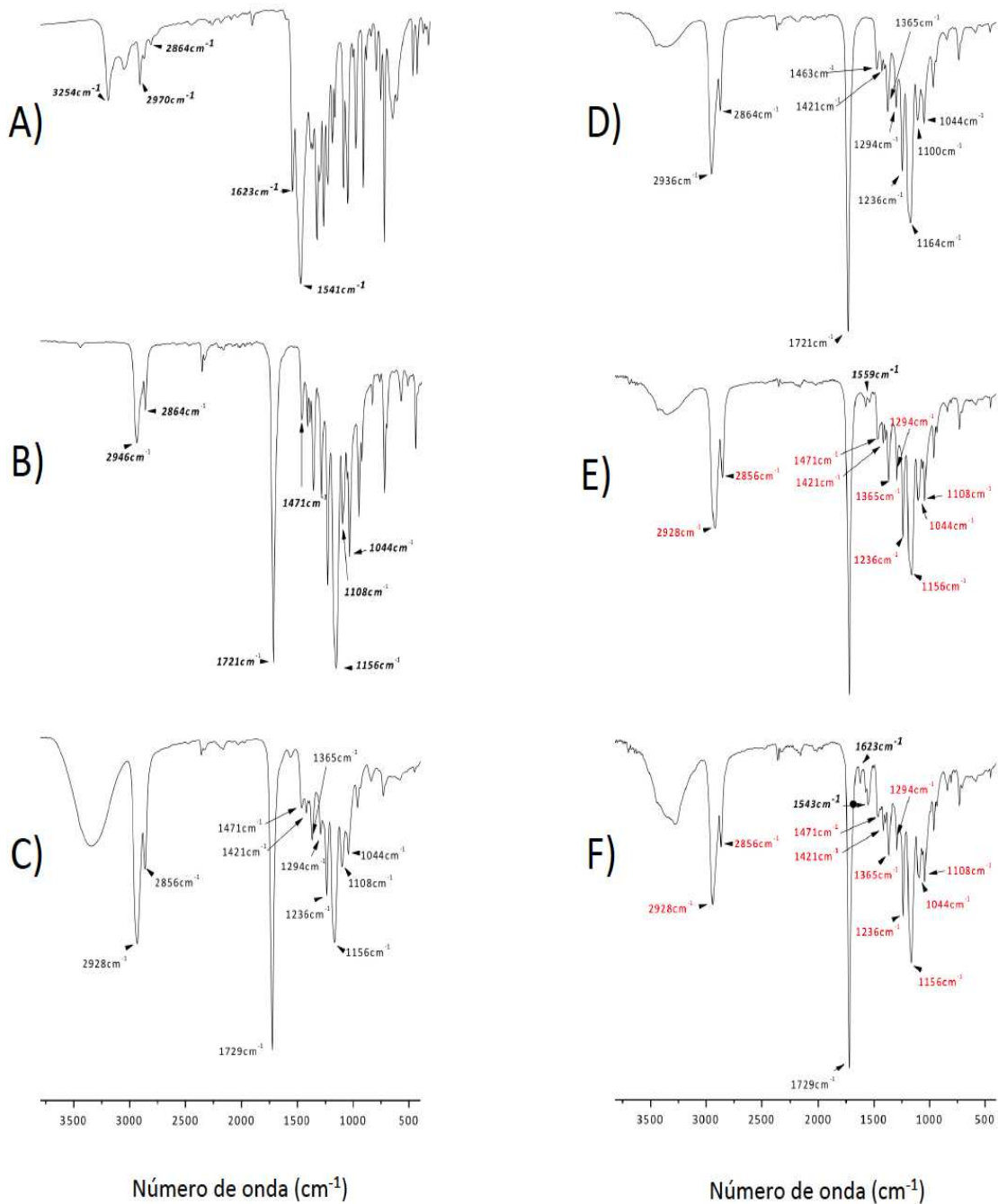
to, que estudos morfológicos são necessários a fim de um melhor entendimento destes processos.

No caso das NCs contendo ATZ, observa-se que mesmo havendo processos de agregação a EE não foi alterada em função do tempo, indicando que provavelmente este ativo encontra-se no núcleo oleoso das NCs e que com a agregação das partículas esse foi mantido, não liberando desta forma a ATZ.

Uma análise geral dos ensaios de estabilidade indica que as NEs contendo ATZ apresentaram resultados de estabilidade melhores que os das NCs, uma vez que os valores de distribuição médio de tamanho e PDI não sofreram alterações em função do período de 90 dias. Em relação aos demais parâmetros avaliados (pH e EE), o comportamento para os dois sistemas (NEs e NCs) foi praticamente o mesmo.

#### **4.3 Estudo da interação entre ATZ e NPs de PCL por espectroscopia de infravermelho**

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica espectroscópica utilizada para identificação e caracterização de compostos orgânicos, inorgânicos e poliméricos (Gonçalves *et al.*, 2002). Para avaliar a existência de possíveis interações intermoleculares entre a ATZ e as NPs foi utilizada a análise por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier da ATZ, polímero PCL, NPs com e sem ATZ. Os espectros de FTIR são apresentados na Figura 13.



**Figura 13:** Análise por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier para A) ATZ; B) polímero PCL; C) NCs; D) NEs; E) NCs/ATZ; F) NEs/ATZ. Para as Figuras E e F, os números em vermelho representam as bandas do polímero PCL e os números em preto, as bandas para a ATZ. Os espectros foram coletados de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , e representam a média de 32 varreduras, cada com resolução espectral de 2  $\text{cm}^{-1}$ .

Para o espectro da ATZ (Figura 13A), a banda de absorção  $3254\text{ cm}^{-1}$  indica estiramento N-H de amina secundária presentes no anel da ATZ. Já em  $2970$  e  $2864\text{ cm}^{-1}$ , observa-se estiramentos de grupamentos C-H alifáticos, bem como, em  $1623$  e  $1541\text{ cm}^{-1}$  observam-se bandas de deformação da ligação C=C e C=N respectivamente (AVILA *et al.*, 2009).

A análise do espectro do polímero PCL (Figura 13B) apresentam as bandas descritas na literatura para o polímero (ELZEIN *et al.*, 2004), onde em  $2946\text{ cm}^{-1}$  observa-se banda de estiramento assimétrico  $\text{CH}_2$ ; em  $2864\text{ cm}^{-1}$  banda de estiramento simétrico  $\text{CH}_2$ ; em  $1721\text{ cm}^{-1}$  banda referente ao grupamento carbonila (C=O) e em  $1471\text{ cm}^{-1}$  alongamento da fase cristalina. Já em  $1236\text{ cm}^{-1}$ , observa-se alongamento assimétrico C-O-C, em  $1156\text{ cm}^{-1}$  estiramento O-C=O, em  $1108\text{ cm}^{-1}$  estiramento simétrico C-O-C e  $1044\text{ cm}^{-1}$  C=O estiramento em fase amorfa.

No caso dos espectros de NCs e NEs de PCL (Figura 13 C e D), pode-se observar a presença das bandas características do polímero PCL. Os espectros apresentados na Figura 13E e 13F mostram os espectros das NCs e NEs contendo ATZ, respectivamente. As análises das NPs/ATZ mostram que todas as bandas referentes ao polímero PCL foram identificadas, porém o caso das NCs foi identificada uma banda em  $1559\text{ cm}^{-1}$  referente à ligação C=N da ATZ (Figura 13 E). Nas NEs, apareceram duas bandas referentes à ATZ, uma em  $1623\text{ cm}^{-1}$  referente à deformação na ligação C=C e outra em  $1542\text{ cm}^{-1}$ , referente à deformação na ligação C=N.

A análise por FTIR demonstrou que o polímero PCL e o ativo ATZ apresentaram frequências das bandas de absorção características destes compostos e após o preparo das NPs as bandas do polímero foram detectadas, porém a técnica não permitiu verificar possíveis interações ou surgimento de novos grupos, devido que bandas da ATZ ficaram superpostas com bandas do polímero PCL, comprometendo uma melhor análise dos dados.

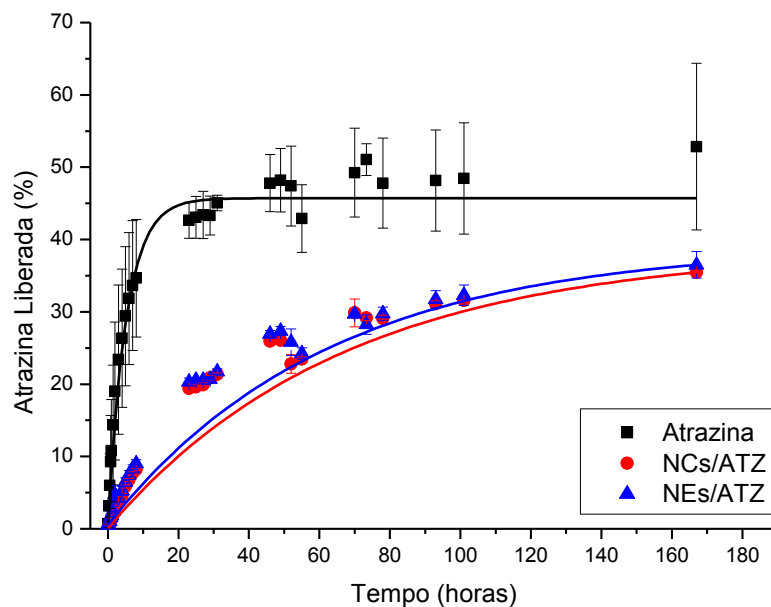
A Tabela 3 apresenta um resumo das principais bandas encontradas e os tipos de ligações para o ativo ATZ, polímero PCL as NCs/ATZ e NEs/ATZ.

**Tabela 3:** Ligações e faixas de absorção dos compostos ATZ, PCL, NCs, NEs, NCs/ATZ, NEs/ATZ encontradas por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier. Espectros coletados em uma faixa de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , foram coletadas 32 varreduras com resolução de 2  $\text{cm}^{-1}$ .

	Tipo específico de ligação	Faixa de absorção
ATRAZINA	Estiramento N-H de amina secundária	3254 $\text{cm}^{-1}$
	Estiramento de grupamentos C-H alifáticos	2970 e 2864 $\text{cm}^{-1}$
	Deformação da ligação C=C	1623 $\text{cm}^{-1}$
	Deformação da ligação C=N	1541 $\text{cm}^{-1}$
PCL, NCs e NEs	Estiramento assimétrico $\text{CH}_2$	2946 $\text{cm}^{-1}$
	Estiramento simétrico $\text{CH}_2$	2864 $\text{cm}^{-1}$
	Grupamento carbonila C=O	1721 $\text{cm}^{-1}$
	Alongamento da fase cristalina C=O e C=C	1471 $\text{cm}^{-1}$
	Alongamento assimétrico C-O-C	1236 $\text{cm}^{-1}$
NCs/ATZ	Estiramento assimétrico $\text{CH}_2$	2946 $\text{cm}^{-1}$
	Estiramento simétrico $\text{CH}_2$	2864 $\text{cm}^{-1}$
	Grupamento carbonila C=O	1721 $\text{cm}^{-1}$
	Deformação da ligação C=N	1541 $\text{cm}^{-1}$
	Alongamento da fase cristalina C=O e C=C	1471 $\text{cm}^{-1}$
NEs/ATZ	Alongamento assimétrico C-O-C	1236 $\text{cm}^{-1}$
	Estiramento assimétrico $\text{CH}_2$	2946 $\text{cm}^{-1}$
	Estiramento simétrico $\text{CH}_2$	2864 $\text{cm}^{-1}$
	Grupamento carbonila C=O	1721 $\text{cm}^{-1}$
	Deformação da ligação C=C	1623 $\text{cm}^{-1}$
	Deformação da ligação C=N	1541 $\text{cm}^{-1}$
	Alongamento da fase cristalina C=O e C=C	1471 $\text{cm}^{-1}$
	Alongamento assimétrico C-O-C	1236 $\text{cm}^{-1}$

#### 4.4 Ensaio de cinética de liberação da ATZ.

A fim de avaliar como a encapsulação da ATZ nas NPs de PCL altera o perfil de liberação deste, foi realizado o ensaio de cinética de liberação. O ensaio foi realizado durante um período de sete dias, sendo as curvas obtidas para a ATZ e NPs contendo ATZ apresentadas na Figura 14.



**Figura 14:** Ensaio de cinética de liberação do herbicida ATZ. As curvas mostram o perfil da cinética de liberação da ATZ, NCs/ATZ e NEs/ATZ. Os dados representam a média de três experimentos realizados à 25 °C.

A análise das curvas de liberação da Figura 14 mostra que as NPs/ATZ reduzem a velocidade de liberação da ATZ quando comparada com o ativo ATZ apenas. Durante um período de 24 horas, a ATZ apresentou aproximadamente 40% do seu total liberado, enquanto quando encapsulada em NEs e NCs este valor ficou em torno de 20% do total. No período de 120 horas, a quantidade de ATZ



liberada das NPs foi de 32% do total, demonstrando que a liberação do ativo foi mais lenta.

Estudos de NPs poliméricas para sistemas de liberação sustentada são viadas para diferentes classes de DA, o que reforça que estes produtos possuem grande potencial para futuras aplicações na agricultura (CHEN & YADA, 2011; KHOT *et al.*, 2012; NAIR *et al.*, 2010).

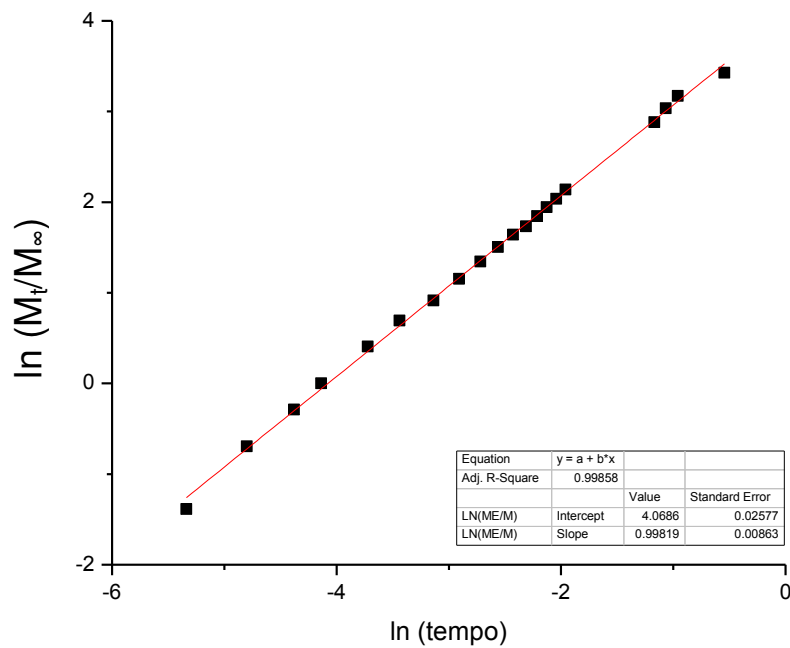
O uso de sistemas com liberação sustentada pode prolongar o tempo de ação dos DA, reduzindo o número de aplicações, tornando mais viáveis para aplicação em lavouras (SARKAR *et al.*, 2012). Outra vantagem encontrada nesses sistemas é a maior ação do ativo em organismos alvos e redução dos efeitos tóxicos que esses produtos podem gerar em outras espécies (LI *et al.*, 2012). Sistemas de liberação sustentada baseados em NPs reduzem a concentração da dose para ação efetiva do ativo, além disso, podem reduzir efeitos tóxicos a agricultores, tornando esses produtos mais seguros para utilização (NAIR *et al.*, 2010).

#### *4.4.1 Modelagem matemática dos perfis de liberação*

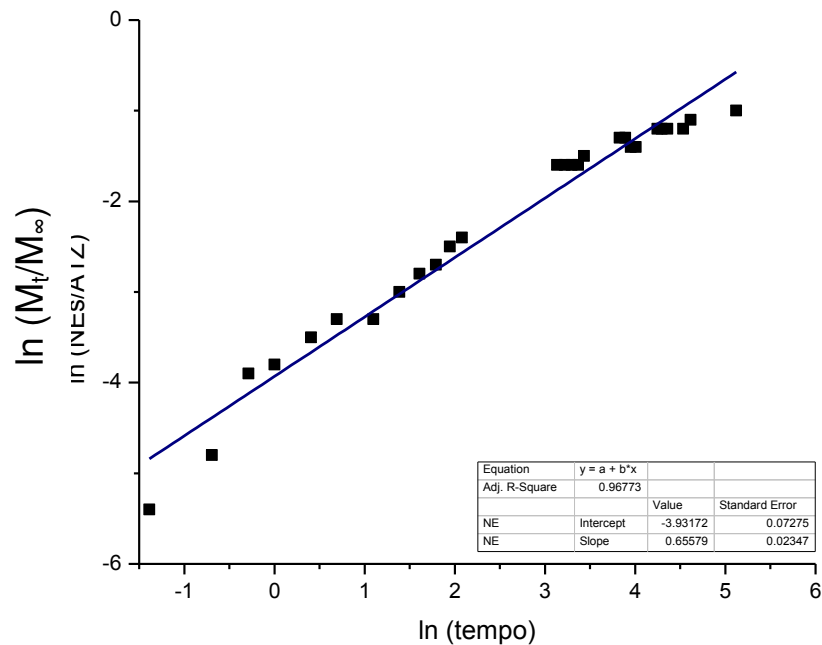
Muitos sistemas carreadores de compostos bioativos podem desempenhar importante papel na liberação modificada, uma vez que estes são capazes de controlar a liberação do ativo em função do tempo. O mecanismo pelo qual um ativo é liberado pode ser determinado por diferentes fatores físico-químicos como, o transporte do interior da matriz polimérica para o meio de dissolução, alterações nas propriedades dos polímeros, como intumescimento e degradação que podem facilitar a difusão de um ativo (LOPES *et al.*; 2005).

A fim de investigar o mecanismo de liberação da ATZ das NPs de PCL foi utilizado o modelo matemático de Korsmeyer-Peppas. Esse modelo descreve qual o mecanismo de liberação de um soluto de uma matriz, que pode ser um gel, NPs entre outras. Dentre os principais mecanismos de liberação de ativos para sistemas poliméricos destacam-se os de difusão conforme transporte Fickiano e trans-

porte do tipo caso II (não Fickiano, controlado pelo relaxamento das cadeias poliméricas) (RITGER & PEPPAS, 1987). O resultado da linearização das curvas de liberação do ativo ATZ encapsuladas em NPs para o modelo de Korsmeyer-Peppas pode ser visto nas Figuras 15 e 16.



**Figura 15:** Análise do modelo matemático de Korsmeyer-Peppas para as NCs/ATZ (Equação 1 item 3.2.3.7).



**Figura 16:** Análise do modelo matemático de Korsmeyer-Peppas para as NEs/ATZ (Equação 1 item 3.2.3.7).

A partir da análise da regressão linear das curvas, foi possível calcular os valores de constante de liberação e expoente de liberação para as NCs/ATZ e NEs/ATZ, sendo os valores apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4:** Valores da constante cinética de liberação (k) do expoente de liberação (n) coeficiente de correlação linear (r) das lineares obidas.

	Constante de liberação <u>(k)</u>	Expoente de liberação <u>(n)</u>	Coefficiente de correlação <u>(r)</u>
<b>NC/ATZ</b>	0,015 min <sup>-1</sup>	0,70	0,97
<b>NE/ATZ</b>	0,019 min <sup>-1</sup>	0,65	0,96

Os valores das constantes de liberação mostram que a liberação do ativo pelas NEs/ATZ ocorre de forma mais rápida quando comparada com a NCs/ATZ. Isto pode ser devido à interação do ativo com o núcleo oleoso das NCs ser maior do que com a matriz polimérica que está presente nas NEs. No entanto, em relação ao mecanismo de liberação, para os dois sistemas os expoentes de liberação, indicam transporte anômalo ( $0,45 < n < 0,89$ ), ou seja, a liberação do ativo depende da difusão do ativo ATZ em conjunto com o relaxamento das cadeias poliméricas.

Grillo e colaboradores (2012) mostraram que para NPs de PCL preparadas pelo método de nanoprecipitação contendo ATZ, foram obtidos de Korsmeyer-Peppas de constante cinética de liberação de  $6,8 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$  e um expoente de liberação ( $n$ ) de 0,92. Esses valores indicam que a ATZ foi liberado por processos que dependem da erosão e relaxamento da matriz polimérica. Observa-se que, devido a metodologia de preparo das NPs serem diferentes, fez com que o mecanismo de liberação do mesmo ativo, utilizando o mesmo polímero, fosse diferente.

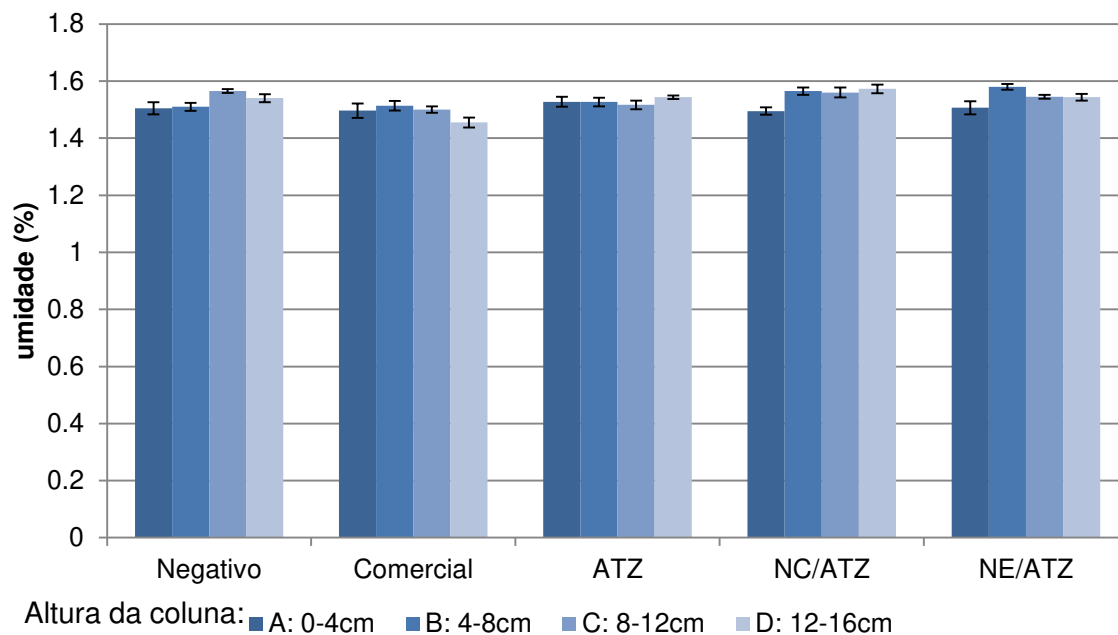
Na literatura são descritos outros trabalhos que mostram que os mecanismos de liberação de ativos dependem além da metodologia de preparo, também da característica química do ativo e sua interação com o sistema carreador. Silva e colaboradores (2011) usando o Hb paraquat em NPs de alginato com quitosana observaram que o mecanismo de liberação para esse Hb é mediado por transporte tipo caso II.

Cea e colaboradores (2010) em microesferas de etil-celulose determinaram que o mecanismo de liberação do ativo ATZ ocorre por difusão simples com valores de constante de liberação ( $k$ ) em uma faixa de 1,2 a  $0,18 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$  para diferentes formulações preparadas.

#### 4.5 Ensaios de interação com solo e avaliação da atividade herbicida da atrazina

Diferentes formas de manejo do solo na agricultura alteram a forma de ação do Hb, compreender os mecanismos que o ativo ATZ se transporta no solo auxilia o entendimento de formas para reduzir processos de lixiviação e contaminação de recursos hídricos (CORREIA *et al.*, 2010). Sistemas que alterem a lixiviação destes compostos podem amenizar o impacto destes a recursos hídricos.

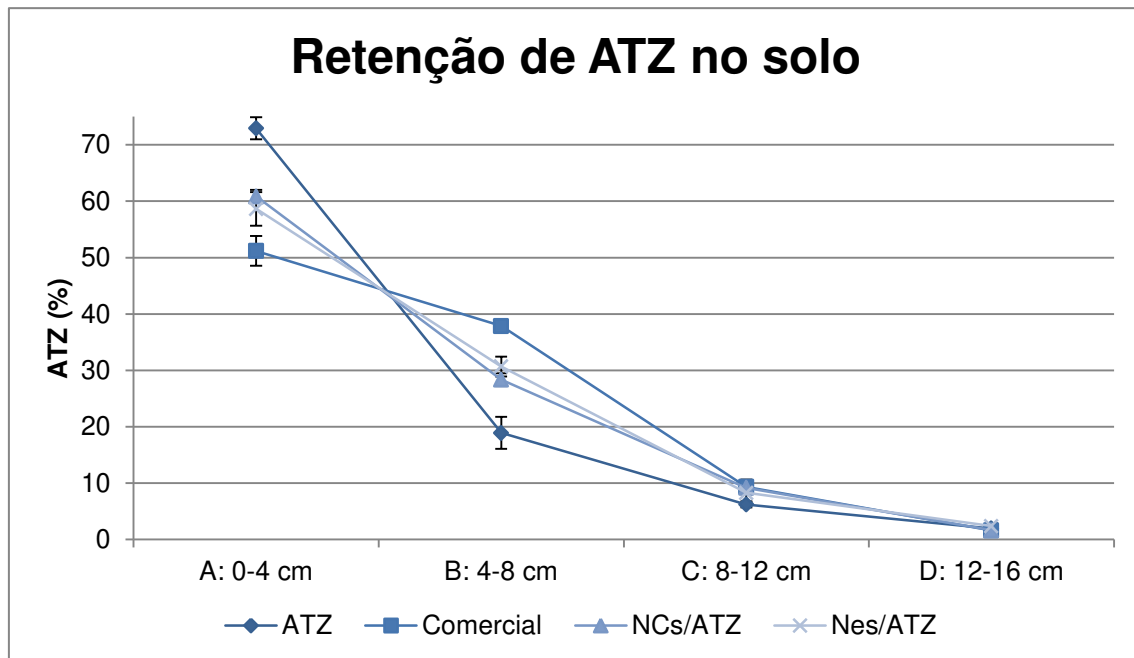
Neste contexto, a fim de avaliar a interação da ATZ (encapsulada ou não) com solo, bem como investigar seu perfil de mobilidade, foram preparadas colunas de solo conforme descrito no item 3.2.4.1. O perfil de umidade ao longo da coluna de solo (item 3.2.4.3) é apresentado na Figura 17.



**Figura 17:** Perfil da umidade do solo medido para as diferentes frações da coluna de solo (A: 0-4 cm; B: 4-8 cm; C: 8-12 cm; D: 12-16 cm) para os diferentes tratamentos: negativo (apenas água), Comercial (formulação comercial de ATZ), ATZ, NC/ATZ, NE/ATZ. Valores expressos como a média de quintuplicatas determinados à temperatura de 25 °C.

A análise dos dados mostra que não há diferenças no perfil de umidade das diferentes frações da coluna de solo, indicando que a hidratação realizada após as etapas de irrigação foi uniforme (Figura 17), garantindo assim que, após a irrigação, a distribuição da ATZ não foi limitada por diferenças de hidratação ao longo da coluna.

Após esta análise, foi realizada a quantificação da distribuição de ATZ ao longo do perfil da coluna de solo. Os dados referentes à quantificação da ATZ (item 3.2.1) das diferentes formulações estão apresentados na Figura 18, sendo os valores comparados entre as mesmas faixas da coluna de solo.



**Figura 18:** Avaliação da distribuição de ATZ (em %) ao longo do perfil das colunas de solo para as formulações de ATZ, comercial, NCs/ATZ e NEs/ATZ. Valores expressos como a média de cinco experimentos realizados à 25°C.

A Figura 18 mostra que o ativo ATZ possui maior retenção na camada superior da coluna (A: 0-4 cm), sendo o valor de porcentagem encontrado diferente dos demais tratamentos ( $p < 0,001$ ). Uma possível explicação deve-se ao fato da ATZ ter sido adicionada a um em solo ácido (pH 5,4) o que favoreceu o aumento

de sua protonação, fazendo que ocorresse aumento na sua adsorção aos colóides presentes no solo, por exemplo, matéria orgânica natural. A formação de complexos com matéria orgânica do solo favorece um aumento do tempo de residência no solo e causam diminuição da biodisponibilidade deste ativo (KROVAC, 1986; RADOSEVICH *et al.*, 1997), causando assim bioacumulação deste no solo (GUIMARÃES, 1987).

O mesmo efeito não foi observado para a formulação comercial e as NPs/ATZ, fato este devido provavelmente as formulações estarem associadas à tensoativos que são utilizados em formulações comerciais e nos sistemas carreadores como as NPs, diminuindo assim as possíveis interações da ATZ com o solo.

Abu Zreig e colaboradores (1999) avaliaram que surfactantes alteram o perfil de sorção da ATZ, sendo que quando os surfactantes são iônicos, estes aumentam a sorção do ativo em função do aumento da concentração. Já os surfactantes não-iônicos podem causar aumento ou diminuição da sorção em função da concentração usada.

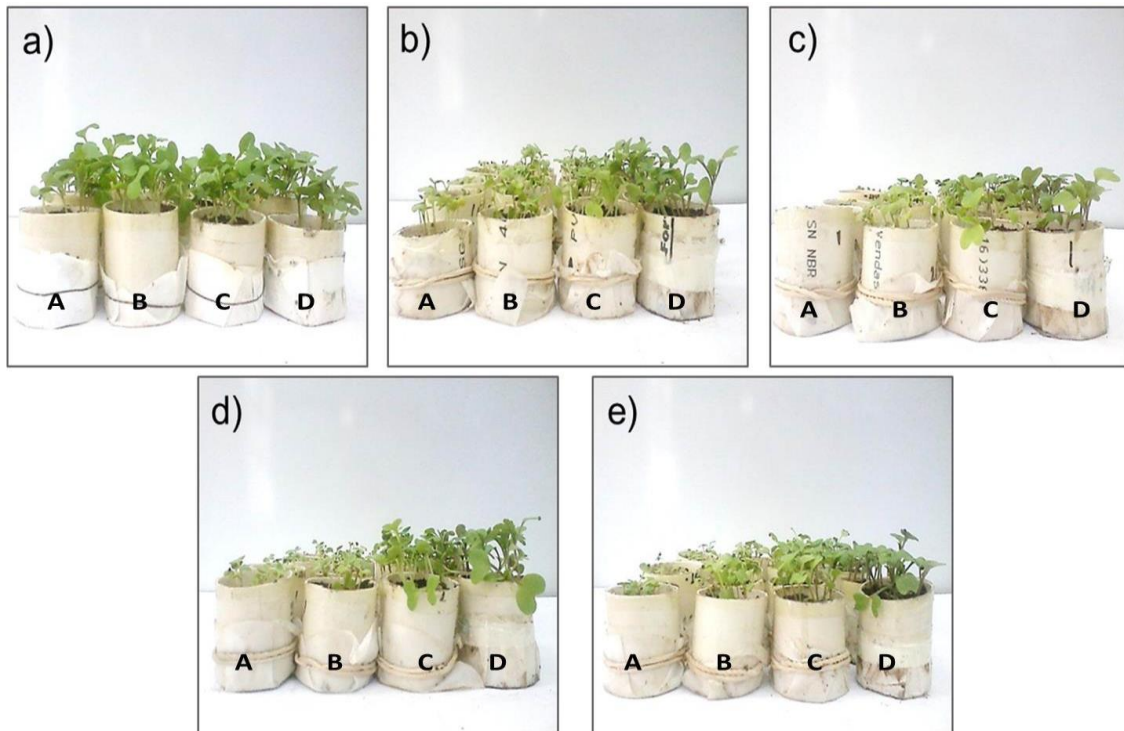
Comparando os dados de retenção das NPs/ATZ com a formulação comercial, observa-se que no ponto A (0-4 cm) da coluna, as NCs/ATZ apresentam uma maior retenção no solo ( $p < 0,05$ ). No ponto B (4-8 cm), as NPs/ATZ apresentaram uma menor porcentagem do ativo ATZ ( $p > 0,001$ ), indicando que houve menor mobilidade do ativo ATZ quando associados às NPs do ponto A para o ponto B. A menor passagem entre as frações da coluna pode indicar uma possível redução no perfil de lixiviação causada pelo uso de NPs, porém outros ensaios devem ser realizados para confirmação desta hipótese.

Em relação à distribuição da ATZ nos pontos A (0-4 cm) e B (4-8 cm) das colunas de solo, observaram-se os seguintes perfis:

**Ponto A:**  $ATZ > NC/ATZ \geq NE/ATZ \geq Comercial$

**Ponto B:**  $Comercial \geq NE/ATZ > NC/ATZ \geq ATZ$

Outra maneira de avaliar a distribuição da ATZ ao longo das colunas de solo foi a semeadura de *Brassica sp*, espécie sensível a ATZ (CEA *et al.*, 2012). A Figura 19 mostra as plantas após duas semanas do plantio.

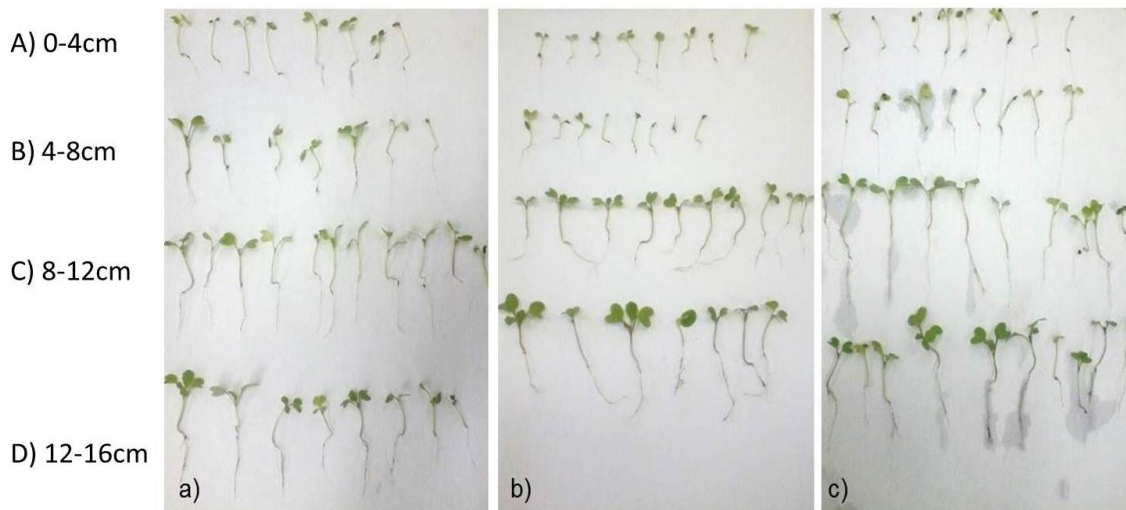


**Figura 19:** Plantas *Brassica sp* cultivadas nos anéis de solo após duas semanas do plantio. Na Figura, estão representados os diferentes anéis para cada um dos tratamentos a) Negativo; b) Formulação Comercial; c) ativo ATZ; d) NC/ATZ e e) NE/ATZ. As frações da coluna estão dispostas na figura da esquerda (topo da coluna) para direita (base da coluna), sendo as frações A (0 a 4 cm); B (4 a 8 cm); C (8 a 12 cm) e D (12 a 16 cm).

A partir da Figura 19, pode-se observar que as plantas encontradas na parte A da coluna possuem tamanho inferior e aumentam de tamanho ao longo do aumento da profundidade da coluna. Este fato pode ser explicado pela distribuição do ativo ATZ ao longo da coluna, conforme dados mostrados na Figura 18. Para uma melhor visualização, a Figura 20 mostra as plantas retiradas de cada faixa da



coluna de solo, onde se pode observar o efeito da atividade Hb ao longo do perfil da coluna de solo.



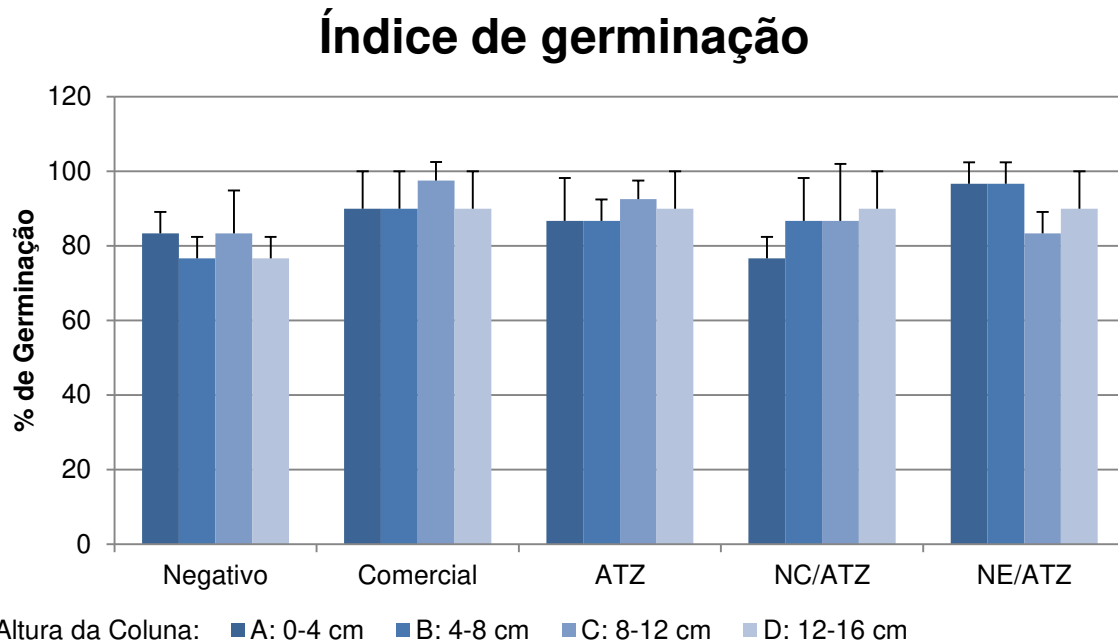
**Figura 20:** Plantas retiradas das frações das colunas de solo (A-D) após o período de duas semanas de cultivo. Na Figura, são apresentados resultados dos seguintes tratamentos: a) Formulação comercial; b) NCs/ATZ e c) NEs/ATZ.

Nota-se que nos anéis superiores (pontos A e B), em que há a maior concentração de ATZ, foram observados efeitos tanto na porção aérea das plantas quanto nas porções radiculares (Figura 20). Já para os anéis mais inferiores das colunas de solo, pode-se observar que o efeito observado foi menor, evidenciando a distribuição do ativo ATZ (Figura 18).

#### 4.5.1 Índice de germinação

A entrada de Hb nos tecidos vegetais é fator decisivo para a eficiência do produto, estes podem penetrar nas partes aéreas das plantas, subterrâneas, sementes e durante o processo de germinação (FERREIRA *et al.*, 2002). Para avaliar o efeito Hb pré-emergente na germinação das sementes, foi determinado o índice de germinação ao longo da altura da coluna de acordo com o item 3.2.4, Equação 3. O índice de germinação para cada um dos anéis em diferentes pro-

fundidades foi baseado em plantas que germinaram e se desenvolveram após duas semanas (Figura 21).

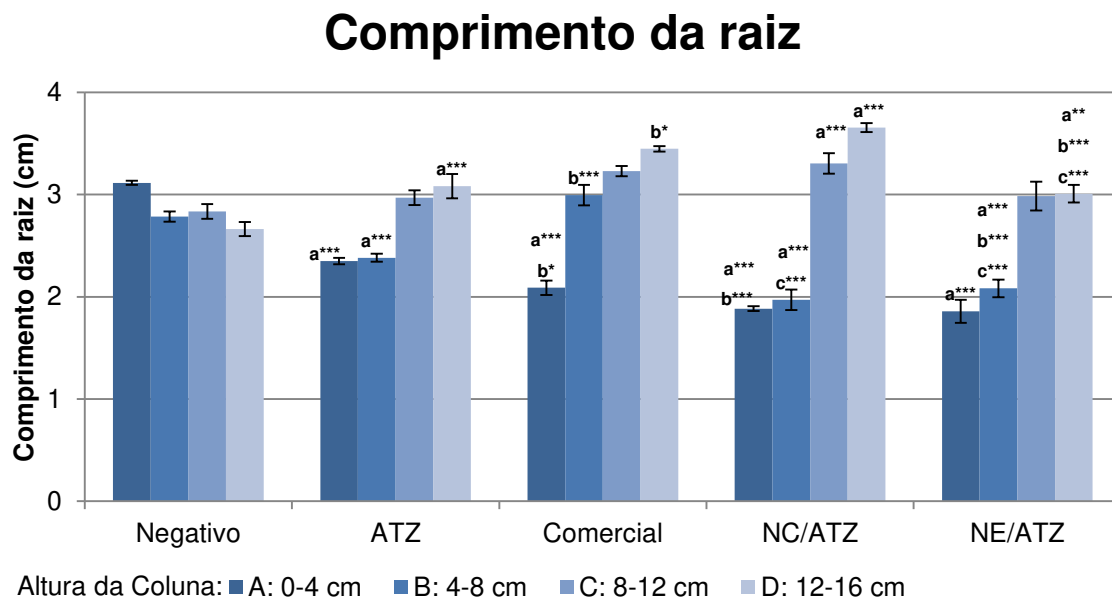


**Figura 21:** Índice de germinação das sementes de *Brassica sp* nas diferentes frações de solo proveniente de cada tratamento. Valores representam a média do índice de germinação para 10 sementes plantadas. Ensaio realizado em quintuplicata e determinados à 25 °C.

A Figura 21 mostra que o índice de germinação se encontra entre 80 e 90 % para todas as colunas, o que condiz com as especificações do fabricante. Os resultados indicam que a ATZ não interferiu na germinação das sementes, uma vez que nos primeiros anéis (que contém maior concentração de ATZ) a porcentagem de germinação não sofreu alteração, mantendo-se ao redor de 80%.

#### 4.5.2 Avaliação de parâmetros quantitativos do efeito dos herbicidas ao longo da coluna de solo

Para análise quantitativa das plântulas de *Brassica sp* nos anéis em diferentes profundidades foram determinados parâmetros como: I) comprimento da raiz, II) altura da parte aérea, III) matéria verde e IV) matéria seca. A avaliação permite obter efeitos gerados devido à mobilidade do ativo ATZ. Destaca-se que as análises apresentadas levam em consideração o perfil de migração do ativo ATZ ao longo da coluna, bem como, um comparativo entre as diferentes formulações, porém sem considerar as diferentes quantidades de ativo em cada anel. Os dados de comprimento de raiz da *Brassica sp* nos anéis são apresentados na Figura 23.



**Figura 22:** Resultados das análises do comprimento da raiz observados ao longo do perfil da coluna de solo após a aplicação das formulações e crescimento das plantas por um período de duas semanas. A fim de realização de comparação entre os diferentes grupos foi feita análise estatística do parâmetro comprimento da raiz sendo representados em: a) comparação das formulações com o controle; b) comparação da formulação comercial e de NPs/ATZ com o ativo ATZ; c) comparação da formulação comercial com as NPs/ATZ. Valores representam a média de cinco determinações; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$ .

Brançalion e colaboradores (2009) verificou que os Hb setoxidim, isoxaflutol e bentazon inibiram o desenvolvimento de espécies arbóreas. O mesmo efeito foi observado para todas formulações com o ativo ATZ para a espécie *Brassica sp.*

As raízes foram a única parte da planta que se encontrou em contato direto com a ATZ (previamente aplicada sobre o solo). A raiz é o principal meio de absorção da ATZ em plantas na aplicação pré-emergente, onde Hb inibidores do fotossistema (como a ATZ), absorvem o Hb pelas raízes, sendo este translocado através dos tecidos vasculares (xilema) até atingir o sítio de ação, no caso o fotossistema II (SATICHIVI *et al.*, 2000).

A comparação entre o ativo ATZ e a formulação comercial, NCs/ATZ e NEs/ATZ mostrou que mesmo havendo maior porcentagem do ativo livre ATZ na fração A (0-4 cm) (Figura 18) o efeito da formulação comercial e NPs/ATZ foi mais pronunciado (com menor crescimento de raízes) ( $p < 0,001$ ) (Figura 22).

Esses resultados podem ser um indicativo que no caso do grupo tratado apenas com ATZ livre, este pode ter apresentado uma alta sorção nos componentes do solo, como matéria orgânica natural, fazendo com que a disponibilidade desses fosse menor em relação às demais formulações que possuíam tensoativos.

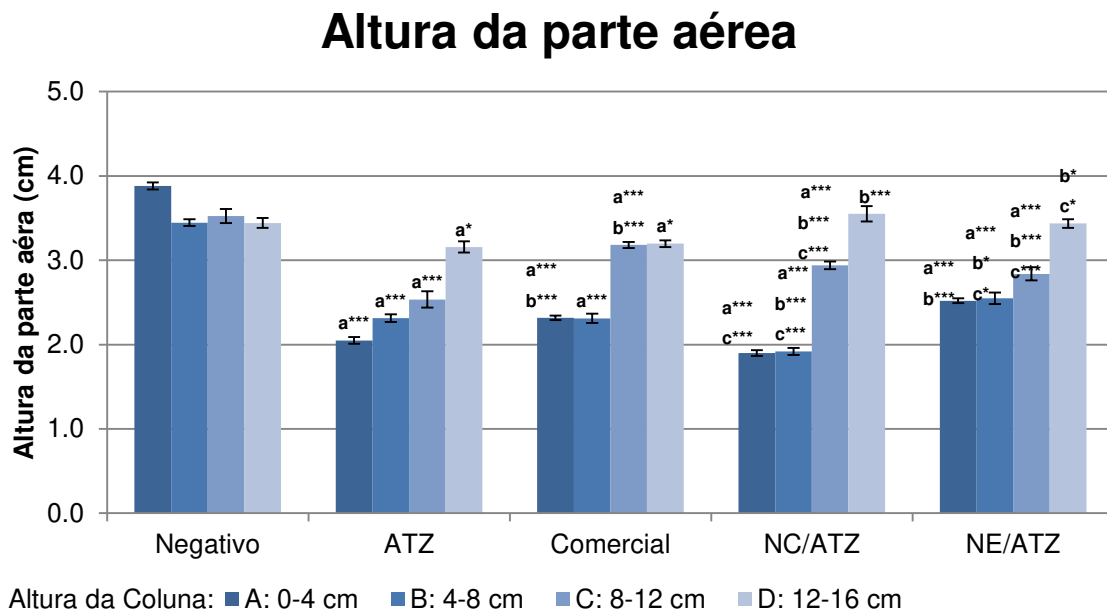
Este resultado é interessante, uma vez que mostra que os sistemas carreadores preparados neste estudo podem estar minimizando a interação com a matriz do solo e, ao mesmo tempo, tendo um melhor direcionamento para absorção do Hb pelas plantas alvo, uma vez que um dos fatores que afetam o efeito do Hb em plantas é a sorção, estes podem interagir com os componentes do solo limitando a quantidade de ativo disponível para interação com a planta e consequentemente sua atividade Hb (CEJUDO-ESPINOSA *et al.*, 2009).

A sorção de Hb se relaciona com o tipo de solo, esses quando possuem maior teor de matéria orgânica, fazem com que os processos de sorção dos Hb sejam maiores (OLIVEIRA *et al.*, 2004). Para cada tipo de solo é determinada uma

concentração do Hb para sua ação efetiva e desta forma, se obter o controle adequado do crescimento de plantas daninhas por um período de tempo (INOUE *et al.*, 2011).

O uso de tensoativos causa um aumento da biodisponibilidade de Hb para as plantas alvos. Destaca-se que no ponto B (4-8 cm) as formulações de NPs apresentam menores quantidades de ATZ em comparação com a formulação comercial (Figura 18), fato esse que pode indicar maior efetividade das NPs/ATZ.

Em seguida avaliou-se o efeito dos tratamentos referentes à altura da parte aérea das plantas de *Brassica sp.* são apresentados na Figura 23.



**Figura 23:** Resultado das análises da altura da parte aérea das plantas observados ao longo do perfil da coluna de solo após a aplicação das formulações e crescimento das plantas após um período de duas semanas. A fim de realizar comparação entre os diferentes grupos foi feita análise estatística do parâmetro altura da parte aérea sendo representados em: a) comparação das formulações com o controle; b) comparação da formulação comercial e de NPs/ATZ com o ativo ATZ; c) comparação da formulação comercial com as NPs/ ATZ. Valores representam a média de cinco determinações; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$ .

Ao se avaliar os efeitos das formulações em comparação com o controle, observa-se que todas as formulações apresentaram efeitos de redução no desenvolvimento da parte aérea das plantas de *Brassica sp.* Apenas no ponto D (12-16 cm) para as NPs/ATZ os efeitos não foram significativos (Figura 23). Esses resultados podem representar que há maior retenção do ativo ATZ (nas partes superiores da coluna) pelas NPs/ATZ, uma vez que o bioindicador apresentou valores iguais ao controle no ponto D. As NCs/ATZ, no ponto A exerceu maior efeito inibitório no crescimento da parte aérea das plantas quando comparado com o tratamento com o ativo livre ATZ comercial ( $p < 0,001$ ) (Figura 23) mesmo em menor porcentagem para o mesmo ponto (Figura 18).

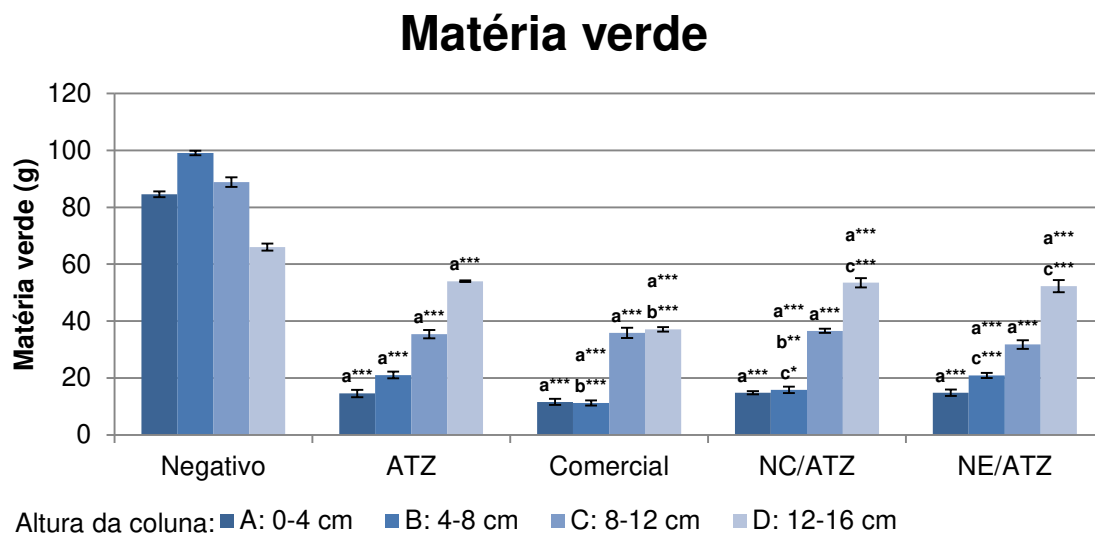
Avila e colaboradores (2009) ressaltam que sistemas carreadores como alternativa para aplicação de Hb são importantes, uma vez que estes carreadores minimizam processos de sorção do Hb no solo, fazendo com que possa ser realizada a diminuição da dose recomendada mantendo a atividade biológica.

DAN e colaboradores (2010) mostraram que o Hb, quando aplicado em altas concentrações, pode causar efeitos em organismos não alvos. Esses autores descreveram que a espécie *Pennisetum glaucum* (milheto) sofreu efeitos adversos como intoxicação, redução do número de afilhos (brotos) e do acúmulo de biomassa seca da parte aérea após aplicação de ATZ (em concentração acima de 1,5 kg/ha) na forma pré-emergente. No entanto, com a redução da dose do Hb para 1,5 kg/ha não houve prejuízo no estágio de desenvolvimento da espécie *Pennisetum glaucum*, no entanto, esta quantidade encontra-se abaixo da dose recomendada para controle de plantas daninhas (DAN *et al.*, 2010).

DAN e colaboradores (2011) avaliaram o efeito da ATZ no controle pós-emergente de *Cenchrus echinatus*, planta daninha em cultivos de milho, sorgo e milheto no Brasil e verificaram que houve um controle de 90% das plantas daninhas com a dosagem de 3,5 kg/ha, sendo esta a máxima concentração recomendada.

Fatores como o aumento da concentração do Hb para o controle de plantas daninhas causam problemas como a permanência no solo, isto pode produzir fitotoxicidade em culturas não alvo ao longo do tempo, causando queda na produtividade (BRIGHENTI *et al.*, 2002, DELMONTE *et al.*, 1996). Fatores como estes, reforçam o uso de sistemas carreadores como os produzidos neste estudo, podendo assim possibilitar a redução da quantidade de Hb para se ter uma ação efetiva e evitar o excesso destes no solo, causando assim menores efeitos ao ambiente.

Os dois últimos parâmetros avaliados foram as massas de matéria verde e seca (raiz, caule e folhas), o que pode indicar de uma forma ampla o efeito Hb sobre a *Brassica sp.* Os dados relativos à matéria verde são apresentados na Figura 24.



**Figura 24:** Resultados obtidos para a matéria verde das plantas observado ao longo do perfil da coluna de solo após a aplicação das formulações e crescimento das plantas sobre este solo. A fim de comparação entre os diferentes grupos foi feita análise estatística do parâmetro matéria verde, sendo representados em: a) comparação das formulações com o controle; b) comparação da formulação comercial e de NPs/ATZ com ATZ; c) comparação da formulação comercial com as NPs/ATZ. Valores representam a média de cinco determinações; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$ .

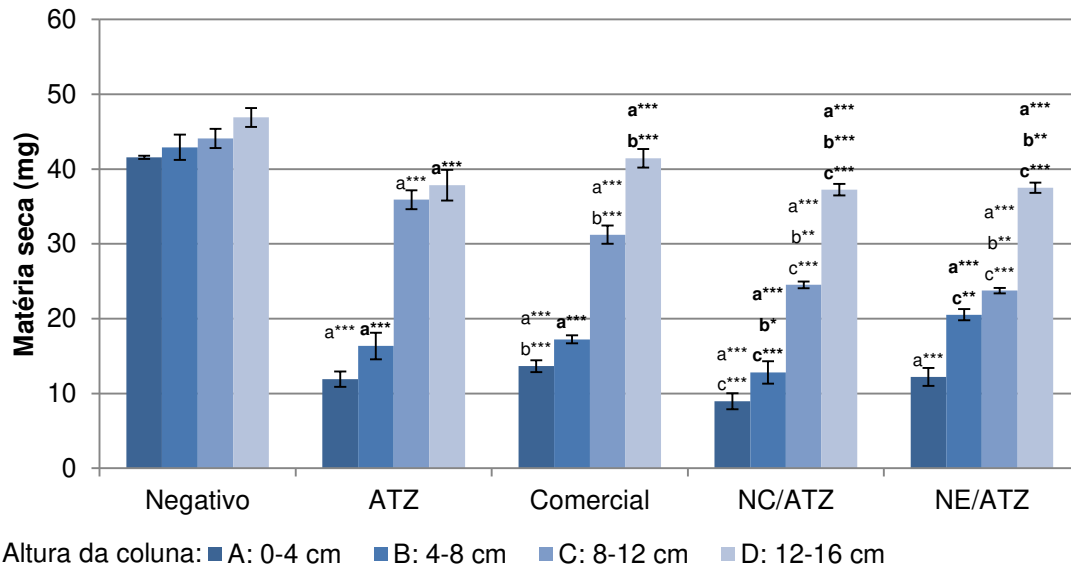
A avaliação em relação ao controle demonstra que todas as formulações causaram efeitos sobre a massa de matéria verde, mesmo no ponto D, no qual para a maioria dos parâmetros avaliados anteriormente (comprimento da raiz e altura) algumas formulações haviam apresentado valores iguais ao controle ( $p < 0,001$ ) (Figura 24).

A massa da matéria verde para as NCs/ATZ foi menor que a observada para o ativo livre ATZ no ponto B ( $p < 0,001$ ), sendo que para os demais pontos da coluna as NPs/ATZ tiveram mesmo efeito que o ativo livre ATZ, este efeito condiz com a baixa concentração de ATZ encontrado no ponto B (Figura 18). Em comparação à formulação comercial, as NPs/ATZ apresentaram menores valores de massa de matéria verde em todos os pontos da coluna de solo (Figura 24).

O último parâmetro avaliado foi a massa de matéria seca das plantas após o período de duas semanas do tratamento. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 25.



## Matéria seca



**Figura 25:** Resultados obtidos para a matéria seca das plantas observados ao longo do perfil da coluna de solo após a aplicação das formulações e crescimento das plantas sobre este solo. A fim de realização de comparação entre os diferentes grupos foi feita análise estatística do parâmetro massa de matéria seca, sendo representados em: a) comparação das formulações com o negativo; b) comparação da formulação comercial e de NPs/ ATZ com o ativo ATZ; c) comparação da formulação comercial as NPs/ ATZ. Valores representam a média de cinco determinações; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$ .

Como avaliado em todos os parâmetros anteriormente, quando comparado ao controle, a massa de matéria seca para todos os pontos da coluna tratados com Hb apresenta valores inferiores ao controle ( $p < 0,001$ ) (Figura 25).

As NCs/ATZ apresentam maior efeito na redução de massa de matéria seca quando comparada com a formulação comercial na maioria dos pontos da coluna de solo ( $p < 0,001$ ) (Figura 25).

A irrigação da ATZ para as diferentes formulações mostrou que para a maioria dos parâmetros avaliados as NPs/ATZ apresentaram maiores efeitos nos pontos A (0-4 cm) e B (4-8 cm). No entanto, no ponto D, para as NCs/ATZ estas possuem valores próximos ao controle ou maiores que os observados para as demais

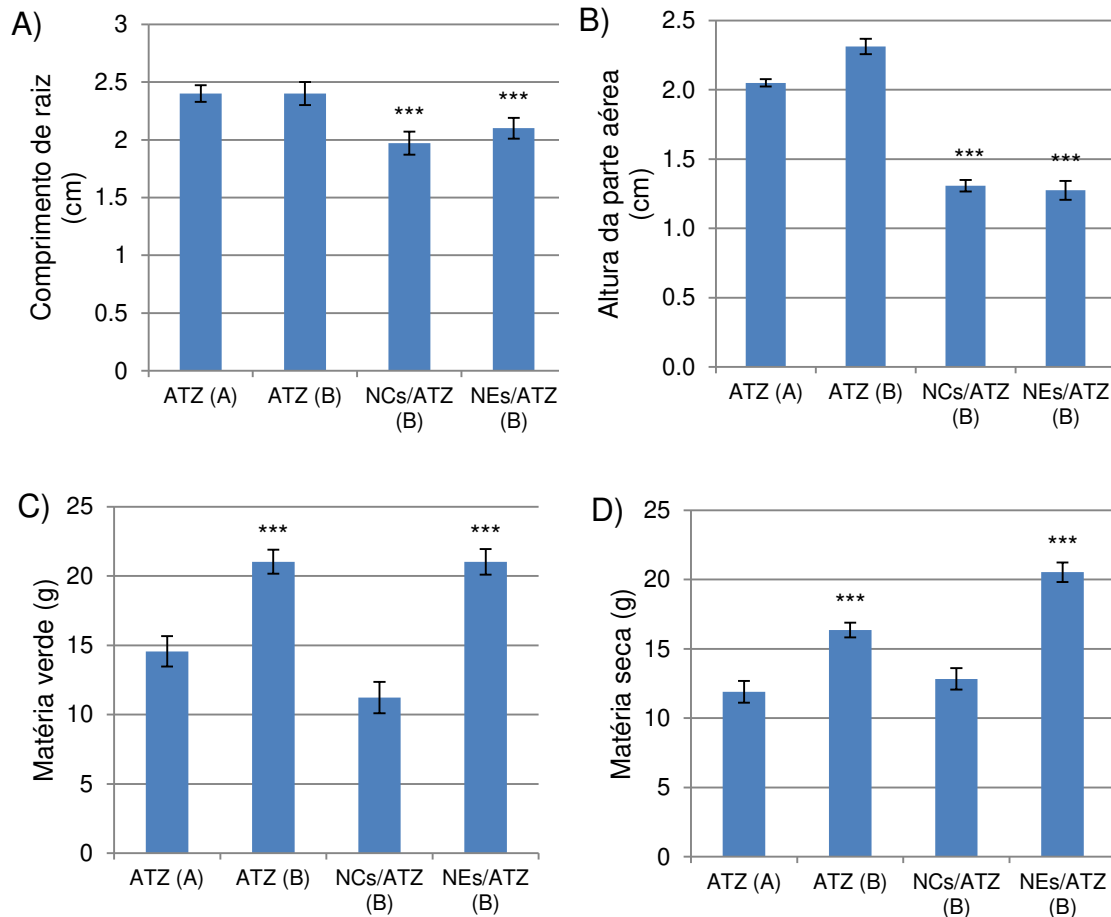
formulações, indicando que as NCs/ATZ reduziram a mobilidade da ATZ na coluna de solo.

#### **4.5.3 Efetividade das formulações de NPs**

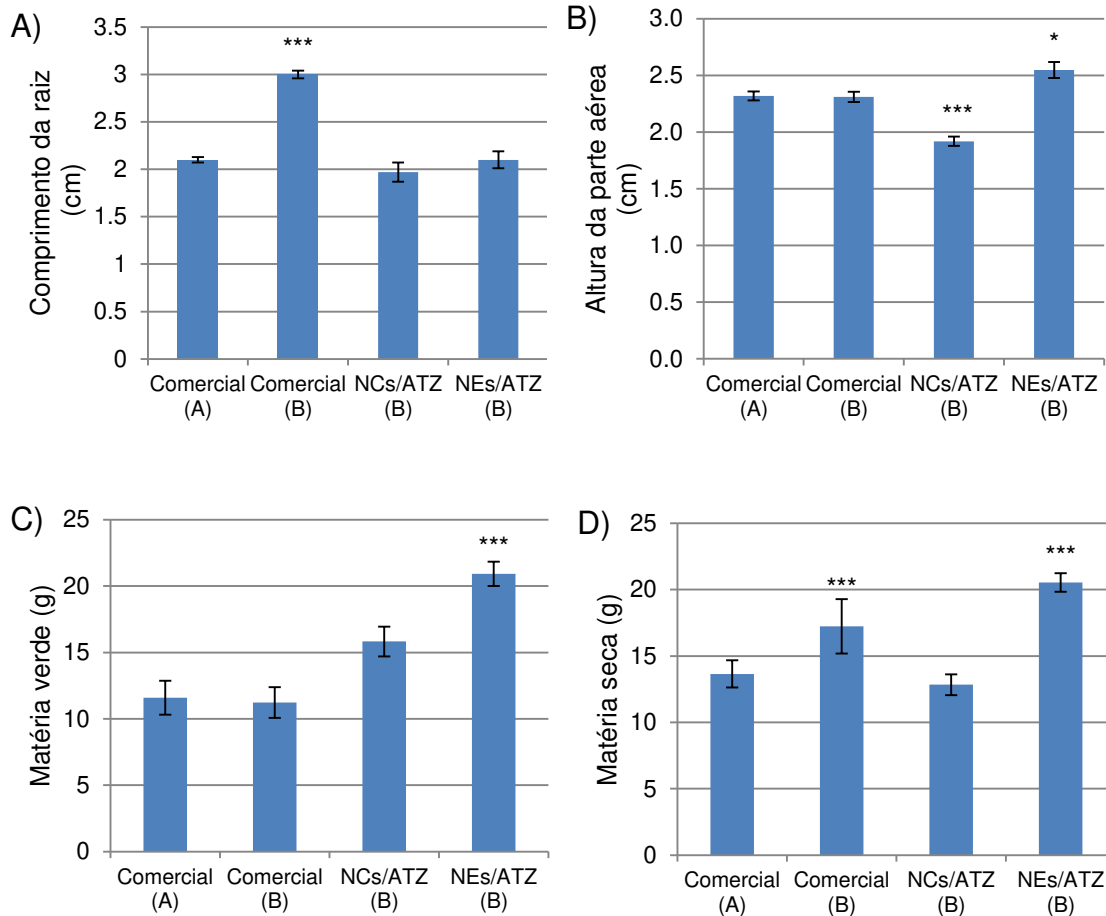
O uso das NPs como sistemas carreadores para a ATZ, podem aumentar a eficiência no controle de ervas daninha, proteger o ativo de processos de degradação, minimizar processos de sorção no solo e redução da contaminação ambiental (CEA, *et al.*; 2010; PAULA *et al.*, 2010). O uso de NPs pode reduzir a concentração efetiva do ativo, obtendo uma mesma ação nos organismos alvo.

Para avaliar a efetividade das NPs/ATZ em menores concentrações, utilizou-se os dados das colunas de solo. Para isso foi realizada uma comparação entre os pontos A (0-4 cm) onde há maior concentração de ATZ e o ponto B (4-8 cm), devido a redução da concentração do ativo ATZ (Figura 18). A comparação foi com os efeitos do ativo livre ATZ e a formulação comercial no ponto A (0-4 cm), em relação a essas mesmas formulações e as NPs/ATZ no ponto B (4-8 cm).

Para realização desta análise, utilizaram-se parâmetros como: o comprimento da raiz, a altura das plantas, a massa de matéria verde e seca no ponto B (menor concentração) em comparação com o ponto A (maior concentração) da coluna de solo. As comparações foram realizadas entre as NPs/ATZ e a ATZ (Figura 26) e NPs/ATZ e a formulação comercial (Figura 27).



**Figura 26:** Comparação entre os pontos A (0-4 cm) e B (4-8 cm) para os parâmetros analisados: A) altura; B) comprimento das raízes; C) matéria verde; D) matéria seca, observados ao longo do perfil da coluna de solo após a aplicação das formulações e crescimento das plantas sobre este solo. A fim de realização de comparação entre os efeitos do ativo ATZ no ponto A da coluna de solo em relação aos efeitos da ATZ e as NPs no ponto B. Estatística: \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$  e \*  $p < 0,05$ .



**Figura 27:** Resultados obtidos para os parâmetros analisados A) número de folhas; B) altura; C) comprimento das raízes; D) matéria verde; E) matéria seca, observados ao longo do perfil da coluna de solo após a aplicação das formulações e crescimento das plantas sobre este solo. A fim de realização de comparação entre os efeitos da formulação comercial no ponto A da coluna de solo em relação aos efeitos da formulação comercial e as NPs no ponto B. Estatística: \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$  e \*  $p < 0,05$ .

Ao se avaliar todos os parâmetros observou-se que ao longo do perfil da coluna as formulações de ATZ e NEs/ATZ apresentaram uma diminuição da atividade Hb devido a diminuição da concentração do ativo.(Figura 26).

O mesmo efeito não foi observado nas NCs/ATZ, uma vez que no ponto B (4-8 cm), essas apresentaram valores semelhantes aos efeitos que o ativo ATZ no ponto A (0-4 cm). Para a análise do comprimento da raiz, observou-se uma maior inibição ( $p < 0,001$ ), mostrando que em menor concentração as NCs/ATZ foram mais eficazes que as NEs/ATZ e ATZ (Figura 26).

A formulação comercial no ponto B (0-4 cm) diminuiu a atividade Hb em dois parâmetros (comprimento da raiz e matéria seca) quando comparado ao ponto A (0-4 cm). As NCs/ATZ no ponto B (4-8 cm) manteve a mesma atividade Hb que a formulação comercial no ponto A (0-4 cm), possuindo maior ação Hb para o parâmetro comprimento da parte aérea ( $p < 0,001$ ) (Figura 27).

A partir da avaliação de todos os parâmetros, verificou-se que no ponto B (4-8 cm) as NPs/ATZ mantêm a atividade Hb diferente do ativo ATZ e a formulação comercial que diminuem a atividade quando comparado com o ponto A (0-4 cm), ou seja, mesmo com a menor concentração as NPs/ATZ mantêm a atividade Hb.

A maior ação pode ser devida as características das NPs que promovem um sistema de liberação sustentada, aumentando o tempo de atividade Hb e também devido a diminuição de processos de sorção e interação com hidrocolóides do solo. As NCs/ATZ apresentaram maior atividade Hb que as NEs/ATZ, fato este que pode ser devido o uso de miyritol, facilitando o aumento da atividade Hb, ainda mais no caso da ATZ que é um Hb hidrofóbico (SOPEÑA *et al.*, 2009). O uso de NPs pode ter aumentado a biodisponibilidade do ativo ATZ para as plantas, no entanto mais estudos são necessários para uma maior compreensão do mecanismo de transporte e ação dos Hb associados às NPs.

#### 4.6 Ensaio de *Allium Cepa*

A exposição a agentes químicos pode resultar em lesões no DNA, esses efeitos podem ser genotóxicos ou mutagênicos, podendo resultar em problemas a saúde como afetar futuras gerações uma vez que as lesões podem se tornar hereditárias (LEME & MARIN-MORALES, 2009; SINGH, *et al.*, 2009).

Aberrações cromossômicas induzidas por compostos químicos estão sendo cada vez mais estudadas, sendo seu avanço dependente do desenvolvimento de novas metodologias para detecção das aberrações (MATEUCA, 2006). Vários ensaios de mutagenicidade “*in vitro*” tiveram grandes avanços metodológicos, dentre eles, destacam-se o teste de Ames (FUTAKAMI *et al.*, 2007); o ensaio cometa (BRINK *et al.*, 2008); o ensaio de micronúcleo (MATEUCA *et al.*, 2006); o ensaio de aberração cromossômica *Allium cepa* (LEME & MARIN-MORALES, 2009) e o ensaio citogenético (AU *et al.*, 2001).

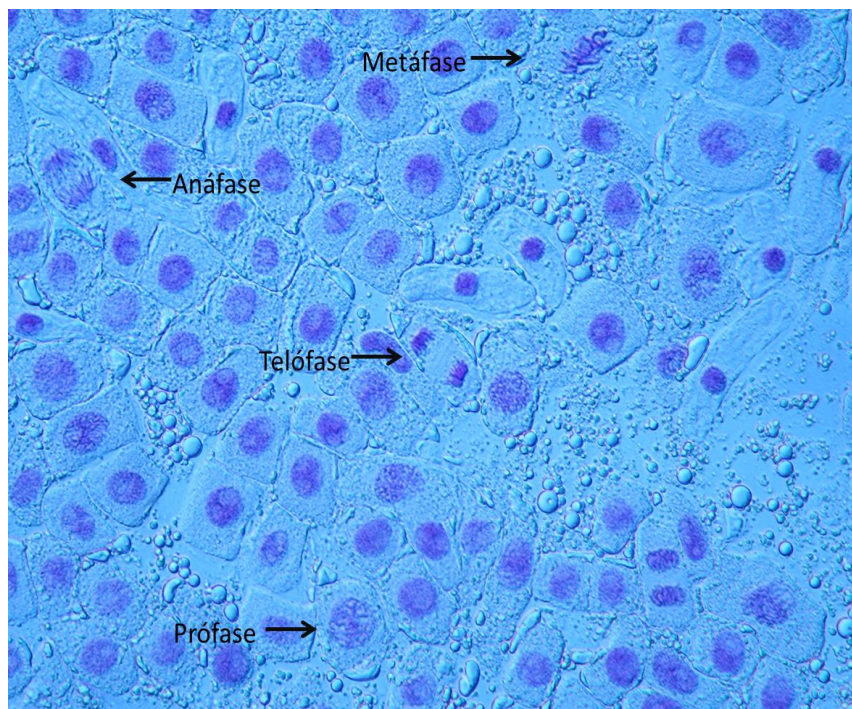
Estudos genotóxicos de nanomateriais são importantes, de forma a assegurar que estes poderão ser usados sem gerar danos ao ambiente e aos seres humanos (CHENG-TENG *et al.*, 2010; LANDSIEDEL *et al.*, 2010). Na área farmacêutica, o uso de NPs é aplicado para reduzir efeitos tóxicos e colaterais de fármacos (De JONG & BORM, 2008). A mesma estratégia está sendo realizada para DA, no qual o uso de NPs pode reduzir os efeitos tóxicos dos defensivos agrícolas em organismos e minimizar os impactos ambientais (NAIR *et al.*; 2010).

##### 4.6.1 Análise do efeito das formulações sobre o índice mitótico

A redução do índice mitótico indica que o composto testado pode ser classificado como citotóxico. Já o aumento nos valores de índice mitótico representa que o composto testado pode ativar a divisão celular, levando ao aumento da pro-

liferação celular de forma desordenada, podendo formar tecidos tumorais (LEME & MARIN-MORALES, 2009).

A determinação do índice mitótico a partir das raízes de *Allium cepa* pode ser calculada conforme descrito no item 3.4.1, sendo este obtido pela razão do número de divisões celulares pelo total de células em intérfase. A Figura 28 mostra uma imagem obtida a partir da lâmina de células meristemáticas de *Allium cepa* por microscopia ótica. Nesta figura é possível ver diferentes fases da divisão celular como intérfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase.



**Figura 28:** Imagem das células de *Allium cepa* obtidas por análise de microscopia ótica. A figura apresenta as principais fases de divisão celular (indicadas por setas) como: prófase, metáfase, anáfase e telófase. Imagem obtida com aumento de 40 vezes.

Após a exposição das raízes de *Allium cepa* aos diferentes tratamentos (controle, NPs/ATZ, NPs, ATZ e formulação comercial), as lâminas foram analisadas e foram calculados os índices mitóticos. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.

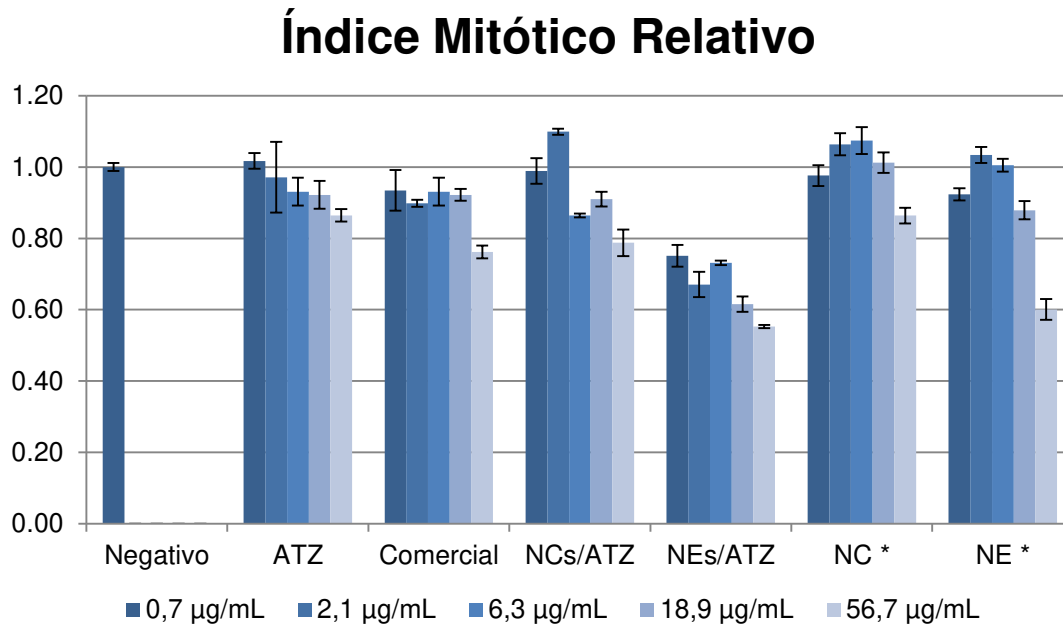
**Tabela 5:** Resultados obtidos a partir da análise das lâminas de *Allium cepa* para os diferentes tratamentos (controle, NPs/ATZ, ATZ e formulação comercial) em função de diferentes concentrações de ATZ, sendo as NPs sem ATZ avaliadas nas mesmas concentrações. Na tabela TCI, IM e IMR representam o total de células em intérfase, índice mitótico e índice mitótico relativo, respectivamente. Os valores de IM e IMR representam a média da análise de três lâminas.

		Negativo	<b>TCI</b>	<b>IM</b>	<b>IMR</b>
			2730	$0,0414 \times 10^{-4}$	$1,00 \pm 0,008$
		<b>Concentração (µg/mL)</b>	<b>TC</b>	<b>IM</b>	<b>IMR</b>
Comercial		0,7	3068	$0,041 \pm 9 \times 10^{-4}$	$0,93 \pm 0,05$
		2,1	3060	$0,039 \pm 4 \times 10^{-2}$	$0,90 \pm 0,009$
		6,3	2730	$0,039 \pm 8 \times 10^{-4}$	$0,93 \pm 0,039$
		18,9	3095	$0,037 \pm 1 \times 10^{-3}$	$0,92 \pm 0,016$
		56,7	2990	$0,035 \pm 7 \times 10^{-4}$	$0,76 \pm 0,017$
		<b>Concentração (µg/mL)</b>	<b>TC</b>	<b>IM</b>	<b>IMR</b>
ATZ		0,7	1620	$0,038 \pm 2 \times 10^{-3}$	$1,02 \pm 0,02$
		2,1	1602	$0,0368 \pm 3 \times 10^{-4}$	$0,97 \pm 0,099$
		6,3	1649	$0,038 \pm 1 \times 10^{-3}$	$0,97 \pm 0,02$
		18,9	1559	$0,037 \pm 6 \times 10^{-4}$	$0,92 \pm 0,031$
		56,7	1696	$0,031 \pm 7 \times 10^{-4}$	$0,86 \pm 0,017$
		<b>Concentração (µg/mL)</b>	<b>TC</b>	<b>IM</b>	<b>IMR</b>
NCs/ATZ		0,7	129	$0,040 \pm 1 \times 10^{-3}$	$0,99 \pm 0,03$
		2,1	95	$0,045 \pm 3 \times 10^{-4}$	$1,10 \pm 0,008$
		6,3	105	$0,035 \pm 2 \times 10^{-4}$	$0,86 \pm 0,005$
		18,9	120	$0,037 \pm 8 \times 10^{-4}$	$0,91 \pm 0,02$
		56,7	82	$0,032 \pm 1 \times 10^{-3}$	$0,79 \pm 0,03$
		<b>Concentração (µg/ mL)</b>	<b>TC</b>	<b>IM</b>	<b>IMR</b>
NEs/ATZ		0,7	4157	$0,030 \pm 1 \times 10^{-3}$	$0,75 \pm 0,03$
		2,1	2630	$0,027 \pm 1 \times 10^{-4}$	$0,67 \pm 0,03$
		6,3	3168	$0,029 \pm 2 \times 10^{-4}$	$0,73 \pm 0,005$
		18,9	3129	$0,025 \pm 8 \times 10^{-4}$	$0,62 \pm 0,021$
		56,7	3043	$0,022 \pm 1 \times 10^{-4}$	$0,55 \pm 0,004$
		<b>Concentração (µg/mL)</b>	<b>TC</b>	<b>IM</b>	<b>IMR</b>
NC*		0,7	3063	$0,037 \pm 7 \times 10^{-4}$	$0,92 \pm 0,01$
		2,1	3137	$0,042 \pm 9 \times 10^{-4}$	$1,03 \pm 0,02$
		6,3	2717	$0,041 \pm 7 \times 10^{-4}$	$1,01 \pm 0,01$
		18,9	3109	$0,036 \pm 1 \times 10^{-3}$	$0,88 \pm 0,02$
		56,7	3171	$0,024 \pm 1 \times 10^{-3}$	$0,60 \pm 0,02$
		<b>Concentração (µg/ mL)</b>	<b>TC</b>	<b>IM</b>	<b>IMR</b>
NE*		0,7	2375	$0,040 \pm 1 \times 10^{-3}$	$0,98 \pm 0,02$
		2,1	2016	$0,043 \pm 1 \times 10^{-3}$	$1,06 \pm 0,03$
		6,3	2065	$0,044 \pm 1 \times 10^{-4}$	$1,07 \pm 0,03$
		18,9	1899	$0,041 \pm 1 \times 10^{-3}$	$1,01 \pm 0,02$
		56,7	1609	$0,035 \pm 9 \times 10^{-4}$	$0,86 \pm 0,02$

**TCI**= Total de células em intérfase; **IM**= Índice Mitótico e **IMR**= Índice Mitótico Relativo. \* Os valores de concentração são um indicativo de que as NPs encontram-se na mesma diluição das NPs/ATZ e desta forma, não representando a concentração das NPs e do tivo ATZ, uma vez que estas encontram-se sem ativo.



A fim de analisar os efeitos dos tratamentos sobre o índice mitótico foi calculado o índice mitótico relativo (IMR). Os dados estão apresentados na Tabela 5 e na Figura 29.



**Figura 29:** Valores dos índices mitóticos relativos, calculados para os diferentes tratamentos (controle, NPs/ATZ, NPs, ATZ e formulação comercial), obtido a partir das análises das lâminas de *Allium cepa*. Os dados representam a média das análises de três lâminas por tratamento. \* Os valores de concentração são um indicativo de que as NPs encontram-se na mesma diluição das NPs/ATZ e desta forma, não representam a concentração das NPs e do ativo ATZ, uma vez que estas encontram-se sem ativo.

A partir da análise dos valores de IMR, verificou-se que o ativo ATZ possui a tendência de redução do IMR em função do aumento da concentração, no entanto, estes valores não apresentaram alterações significativas ( $p > 0,05$ ). Os tratamentos com as NCs e NEs sem ATZ foram testadas nas mesmas concentrações que as formulações/ emulsões com o ativo ATZ, essas possuem valores de IMR próximo ao valor do controle, indicando que as NPs de PCL não são citotóxicas para este tipo celular (Figura 29).

Bolle e colaboradores (2004), mostraram para o ativo ATZ em concentrações inferiores as testadas neste estudo (0,1 µg/L a 5 µg/L), que com 5 µg/L foi observada redução do IM (BOLLE *et al.*, 2004).

Srivastava & Misha (2009), avaliaram redução do índice mitótico para o ativo ATZ em concentração de 30 1µg/mL quando testados em bulbos de *Allium cepa* expostas por 24 horas. O mesmo efeito foi observado em outros tipos celulares.

Manske e colaboradores (2004) mostram que o ativo ATZ reduz a proliferação celular em células de fibroblastos humanos, mesmo em baixas concentrações. Freeman e colaboradores (2006), em ensaio citotóxico com células de mamíferos, mostraram que o ativo ATZ causa maior citotoxicidade na fase G2 do ciclo celular.

O uso de NPs pode reduzir a citotoxicidade de agroquímicos. Grillo e colaboradores (2012), usando NCs/ATZ de PCL contendo Hb triazínicos, mostraram que a associação de Hb em NPs impediram a redução nos valores de IM em concentrações da ordem de 100 1µg/mL.

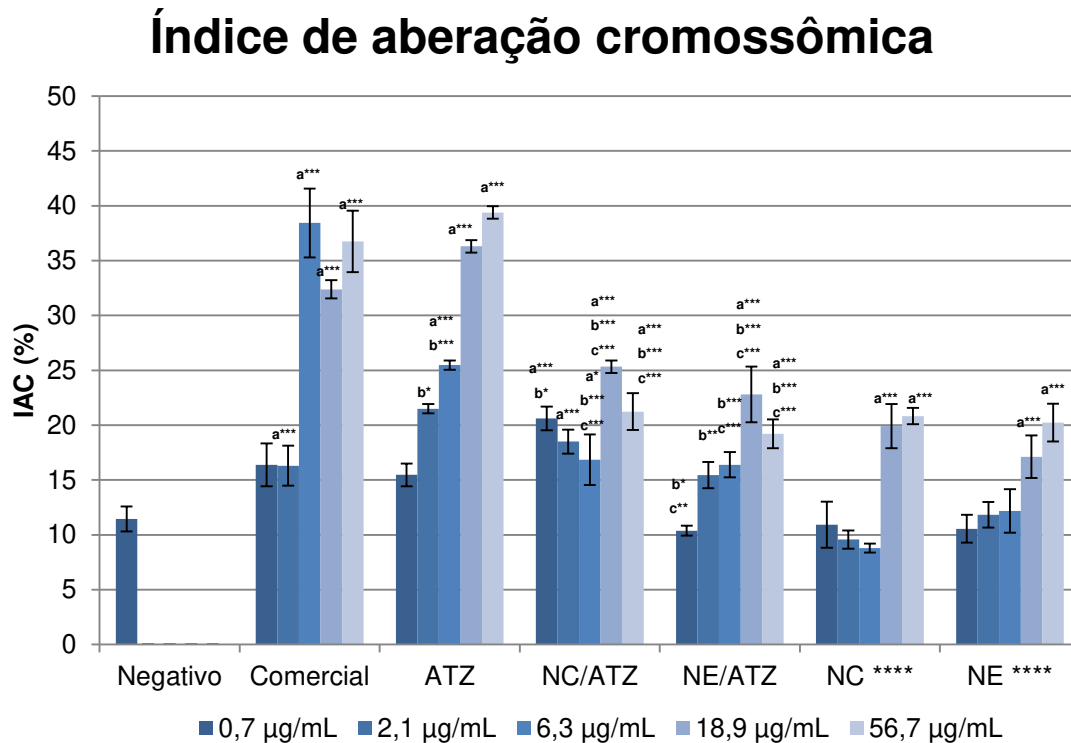
#### **4.6.2 Análise do efeito das formulações sobre o índice de Aberração Cromossômica**

Plantas como a *Vicia faba*, e principalmente *Allium cepa*, têm sido utilizados para estudos dos efeitos de NPs, visando a detecção de genotoxicidade (KUMARI, *et al.*; 2009; PATLOLLA, *et al.*, 2012). Esses sistemas têm importância no monitoramento da poluição ambiental e avaliação do potencial mutagênico de compostos químicos (LEME & MARIN-MORALES, 2009). Desta forma, a análise dos possíveis efeitos genotóxicos das formulações produzidas neste estudo se faz relevante. A Tabela 6 apresenta os resultados de índice de aberração cromossômica, obtidos a partir da análise das lâminas de *Allium cepa* após os diferentes tratamentos.

**Tabela 6:** Resultados obtidos a partir da análise das lâminas de *Allium cepa* para os diferentes tratamentos (controle, NPs/ATZ, ATZ e formulação comercial) em função de diferentes concentrações de ATZ sendo as NPs sem ATZ avaliadas nas mesmas concentrações. Na tabela **TDC** = total de divisão celular; **TAC** = total de aberração cromossômica; **TCI** = total de células em interfase **MT** = mutações; **IAC** = Índice de aberrações cromossômicas. Os valores representam a média da análise de três lâminas.

		Negativo	<b>TDC</b>	<b>TAC</b>	<b>TCI</b>	<b>MT</b>	<b>IAC%</b>
			129	15	2804	0,11±0,01	11,4±1,14
		<b>Concentração (µg/mL)</b>	<b>TD</b>	<b>AC</b>	<b>Células</b>	<b>MT</b>	<b>IAC%</b>
ATZ		0,7	68	11	1628	0,164±0,019	16,4±1,9
		2,1	81	13	2023	0,163±0,018	16,3±1,8
		6,3	60	23	1689	0,384±0,031	38,4±3,1
		18,9	71	23	1587	0,324±0,008	32,4±0,8
		56,7	52	19	1616	0,368±0,028	36,8±2,8
		<b>Concentração (µg/mL)</b>	<b>TD</b>	<b>AC</b>	<b>Células</b>	<b>MT</b>	<b>IAC%</b>
Comercial		0,7	123	19	3201	0,155±0,01	15,5±1,03
		2,1	121	26	3060	0,215±0,004	21,5±0,41
		6,3	90	23	2727	0,255±0,004	25,5±0,42
		18,9	74	27	2208	0,363±0,005	36,3±0,56
		56,7	94	37	2749	0,394±0,005	39,4±0,56
		<b>Concentração (µg/mL)</b>	<b>TD</b>	<b>AC</b>	<b>Células</b>	<b>MT</b>	<b>IAC%</b>
NCs/ATZ		0,7	82	17	3050	0,21±0,010	20,6±1,08
		2,1	76	14	3245	0,19±0,010	18,5±1,09
		6,3	107	18	3251	0,17±0,023	16,9±2,3
		18,9	82	21	2658	0,25±0,005	25,3±0,5
		56,7	151	32	4560	0,21±0,016	21,2±1,6
		<b>Concentração (µg/mL)</b>	<b>TD</b>	<b>AC</b>	<b>Células</b>	<b>MT</b>	<b>IAC%</b>
NEs/ATZ		0,7	115	12	3413	0,10±0,004	10,4±0,44
		2,1	46	7	2750	0,15±0,011	15,4±1,19
		6,3	74	12	3119	0,16±0,011	16,4±1,15
		18,9	110	25	3088	0,23±0,025	22,8±2,5
		56,7	56	11	3277	0,19±0,013	19,2±1,31
		<b>Concentração (µg/mL)</b>	<b>TD</b>	<b>AC</b>	<b>Células</b>	<b>MT</b>	<b>IAC%</b>
NE		0,7	135	15	2661	0,11 ±0,021	10,9 ± 2,1
		2,1	71	7	2692	0,10 ±0,008	9,6 ± 0,8
		6,3	118	10	2912	0,09 ±0,004	8,8 ± 0,41
		18,9	107	21	2869	0,20 ±0,020	19,9 ± 2,0
		56,7	53	11	1696	0,21 ±0,007	20,8 ± 0,7
		<b>Concentração (µg/mL)</b>	<b>TD</b>	<b>AC</b>	<b>Células</b>	<b>MT</b>	<b>IAC%</b>
NC		0,7	86	9	3241	0,11 ± 0,012	10,5± 1,25
		2,1	85	10	3167	0,12 ±0,011	11,8± 1,16
		6,3	99	12	2769	0,12 ±0,019	12,1± 1,9
		18,9	106	18	2552	0,17 ±0,019	17,1± 1,9
		56,7	70	14	3088	0,20 ±0,017	20,2± 1,7

A partir da análise dos dados de aberração cromossômica obtidas pelas análises das lâminas dos diferentes tratamentos, foi realizada uma análise comparativa. Os dados estão apresentados na Figura 30.



**Figura 30:** Índice de aberrações cromossômicas obtidas a partir da análise das lâminas de *Allium cepa* expostas aos diferentes tratamentos (controle, NPs/ATZ, NPs, ATZ e formulação comercial). Foram realizadas análise de três lâminas por tratamento: a) comparação estatística do ativo ATZ, formulação comercial, NCs/ATZ e NEs/ATZ em relação ao controle; b) comparação estatística da formulação comercial, NCs/ATZ e NEs/ATZ em relação à ATZ; c) comparação estatística das NCs/ATZ e NEs/ATZ em relação à formulação comercial. \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$ . \*\*\*\* Os valores de concentração são um indicativo de que as NPs encontram-se na mesma diluição das NPs/ATZ e desta forma, não representam a concentração das NPs e do ativo ATZ, uma vez que estas encontram-se sem ativo.

Ao analisar as formulações em relação ao controle, observa-se que estas apresentaram aumento no IAC em função do aumento da concentração do ativo ATZ. A ATZ e a formulação comercial tiveram aumento no IAC a partir da concentração de 6,3 µg/mL. Já as NCs/ATZ apresentaram efeito em todas as concentrações e as NEs/ATZ a partir de 18,9 µg/mL em relação ao controle. Nas concentrações mais altas as NPs/ATZ apresentam um índice mutagênico em torno de 15% menor, quando comparado a formulação comercial e ao ativo ATZ, indicando que a encapsulação da ATZ nas NPs causaram uma diminuição na genotoxicidade do ativo ATZ. As NPs sem ATZ apresentaram efeito genotóxico a partir da concentração de 18,9 µg/mL o que pode ser somado aos efeitos observados nas NPs/ATZ.

Srivastava & Misha (2009) determinaram que a formulação comercial do ativo ATZ pode apresentar efeito genotóxico em *Allium cepa* em concentrações acima de 30 µg/mL. No entanto, estes autores descrevem que as concentrações necessárias para apresentar o efeito genotóxico em mamíferos teriam que ser maiores do que as encontradas no meio ambiente.

Gammon e colaboradores (2005) demonstraram que a exposição ocupacional à ATZ pode levar a toxicidade e causar neoplasias, bem como causar efeitos no sistema digestivo de organismos devido à conversão de ATZ em N-nitrosoatrazina, composto oncogênico.

Cavas (2011) usou como modelo biológico, para estudo da toxicidade de ATZ, o peixe da espécie *Carassius auratus*. Neste estudo, foram utilizados os ensaios de micronúcleo e cometa, sendo que os resultados mostraram um aumento do dano cromossômicos causado pelo ativo ATZ em função do aumento da concentração.

Nwani (2010) avaliou o uso da espécie de peixe *Channa punctatus*, demonstrando que há aumento da genotoxicidade da ATZ em relação ao aumento do tempo de exposição.

As NPs/ATZ em baixa concentração apresentam efeito no IAC, porém em concentrações mais elevadas reduz este efeito quando comparado ao ativo ATZ e a formulação comercial, tornando-as menos genotóxicas (Figura 30). Desta forma, a redução dos efeitos genotóxicos proporcionado pelo uso das NPs, pode ser uma alternativa mais segura para a utilização deste Hb produzindo assim menores efeitos ao meio ambiente e a saúde humana.

A análise dos dados em relação à ATZ e o produto comercial mostram que, para a maioria das concentrações, estas possuem IAC semelhantes, indicando assim, que ambas possuem um perfil semelhante de efeito genotóxico (Figura 30).

Outros estudos apontam que o uso de NPs para Hb possui potencial de redução dos efeitos genotóxicos. Lima e colaboradores (2012), com a aplicação de microesferas de PHBV e PHB para o Hb ametrina, mostraram que a encapsulação deste ativo reduziu o número de aberrações cromossômicas em resposta ao aumento da concentração do ativo.

Alguns estudos usam índices mutagênicos para ver a interação solo/ Hb, de acordo com estes o aumento de aberrações cromossômicas indica uma maior disponibilidade do Hb para a planta e menor interação deste com o solo (DE MARCO *et al.*, 1995; DE SIMONE *et al.*, 1992). O ensaio apresentado neste trabalho foi realizado em meio aquoso, porém o surgimento de IAC nas NCs/ATZ em menores concentrações pode ser reflexo de uma maior ação genotóxica da ATZ em menores concentrações.



## 5. Conclusões

A partir do presente estudo, foi possível obter informações importantes para o desenvolvimento de sistemas de carreadores de liberação modificada para o Hb ATZ utilizando NPs poliméricas de PCL (NEs e NCs).

Foram observados os seguintes valores de diâmetro hidrodinâmico para as NPs preparadas, sendo para as NCs de 513 nm; NCs/ATZ de 483 nm; NEs de 365 nm e NEs/ATZ de 408 nm. As NPs apresentaram uma alta EE para o ativo ATZ sendo encontrados valores acima de 90%. A encapsulação da ATZ nas NPs causou redução no perfil de liberação do ativo em função do tempo, sendo o mecanismo de liberação da ATZ determinado pelo modelo matemático de Korsmeyer & Peppas do tipo anômalo.

A análise da estabilidade das formulações no período de 90 dias mostrou que a estabilidade das NEs foram maiores que as das NCs em relação às análises de diâmetro hidrodinâmico e PDI. As demais análises de estabilidade como pH e EE apresentaram o mesmo perfil ao longo de 90 dias. Ademais, as análises de FTIR mostraram que os componentes da formulação apresentaram as bandas referentes ao polímero PCL, porém a técnica não foi o suficiente para verificar se houve alterações em função do modo de preparo das NCs e NEs contendo ou não ATZ.

Os ensaios de coluna de solo mostraram que as NCs/ATZ possuem menor mobilidade quando comparado às demais formulações, sendo estes determinados por análises em HPLC e ensaios com o bioindicador (*Brassica sp*). Já os ensaios de genotoxicidade mostraram que todos os tratamentos com ATZ apresentaram efeitos genotóxicos, no entanto, em altas concentrações as NPs/ATZ causaram uma redução na genotoxicidade em 15%.

A utilização de NPs para o carreamento do Hb ATZ se apresenta como sistema promissor, podendo reduzir a concentração aplicada no campo de forma a



manter a mesma atividade Hb com redução de toxicidade e redução da mobilidade do ativo no solo, fazendo assim, com que essas formulações tenham um potencial para minimizar os impactos do uso da ATZ no ambiente.

## 6 Referências

ABU-ZREIG, M.; RUDRA, R.P.; DICKINSON, W.T.; EVANS, L.J. Effects of surfactants on sorption of atrazine by soil. **J. Contain. Hydrol**, v. 36, p. 249-253, 1999.

ACHIM, T. The mode of Action of Triazine Herbicides in Plants. *In*: HOMER LIBERON, JANIS MCFARLAND, ORVIN BURNSIDE. **The triazine herbicides 50 years of revolutionizing Agriculture**. Editora Elsevier, p. 101-110, 2008.

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA-ANVISA. Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos. **Rev. Saúde Pública**, v. 40, n. 2, p. 361-3, 2006.

AGUIAR, T.J.A.; Monteiro, M.S.L. Modelo agrícola e desenvolvimento sustentável: A ocupação do cerrado Piauiense. **Ambient. e Soc.**, v. 8, n. 2, p. 161-178, 2005.

ALMEIDA, W.; FIUZA, J.; MAGALHÃES, C.M.; JUNGER, C.M. Agrotóxicos. **Cad. de Saúde Pública**. v.1, n. 2, p. 220-249,1985.

ALONZO, H.G.A.; CORRÊA, C.L. **Praguicidas**. *In*: Oga, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, p. 437-438, 2003.

ARMAS, E.D.A.; MONTEIRO, R.T.R.; ANTUNES, P.M.; SANTOS, M.A.P.F.; CAMARGO, P.B.; ABAKERLI, R.B. Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do rio Corumbataí e principais afluentes. **Quim. Nova**, v. 30, n. 5, p. 1119-1127.

AU, W.W.; BADARY, O.A.; HEO, M.Y. Cytogenetic assays for monitoring populations exposed to environmental mutagens. **Occup. Med.**, v. 16, p. 345-357, 2001.

AULTON, M. **Dissolution and Solubility**. Pharmaceuticals: the science of dosage from design. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2002

ÁVILA, L.G.; LEITE, S.B.; DICK, D.P. Formulação de atrazina em xerogéis: síntese e caracterização. **Quim. Nova**, v. 32, n. 7, p. 1727-1733, 2009.

BAGATINI, M.D.; SILVA, A.C.F.; TEDESCO, S.B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, p. 444–447, 2007.

BARCHANSKA, H.; JODO, E.; PRICE, R.G.; BARANOWSKA, I.; ABU-KNESHA, R. Monitoring of atrazine in milk using a rapid tube-based ELISA and validation with HPLC. **CHEMOSPHERE**, v. 87, p. 1330-1334, 2012.

BEDDINGTON, J. Food Security: contributions from science to a new and greener revolution. **Phil. Trans. Soc.**, v. 365, p. 61-71, 2010.

BEHERA, A.K.; BARIK, B.B.; PANDYA, S.; JOSHI, S. Formulation and evaluation of Isoniazid loaded- $\Sigma$ -polycaprolactone nanoparticles. **J. Pharm Res.**, v. 5, n. 2, p. 798-802, 2012.

BOLLE, P.; MASTRANGELO, S.; TUCCI, P.; EVANDRI, M.G. Clastogenicity of atrazine assessed with the *Allium cepa* test. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 43, n. 2, p. 137-131, 2004.

BORTOLUZZI, E.C.; RHEINHEIMER, D.S.; GONÇALVES, C.S.; PELLEGRINE, J.B.R.; ZANELLA, R.; COPETTI, A.C.C. Contaminação de águas superficiais por agrotóxicos em função do uso do solo numa microbacia hidrográfica de Agudo-RS. **Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambient.** v. 10, n. 4, p. 881-887, 2006.

BOTELHO, R.G.; SANTOS, J.B.; OLIVEIRA, T.A.; BRAGA, R.R.; BYRRO E.C.M. Toxidade aguda de herbicidas a tilápia (*Oreochromis niloticus*). **Planta Daninha**. v. 27, n. 3, p. 621-626, 2009.

BRANCALION, P.H.S.; ISERNHAGEM, I.; MACHADO, R.P.; CHISTOFFOLETI, P.J.; RODRIGUES, R.R. Seletividade do herbicida setoxidim, isoxaflutol e bentazon a espécies arbóreas nativas. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 44, n. 3, p. 251-257, 2009.

BREGA, S.M.; VASSILIEFF, L.; ALMEIDA, A.; MERCADANTE, A.; BISSACOT, D.; CURY, P.R.; FREIRE-MAIA, D.V. Clinical, cytogenetic and toxicological studies in rural workers exposed to pesticides in Botucatu, São Paulo, Brasil. **Cad. Saude Pública**, v. 14, n. 3, p. 109-115, 1998.

BRIGHENTI, A.M.; MORAES, B.J.; OLIVEIRA Jr, R.S.; GAZZIERO, D.L.P.; VOLL, E.; GOMES, A.J. Persistência e fitotoxicidade do herbicida atrazina aplicado

na cultura de milho sobre a cultura do girassol em sucessão. **Planta Daninha**, v. 20, n. 2, p. 291-297, 2002.

BRINK, C.B. Studies on cellular resilience and adaptation following acute and repetitive exposure to ozone in cultured human epithelial (HeLa) cells. **Redox. Rep.**, v. 13, p. 87–100, 2008.

BRITTO, F.B.; VASCO, A.N.; PEREIRA, A.P.S.; MÉLLO-JUNIOR, A.V.; NOGUEIRA, L.C. Herbicidas no alto Rio Poxim, Sergipe e os riscos de contaminação dos recursos hídricos. **Rev. Ciênc. Agron.**, v. 43, n. 2, p. 390-398, 2012.

BYUN, Y.; HWANG, J.B.; BANG, S.H.; DARBY, D.; COOKSEY, K.; DAWSON, P.L.; PARK, H.J.; WHITESIDE, S. Formulations and characterization of  $\alpha$ -tocopherol loaded poly- $\epsilon$ -caprolactone. **LWT-Food SCI Technol.**, v. 44, p. 24-28, 2011.

CAMPBELL, M.K.; FARREL, S.O. Fotossíntese In: **Bioquímica**. Ed 5, Editora Thomson, p. 717-741, 2007.

CAVAS, T. In vivo genotoxicity of atrazine and atrazine-based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleous test and comet assay. **Food Chem. Toxicol.**, v. 49, n. 6, p. 1431-1435, 2011.

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. **R.C. Suelo Nutr. Veg.**, v. 1, n. 10, p. 62-67, 2010.

CEJUDO-ESPINOSA, E.; VELÁZQUEZ-ZEPEDA, A., RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R. Adsorption of atrazine in circular sections of roots of three wetlands plants. **Rev. Mex. Ing. Quím.**, v. 8, n.1, p. 35-39, 2009.

CHAVANPATIL, M. D.; DHDAIR, A.; PATIL, Y.; HANDA, H.; MAO, G.; PANYAN, J. Polymer-surfactant nanoparticles for sustained release of water-soluble drugs. **Pharma Sci.**, v. 96, n. 6, p. 3379-89, 2007.

CHEN, H.; YADA, R. Nanotechnologies in agriculture: New tools for sustainable development. **Trends in Food Sci. Technol.**, v. 22, p. 585-594, 2011.

CHENG-TENG, N.G.; LI, J.J.; BAY, B.H.; YUNG, L.Y.L. Current studies into the genotoxic effects of nanomaterial. **J. Acid Nucleic**, 2010, Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2946614/>> Acesso em: 11 de fev 2013.

COLEN, D.J. Detoxification and activation of agrochemical in plants. **Pestic. Sci.**, v. 42, p. 209-222, 1994.

COPATTI, C.E.; GARCIA, L.O.; BALDISSEROTO, B. Uma importante revisão sobre o impacto de agroquímicos da cultura de arroz em peixes. **Biota Neotrop.**, v. 9, n. 4, p. 235-242, 2009.

CORREIA, F.V.; LANGENBACH, T. Dinâmica da distribuição e degradação de atrazina em argissolo vermelho-amarelo sob condições de clima tropical úmido. **Rev. Bras. Ciênc. Solo.**, v. 30, n 1, p. 183-192, 2006.

CORREIA, F.V.; LANGENBACH, T.; CAMPOS, T.M. Avaliação de transporte de atrazina em solos sob diferentes condições de manejo agrícola. **R. Bras. Ciênc. Solo**, v. 34, p. 525-534, 2010.

COSTA, P.; LOBO, J.M.S. Modeling and comparison of dissolutions profiles. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 13, n. 2, p. 123-133, 2001.

COUTINHO, C.F.B; TANIMOTO, S.T.; GALLI, A.; GARBELLINE, 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: R. de Ecotox. Meio Ambiente**, v. 15, n. 0, p. 65-62, 2005.

CURWIN, B.D.; HEIN, M.J.; BARR, D.B.; Striley, C. Comparison of immunoassay and HPLC-MS/MS used to measure urinary metabolites of atrazine, metolachlor, and chlorpyrifos from farmers and non-farmers in IOWA. **J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol**, v. 20, n. 2, p. 205-212.

DAN, H.A.; BAROSSO, A.L.L; PROCÓPIO, S.O.; DAN, L.G.M.; FINOTTI, T.R.; ASSIS, R.L. Seletividade de atrazina à cultura de milho (*Penissetun glaucum*). **Planta Daninha**, v. 28, p. 1117-1124, 2010.

DAN, H.A.; BARROSO, A.L.L.B.; FINOTTI, T.R.; DAN, L.G.M.; ASSIS, R.L. Tolerância do cultivar de milho ADR-300 ao herbicida atrazina. **Rev. Ciênc. Agron.**, v. 42, n. 1, p. 193-198, 2011.

DE JONG, W.H.; BORM, P.J.A. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. **Int. J. Nanomedicine**, v. 3, n. 2, p. 133-149, 2008.

DE MARCO, A.; DE SIMONE, C.; RAGLIONE, M.; LORENZONI, P. Influence of soil characteristics on the clastogenic activity of maleic hydrazide in roots tips of *Vicia faba*. **Mutat. Res.**, v.354, p 5-12, 1995.

DE MARIA, C.A.B; MOREIRA, R.F.A. Cafeína: Revisão sobre métodos de analise. **Quim. Nova**, v. 30, n. 1, p. 99-105, 2007.

De SIMONE, C.; PICCOLO, A.; De MARCO, A. Genotoxic effect induced by herbicides atrazine glyphosate in plants of *Vicia faba* grown in different soils. **Sci. Total Environ.**, v. 123/124, p. 233-140, 1992.

DELMONTE, A.A.; BEDMAR, F.; MATECÓN, J.D.; ECHEVERRÍA, H., BARASSI, C.A. Persistence of the biocide activity of atrazine in soils of the south-east of Buenos Aires province. **Planta Daninha**, v. 14, n. 2, p.110-117. 1996.

DICK, D.P.; MARTINAZZO, R.; KNICKER, H.; ALMEIDA, P.S.G. Matéria Orgânica em quatro tipos de solos brasileiros: Composição química e sorção de atrazina. **Quím. Nova**, v. 33, n. 1; 2010.

ELZEIN, T.; NASSER-EDDINE, M.; DELAITE, C.; BISTAC, S.; DUMAS, P. FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces. **J. Colloid. Interface Sci.**, v. 237, n. 2, p. 381-387, 2004.

FARIA, N.M.X.; FASSA, A.G.; FACCHINI, L.A. Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos. **Ciênc. Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 25-38, 2007.

FERREIRA, E.A.; PROCÓPIO, S.O.; SILVA, E.A.M; SILVA, A.A.; RUFINO, R.J.N. Estudos anatômicos de folhas de plantas daninhas. *L-Nicandra phisaloides*, *Solanum viarum*, *Solanum americanum* e *Raphanus raphanistrum*. **Planta Daninha**, n. 2, p. 159-167, 2002.

FISKESJO, G. The *Allium* Test II: Assessment of chemical's genotoxic potential by recording aberrations in chromosomes and cell divisions in root tips of *Allium cepa* L. **Environ. Toxicol. Water. Qual.**, v. 9, p. 234-241, 1994.

FISKESJO, G. The *Allium* test in: wastewater monitoring. **Environ. Toxicol. Water Qual.**, v.8, p. 291-298, 1993.

FORMARIZ, T.P.; CHIAVACCI, L.A.; SARMENTO, V.H.V.; SANTILLI, C.V.; EGITO, E.S.T.; OLIVEIRA, A.G. Relationship between structural features and in

vitro release of doxorubicin from biocompatible anionic microemulsion. **Colloids Surf. B.**, v. 60, n. 1, p. 28-35, 2007.

FREEMAN, J.L.; RAYBURN, A.L. Aquatic herbicides and herbicides contaminants: in vitro cytotoxicity and cell-cycle analyses. **Environ. Health Persp.** v. 21, n. 3, p. 256-263, 2006.

FUTAKAMI, M. Novel mutation assay with high sensitivity based on direct measurement of genomic DNA alterations: comparable results to the Ames test. **J. Biochem.**, v. 141, p. 675-686, 2007.

GALEMBECK, F; SANTOS, A.C.M.; SCHUMACHER, H.C.; RIPPEL, M.M.; ROS-SETO, R. Industria Química: Evolução Recente, problemas e oportunidades. **Quim. Nova**, v. 30, n. 6, p. 1413-1419, 2007.

GAMMON, D.W.; ALDOUS, C.N.; CARR, W.C.; SANBORN, J.R.; PFEIFER, K.F. A risk assesement of atrazine use in California: human health and ecological aspects. **Pest. Manag. Sci.**, n. 61, v. 4, p. 331-355, 2005.

GARBELLINI, G.S.; PEDROSA, V.A; SALAZAR-BANDA, G.R.; AVACA, L.A. Metodologias eletroanalíticas para a determinação de herbicidas triazínicos por voltametria de onda quadrada e técnicas de deconvolução. **Quim. Nova**, v. 30, n. 8, p. 2025-2034, 2007.

GARCIA. M.; FORBE, T.; GONZALES, E. Potential application of nanotechnology in the agro-food sector. **Ciênc. Tecnol. de Aliment.**, v. 30, n. 3, p. 573-581, 2010.

GARCIA, E.G.;BUSSACOS, M.A.; FISCHER, F.M. Impacto da legislação no registro de agrotóxicos de maior toxicidade no Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v. 39, n. 5, p. 832-839, 2005.

GOMES JR, F.G.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Biologia e manejo de plantas daninhas em áreas de plantio direto. **Planta Daninha**, v. 26, n 4, p. 789-798, 2008.

GRAYMORE, M.; STAGNITTI, F.; ALLINSON, G. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. **Environ. International**, v. 26, n. 7-8, p. 483-485, 2001.

GRILLO, R. Desenvolvimento de sistemas de liberação modificada para herbicidas triazínicos utilizando nanocápsulas poliméricas. 2011, 103f, **Dissertação de mestrado**, Instituto de Biologia, UNICAMP, 2011.

GRILLO, R.; PEREIRA, A.E.S.; MELO, N.F.S.; PORTO, R.M.; FEITOSA, O.L.; TONELLO, P.S.; FILHO, N.L.D.; ROSA, A.H.; LIMA, R.; FRACETO, L.F. Controlled release system for ametryn using polymer microspheres: Preparation, characterization and release kinetics in water. **J. Hazard. Materials**, v. 186, p. 1645-1651, 2011.

GRILLO, R.; SANTOS, N.Z.P.; MARUYAMA, C.R.; ROSA, A.H.; LIMA, R.; FRACETO, L.F. Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) nanocapsules as carrier systems for herbicides: Physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. **J. Hazard. Materials**, v. 231-232, p. 1-9, 2012.

GRILLO, R.; MELO, N.F.S.; LIMA, R.; LOURENÇO, R.W.; ROSA, A.H.; FRACETO, L.F. Characterization of Atrazine-loaded Biodegradable Poly-(hydroxybutyrate-co-hydroxivalerate) microspheres. **J. Polym. Environ.**, v. 18, p. 26-32, 2010.

GUILLETE Jr, L.J.; IGUCHI, T. Life in contaminated world. **Scienc.**, v. 337, p. 1614-1615, 2012.

GUIMARÃES, G.L. Impactos ecológicos do uso de herbicidas ao meio ambiente. **Série Técnica IPEF**, v. 4, n. 12, p. 159-180, 1987.

GUTERRES, S.S.; FESSI, H.; BARRATT, G.; DEVISSAGUET, J-P.; PUISIEUX, F. Poly (D-L lactide) nanocapsules containing diclorofenac: L. Formulation and stability study. **Int. J. Pharm.**, v. 113, p. 57-63, 1995.

HARRIS, D.C. Análise química quantitativa. 5 ed. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e científicos, 2011.

HAYES, T.; HASTON, K.; TSUI, M.; HOANG, A.; HAEFFELE, C.; VONK, A.A.R.O.N. Feminization of male frogs in the wild brief communications. **Nature**, v. 419, p. 895-896, 2002.

HERNÁNDEZ-GARCIA, M.; MORGANTE, V.; PEREZ, M. Á.; BIAGGINI, P. V., NOÉ, P.M.; VERGARA, M. G.; Novels-triazine-degrading bacteria isolated from agricultural soils of central Chile for herbicide bioremediation. **Electron. J. Biotechn.** 2008. Disponível em: <<http://www.ejbiotechnology.info>> Acesso em: 24 out. 2012.



HERNANDEZ, D.D.; ALVES, P.L.C.; PAVANI, M.C.M.; PARREIRA, M.C. Períodos de interferência de Maria Pretinha sobre o tomateiro industrial. **Hortic. Bras.**, v. 25, n. 2, p. 199-204, 2007.

INOUE, M.H.; SANTANA, C.T.C; OLIVEIRA JR., R.S.; POSSAMAI, A.C.S.; SANTANA, D.C.; ARRUDA, R.A.D.; DALLACORT, R.; SZTOLTZ, C.L. Efeito residual de herbicidas aplicados em pré emergência em diferentes solos. **Planta Daninha**, v. 29; n. 2, p. 429-435, 2011.

JAIN, R.A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. **Biomaterial**, v. 21, p. 2475-2490, 2000.

JARDIM, A.N.O.; CALDAS, E.D. Brazilian monitoring programs for pesticides residues in food. **Food Control.**, v. 25, p. 607-616, 2012.

JAVARONI, R.C.A.; LANDGRAF, M.D.; REZENDE, M.O.O. Comportamento dos herbicidas atrazina e alaclor aplicados em solos preparados para o cultivo de cana-de-açúcar. **Quim. Nova**, v. 22, n. 1, p. 58-64, 1999.

KHAN, K.A.; RHODES, C.T. The concept of dissolution efficiency. **J. Pharm. Pharmacol**, v. 27, p. 48-49, 1975.

KHOEE, S.; YAGHOBIAN, M. An investigation into the role of surfactants in controlling particle size of polymeric nanocapsules containing penicillin-G in double emulsion. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 44, p. 2392-2399, 2009.

KLAINE, S.J.; ALVAREZ, P.J.J.; BATLEY, G.E.; FERNANDES, T.F.; HANDY, R.D.; LYON, D.Y.; MAHENDRA, S.; McLAUGHLIN, M.J.; LEAD, J.R. Nanomaterials in environment: Behavior, fate, bioavailability and effects. **Environ. Toxicol Chem.**, v. 27, n. 9, p. 1825-1851, 2008.

KORSMEYER, R.W.; GURNY, R; DOELKER, E.; BURI, P.; PEPPAS, N.A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **Int. J. Pharm.**, v. 15, p. 25-35, 1983.

KROVAC Jr., M.F. Regulatory aspects of bound residues (chemistry). **Residue Rev.**, v.97, p.1-17, 1986.

KUMARI, M.; MUKHERJEE, A.; Chandrasekaran, N. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. **Sci. Total Environ.**, v. 407, n. 19, p. 5243-5246, 2009.

LANDSIEDEL, R.; KAPP, M.D.; SCHULZ, M.; WIENCH, K.; OESCH, F. Genotoxicity investigation on nanomaterials: Methods, preparation and characterization of test materials, potential, artifacts and limitation - Many questions, some answers. **Mutat. Res.**, v. 681, n. 2-3, p. 241-258, 2009.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its applications. **Mutat. Res.**, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.

LEMOINE, D.; FRANCOIS, C.; KEDZIEREWICZ, F.; PREAT, V.; HOFFMAN, M.; MAINCENT, P. Stability study of nanoparticles of poly( $\epsilon$ -caprolactone), poly(D-L-Lactide), and poly(D,L-lactide-co-glycolide). **Biomaterials**, v. 17, p. 2191-2197, 1996.

LI, B.; HU, R.; CHENG, Z.; XIE, Y.; GUI, S.; SUN, Q.; SANG, X.; GONG, X.; GUI, Y.; SHEN, W.; HONG, F. Titanium dioxide nanoparticles relieve biochemical disfunctions of fifth-instar larvae of silkworms following exposure to phoxim insecticide. **Chemosphere**, v. 89, n. 5, p. 609-614, 2012.

LI, X.; WU, T.; HUANG, H.; ZHANG, S. Atrazine accumulation and toxic responses in maize *Zea Mays*. **J. Environ. Sci.**, v. 24, n. 2, p. 203-208, 2012.

LIU, Y.; TONG, Z.; PRUD'HOMME, R.K. Stabilized polymeric nanoparticles for controlled and efficient release of bifenthrin. **Pest. Manag. Sci.**, v. 64, n. 8, p. 808-812, 2008.

LOBO, F.A.; 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 characterizations, and in vitro release studies. **Polym. Bull.**, v. 67, p. 479-495, 2011.

LOHA, K.M.; SHAKIL, N.A.; KUMAR, J.; SINGH, M.K.; SRISVASTAVA, C. Bio-efficacy evaluation of nanoformulations of  $\beta$ -cyfluthrin against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera bruchidae). **J. Environ. Sci. Health B**, v. 47, n. 7, p. 687-691, 2012.

LOPES, C.M.; LOBO, J.M.S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 41, n. 2, 2005.

MA, T. H. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutat. Res.**, v. 334, p. 185-195, 1995.

MACHADO, R.F.; BARROS, A.C.S.A.; ZIMMER, P.J.; AMARAL, A.S. Reflexos do mecanismo de ação de herbicidas na qualidade fisiológica de sementes e na atividade enzimática em plântulas de arroz. **Rev. Bras. Sementes**, v. 28, n. 3, p. 151-160, 2006.

MALDANER, L.; JARDIM, I.C.S.F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Quim. Nova**, v. 33, n. 7, p. 1559-1568, 2010.

MALDANER, L.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Quim. Nova**, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.

MANSK, M.K.; BELTZ, L.A.; DHANWADA, K.R. Low-level atrazine exposure decrease cell proliferation in human fibroblasts. **Arch. Environ Contam. Toxicol.**, v. 46, n. 4, p. 438-444, 2004.

MARTINAZZO, R.; DICK, D.P.; HIRSCH, M.M.; LEITE, S.B. Sorção de atrazine e mesotriona em latossolos e estimativa do potencial de contaminação. **Quim. Nova**, v. 34, n. 8, p. 1378-1384, 2011.

MATEUCA, R.; LOMBAERT, N.; AKA, P.V.; DECORDER, I.; KIRSCH-VOLDERS, M. Chromosomal changes: induction, detection methods, and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, v. 88, p. 1515-1531, 2006.

MCNEIL, S.C. Nanotechnology for the biologist. **J. of Leukocyte Biol.**, v. 78, p. 585-594, 2005.

MEDEIROS, B.G.S; PINHEIRO, A.C.; TEXEIRA, J.A.; VICENTE, A.A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G. Polysaccharide/ protein Nanomultilayer coatings: construction, characterization and evaluation of their effect on "Rocha" pear (*Pyrus communis* L.) shelf-life. **Food Bioprocess Tech.**, v. 5, n. 6, 2435-2445, 2011.

MELO, N.F.S.; GRILLO, R.; ROSA, A.H.; FRACETO, L.F.; DIAS-FILHO, N.L.; DE PAULA, E. Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de poli(L-Lactídeo) contendo benzocaína. **Quim. Nova**, v. 33, n. 1, p.65-69, 2010.

MILHOME, M.A.L.; SOUZA, D.O.B.; LIMA, F.A.F.; NASCIMENTO, R.F. Avaliação do potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas aplicados na agricultura do baixo Jaguaribe, C.E. **Eng. Sanit. Ambient.**, v. 14, n. 3, p. 363-372, 2009.

Ministério da Agricultura e Meio Ambiente. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. **Agrofite**. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br>> Acesso em 24 out. 2012.

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

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

MÜLLER, R.H.; RADTKE, M.; WISSING, S.A. Nanostructure lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. **Int. J. Phar.** v. 243, p. 121-128, 2002.

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

NATARAJAN, A. T. Chromosome aberrations: past, present and future. **Mutat. Res.**, v. 504, p. 3-16, 2002.

NWANI, C.D.; LAKRA, W.S.; NAGPURE, N.S.; KUMAR, R.; KUSHWAHA, B.; SRIVASTAVA, S.K. Toxicity of the herbicide atrazine: Effects on lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in the freshwater fish *Channa Punctatus* (Bloch). **Int. J. Environ. Res. Public Health.**, v. 7, n. 8, p. 3298-3312, 2010.

OLIVEIRA, M.F.; COLONNA, I.; PRATES, H.T.; MANTOVANI, E.C.; GOMIDE, R.L.; JUNIOR, R.S.O. Sorção do herbicida imazaquim em latossolo sob platío direto convencional. **Pesq. Agropec. Bras.**, n. 8, p. 787-793, 2004.

OLIVEIRA, S.M.; GOMES, T.C.C. Contaminação de agrotóxicos em população de área urbana: Petrópolis. Rio de Janeiro. **Cad. de Saúde Pública**. v. 6, n. 1, p. 18-26, 1990.

PACHECO, A.O.; HACKEL, C. Instabilidade cromossômica induzida por agroquímicos em trabalhadores rurais na região de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 18, n. 6, p. 1675-1683. 2002.

PATLOLLA, A.K.; BERRY, A.; MAY, L.; TCHOUNWOU, P.B. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Vicia Faba*: a pilot study on the environmental monitoring of nanoparticles. **Int. J. Environ. Res. Public. Health**, v. 9, n. 5, p. 1649-1662, 2012.

PAULA, H.C.B.; OLIVEIRA, E.F.; ABREU, M.S.; PAULA, R.C.M.; MORAIS, S.M.; FORTE, M.M.C. Esferas (Beads) de alginado como agente encapsulante de óleo de cróton *Zehntneri pax et hoffm.* **Polimeros**, v. 20, n. 2, p. 112-120, 2010.

PEDLOWSKI, M.A.; CANELA, M.A.; TERRA, M.A.C.; FARIA, R.A.M. Modes of pesticides utilization by Brazilian smallholders and their implications for human health and the environment. **Crop. Protection**, v. 31, p. 113-118, 2012.

PEIXOTO, M.F.S.P.; LAVORENTI, A.; REGITANO, J.B.; TORNISIELO. Degradação e formação de resíduos ligados de <sup>14</sup>C-atrazina em latossolo vermelho escuro e glei húmico. **Sci. Agric.**, v. 57, n. 1, Disponível em <<http://www.scielo.br/>> Acesso em 08 nov. 2012.

PEREIRA, A.E.S.; SANTOS, N.Z.P.; LIMA, R.; FRACETO, L.F. Análise citogenética em trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos. **Bioikos**, v. 24, n. 1, p. 57-72, 2002.

PERES, F.; MOREIRA, J.C. Saúde e ambiente em relação com o consumo de agrotóxicos em um polo agrícola do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 23, p. S621-S662, 2007.

PITELLI, R.A. Competição e controle das plantas daninhas em áreas agrícolas. **Série Técnica IPEF**, v. 4, n. 12, p. 1-24, 1987.

POPAT, A.; LIU, J.; HU, Q.; KENNEDY, M.; PETERS, B.; LU, G.Q.; QIAO, S.Z. Adsorption and release of biocides with mesoporous silica nanoparticles. **Nanoscale**, v. 4, n. 3, p. 970-975, 2012.

QUINA, F. Nanotecnologia e o meio ambiente: Perspectiva e riscos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 6, p. 1028-1029, 2004.

RADOSEVICH, M.; TRAINA, S. J.; TUOVINEN, O.H. Atrazine mineralization in laboratory-aged soil microcosms inoculated with s-triazine-degrading bacteria. **J. Environ. Qual.**, v. 26, p. 206-214, 1997.

RAMOS, S.F.; MARTINS, R.; DULLEY, R.D.; ASSUMPÇÃO, R.; NOGUEIRA, E.A.; JUNIOR, S.N.; BARBOSA, M.Z.; LACERDA, A.L.S. Reflexões acerca

das nanotecnologias e as novas densidades técnicas-científicas-informacionais na agricultura. **Estud. Soc.**, v. 17, n. 34, p. 313-326, 2009.

RAO, J.P.; GECKELER, K.E. Polymer nanoparticles: Preparations techniques and size-control parameters. **Adv. Polim. Sci.**, n. 36, p. 887-913, 2011.

REDIGUIERI, C.F. Study on the development of nanotechnology in advanced countries and in Brazil. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 45, n. 2, 2009.

REY, L. **Dicionário de Termos Técnicos de Medicina e Saúde**, 2ª Ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2003.

RIBEIRO, M.L.; LOURENCETTI, C. Contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: Avaliação preliminar. **Quim. Nova**, v. 30, n. 3, p. 688-694, 2007.

RITGER, P.; PEPPAS, N.A. A simple equation for description of solute release. II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **J. Control Release**, v. 5, p. 37-42, 1987.

RODRIGUES, W. Valoração econômica dos impactos ambientais de tecnologias de plantios em região de Cerrados. **Rev. Sociol. Rural**, v. 43, n. 1, p. 135-153, 2005.

RODRIGUES, W. Valoração econômica dos impactos ambientais de tecnologias de plantio em região de cerrados. **Rev. Econ. Sociol. Rural.**, v. 43, n. 1, p. 135-152, 1999.

SÁNCHEZ-VERDEJO, T.; UNDABEYTIA, T.; NIR, S.; VILLAVERDE, J.; MAQUEDA, C.; MORILLO, E. Environmentally friendly formulations of alachlor and atrazine: preparation, characterization, and reduced leaching. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 10192-10199, 2008.

SARKAR, D.J.; KUMAR, J.; SHAKIL, N.A.; WALIA, S. Release kinetics of controlled release formulations of thiamethoxam employing nano-ranged amphiphilic PEG and diacid based block polymers in soil. **J. Environ Sci. Health A. Tox. Hazard Subst. Environ Eng.** v. 47, n. 11, p. 1701-1712, 2012.

SATICHIVI, N.M.; WAX, L.M.; STOLLER, E.W.; BRISKIN, D.P. Absorption and translocation of glyphosate isopropylamine and trimethylsulfonium salts in *Abutilon theophrasti* and *Setaria faberi*. **Weed Sci.**, v. 48, n. 6, p. 675-679, 2000.

SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L.L.; POHLMANN, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quim. Nova**, n. 5, p. 726-737, 2003.

SILVA, C.G.A., COLLINS C.H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Quim. Nova**, v. 34, n. 4, 2011.

SILVA, J.F.; SILVA, J.F.; FERREIRA, L.R.; FERREIRA, F.A. Herbicida: absorção, translocação, metabolismo, formulação e misturas. *In*: Silva, A.A.; Silva, J.F. **Tópicos em manejo de plantas daninhas**. Viçosa: Ed. Universidade Federal de Viçosa, p. 149-188, 2007.

SILVA, J.M.; NOVATO-SILVA, E.; FARIA, H.P; PINHEIRO, T.M.M. Agrotóxico e trabalho: Uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. **Ciênc. saúde coletiva**, v. 10, n. 4, p. 891-903, 2005.

SILVA, M.S.; COCENZA D.S.; MELO, N.F.S.; GRILLO; R.; ROSA, A.H.; FRACETO; L.F. Nanopartículas de Alginato como sistema de liberação para o herbicida Clomazone. **Quím. Nova**, v. 33, n. 9, p. 1868-1673, 2010.

SILVA, M.S.; COCENZA, D.S.; ROSA, A.H.; FRACETO, L.F. Efeitos da associação do herbicida clomazone a nanoesferas de alinato/quitosana na sorção de solos. **Quím. Nova**, v. 35, n. 1, p.102-107, 2012.

SILVEIRA, J.M.F.J.; BORGES, I.C.; BUAINAIN, A. M. Biotecnologia e agricultura da ciência e tecnologia aos impactos da inovação. **São Paulo em Perspec.**, v. 19, n. 2, p. 101-114, 2005.

SIQUEIRA, S.L.; KRUSE, M.H.L. Agrotóxicos e saúde humana, contribuição dos profissionais de saúde. **Rev. Esc. Enferm USP**, v.42, n. 3, p. 584-590, 2008.

SONG, C.X.; LABHASETWAR, V.; MURPHY, H.; QU, X.; HUMPHREY, W.R.; SHEBUSKI, R.J. Formulation and characterization of biodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery. **J. Controlled Release**, v. 43, p. 197-212, 1997.

SOPEÑA, F.; MAQUEDA, C.; MORILLO, E. Controlled release formulation of herbicides based on micro-encapsulation. **Cien. Inv. Agr.**, n. 35, v. 1, p. 27-42, 2009.

SOUTO, E.B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M.H.A. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir da polimerização de monômeros- Parte I. **Polímeros**, v. 22, n. 1, p. 96-100, 2012.

SOUZA, A.; MEDEIROS, A.R.; SOUZA, A.C.; WINK, M.; SIQUEIRA, I.R.; FERREIRA, M.B.C.; FERNANDES, L.; HIDALGO, M.P.L.; TORRES, I.L.C. Avaliação do impacto da exposição de agrotóxicos sobre a saúde de população rural. Vale do Taquari (RS, BRASIL). **Ciênc. Saúde Coletiva**, v. 16, n. 8, p. 3519-3520, 2011.

SOUZA, P.M.S.; LOBO, F.A.; ROSA, A.H.; FRACETO, L.F. Desenvolvimento de nanocápsulas de poli- $\epsilon$ -caprolactona contendo o herbicida atrazina. **Quím. Nova**, n. 1, p. 132-137, 2012.

SRIVASTAVA, K.; MISHA, K.K. Cytogenetic effects of commercially formulated atrazine on the somatics cells of *Allium cepa* e *Vicia faba*. **Pestic. Biochem. Physiology**, v. 93, p. 8-12, 2009.

TRIGO, C.; KOSKINEN, W.C.; CELIS, R.; SADOWSKY, M.J.; HERMOSÍN, M.C.; CORNEJO, J. Bioavailability of organoclay formulations of atrazine in soil. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 58, n. 22, p. 11857-11863, 2010.

UETA, J.; PEREIRA, N.L.; SHUHAMA, L.K.; CERDEIRA, A.L. Biodegradação de herbicidas e biorremediação: microrganismos degradadores de herbicidas atrazina. **Biotecnologia**, v. 10, p. 10-13, 1999.

VASCONCELOS, F.C.W.; NÓBREGA, J.C.A.; GUERREIRO, M.C.; JESUS, E.A.; JULIÃO, L.G.F.; CURI, N. Mobilidade do herbicida atrazina em amostras de latossolos vermelhos sob calagem e adubação fosfatada. **Pesticidas: R. Ecotoxicol e Meio Ambiente**, v. 18, p. 133-146, 2008.

VEIGA, M.T. Agrotóxicos: eficiência econômica e injustiça socioambiental. **Ciênc. Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 145-152, 2007.

WANYIKA, H.; GATEBE, E.; KIONI, P.; TANG, Z.; GAO, Y. Mesoporous silica nanoparticles carrier for urea: potential applications in agrochemical delivery systems. **J. Nanosci. Nanotechnol.**, v. 13, n. 13, p. 2221-2228, 2012.

XU, J.; WANG, Y.; LI, Y.; YANG, X.; ZHANG, P.; HOU, H.; SHI, Y.; SONG, C. Inhibitory Efficacy of intravitreal dexamethasone acetate-loaded PLGA nanopar-



ticles on choroidal neovascularization in a laser-induced rat model. **J. Ocul. Pharmacol.**, v. 23, n. 6, 527-539, 2007.

ZEIGLER, R.S.; MOHANTY, S. Support for international agricultural research: current status and future challenges. **N. Biotechnol.**, v. 27, n. 5, p. 566-572, 2010.

ZHAO, G.; SONG, S.; WANG, C.; WU, Q.; WANG, Z. Determination of triazine herbicides in environmental water samples by high-performance liquid chromatography using graphene-coated magnetic nanoparticles as adsorbent. **Anal. Chim. Acta**, v. 708, p. 155-159, 2011.