

ESCOLA POLITÉCNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS
DOUTORADO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

MARTHA BEATRIZ HORN

**NANO-MICROENCAPSULAMENTO POR PRECIPITAÇÃO POLIMÉRICA DO ÓLEO DE NIM:
CARACTERIZAÇÕES E APLICAÇÕES PARA O CONTROLE DE ÁCARO *Tetranychus
Urticae* (ACARI: TETRANYCHIDADE)**

Porto Alegre

2019

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

Ficha Catalográfica

H813n Horn, Martha Beatriz

Nano-microencapsulamento por precipitação polimérica do óleo de Nim
caracterizações e aplicações para controle do ácaro *Tetranychus*
urticae (ACARI Tetranychidae) / Martha Beatriz Horn . – 2019.
138.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia e
Tecnologia de Materiais, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Marçal José Rodrigues Pires.

Co-orientadora: Profa. Dra. Simone Stülp.

1. Nanoprecipitação. 2. Polímeros biodegradáveis. 3. Óleo de Nim. 4.
Tetranychus urticae. I. Pires, Marçal José Rodrigues. II. Stülp, Simone. III.
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Salete Maria Sartori CRB-10/1363



**NANO-MICROENCAPSULAMENTO POR PRECIPITAÇÃO
POLIMÉRICA DO ÓLEO DE NIM: CARACTERIZAÇÕES E
APLICAÇÕES PARA CONTROLE DE ÁCARO *Tetranychus urticae*
(ACARI: TETRANYCHIDAE)**

MARTHA BEATRIZ HORN

QUÍMICA INDUSTRIAL E LICENCIADA EM QUÍMICA
MESTRA EM ENGENHARIA DE MINAS, METALÚRGICA E MATERIAIS

**TESE PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM ENGENHARIA E
TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

Porto Alegre

Agosto, 2019



**NANO-MICROENCAPSULAMENTO POR PRECIPITAÇÃO
POLIMÉRICA DO ÓLEO DE NIM: CARACTERIZAÇÕES E
APLICAÇÕES PARA CONTROLE DE ÁCARO *Tetranychus urticae*
(ACARI: TETRANYCHIDAE)**

MARTHA BEATRIZ HORN

QUÍMICA INDUSTRIAL E LICENCIADA EM QUÍMICA
MESTRA EM ENGENHARIA DE MINAS, METALÚRGICA E MATERIAIS

ORIENTADOR: PROF. DR. MARÇAL JOSÉ RODRIGUES PIRES

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. SIMONE STÜLP

**Porto Alegre
Agosto, 2019**

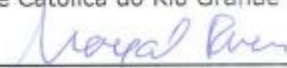


Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
ESCOLA POLITÉCNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS


**NANO-MICROENCAPSULAMENTO POR PRECIPITAÇÃO
POLIMÉRICA DO ÓLEO DE NIM: CARACTERIZAÇÃO E
APLICAÇÃO PARA CONTROLE DE ÁCARO TETRANYCHUS
URTICAE (ACARI)**

CANDIDATA: MARTHA BEATRIZ HORN

Esta Tese de Doutorado foi julgada para obtenção do título de DOUTOR EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

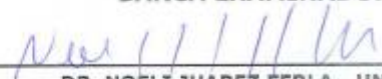


DR. MARÇAL JOSÉ RODRIGUES PIRES - ORIENTADOR



DRA. SIMONE STÜLP - CO-ORIENTADORA

BANCA EXAMINADORA



DR. NOELI JUAREZ FERLA - UNIVATES



**DRA. TATIANA LOUISE AVILA DE CAMPOS ROCHA - PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA - UNISINOS**



DRA. NARA REGINA DE SOUZA BASSO - DO PGETEMA - PUCRS

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 32 - Sala 505 - CEP: 90619-900
Telefone: (51) 3353.4059 - Fax: (51) 3320.3625
E-mail: engenharia.pg.materiais@pucrs.br
www.pucrs.br/politecnica

“Cada sonho que você deixa pra trás é um pedaço do seu futuro que deixa de existir”

(Steve Jobs)

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido Lucas Corrêa de Camargo e ao meu filho Felipe Horn de Camargo pelo amor, apoio, companheirismo e compreensão nos momentos que eu estava ausente, sempre com palavras de apoio e incentivo. A minha mãe, minha irmã e meu sobrinho que sempre me incentivaram a estudar e alcançar os meus objetivos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marçal José Rodrigues Pires pelos incontáveis ensinamentos, apoio, paciência e confiança depositada. Sempre disposto a ouvir e auxiliar nos momentos mais difíceis. A minha co-orientadora Profa. Dra. Simone Stülp, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Leandro Venturin pelos esclarecimentos sobre as dificuldades na cultura de produtos orgânicos. A José Horn pelo apoio no início deste trabalho.

Ao prof. Dr. Noeli Juarez Ferla e Guilherme Spohr pela disponibilidade e auxílio com os ensaios com os ácaros.

À professora Nara Regina Basso pelo auxílio na realização dos ensaios de liberação controlada.

A todos professores e colegas do Laboratório de Química Analítica Ambiental – LQAmb da PUCRS e ao Centro Tecnológico de Pesquisa e Produção de Alimentos – CTPPA, Tecnovates da Univates pelo apoio e companheirismo.

Aos colaboradores do Laboratório Central de Microscopia e Microanálises (LabCEMM) e ao Centro Interdisciplinar de Nanociências e Micro-Nanotecnologia - NanoPUC, por todas as informações, auxílios e orientações nas realizações das análises.

A Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul e Universidade do Vale do Taquari pela oportunidade da realização da pesquisa e a CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	7
SUMÁRIO	8
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	14
LISTA DE SÍMBOLOS	16
RESUMO	17
ABSTRACT	18
1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS	22
2.1. Objetivos Específicos	22
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1. Pesticidas	23
3.1.1. Biopesticidas	24
3.1.2. Árvore do Nim (<i>Azadirachta indica</i> A. Jussieu, <i>Meliceae</i>).....	25
3.1.2.1. Azadiractina ou Azadiractina A (AZA-A)	27
3.1.2.2. Mecanismos de Ação da Azadiractina	30
3.2. Nanotecnologia Aplicada a Liberação de Pesticidas	32
3.2.1. Nanoformulações poliméricas	34
3.2.2. Tensoativos.....	39
3.2.3. Polímeros Biodegradáveis	40
3.3. Ácaros – <i>Tetranychus urticae</i>	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1. Materiais	47
4.2. Metodologia	48
4.2.1. Caracterização dos produtos utilizados para a síntese de nanocápsulas	48
4.2.1.1. Extração líquido-líquido do Azamax.....	48
4.2.1.2. Desenvolvimento e validação de método analítico para a	
Quantificação da Azadiractina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	49
4.2.1.2.1 <i>Condições Cromatográficas – HPLC-DAD</i>	49
4.2.1.2.2 <i>Validação do Método</i>	49

4.2.1.2.3	Identificação de compostos presentes no óleo de Nim por LC-MSMS.....	51
4.2.1.2.4	Identificação dos Compostos Presentes no óleo de Nim por GCMS.....	52
4.2.1.2.5	Determinação do EHL	53
4.2.2.	Síntese de Nanocápsulas	54
4.2.3.	Caracterização das Suspensões Coloidais	58
4.2.3.1.	Distribuição de Tamanho Médio das Partículas, Índice de Polidispersão, Potencial Zeta e pH em Suspensão Coloidal.....	58
4.2.3.2.	Eficiência de Encapsulamento das Suspensões Coloidais	59
4.2.3.3.	Avaliação morfológica em Suspensão Coloidal - Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	60
4.2.3.4.	Estabilidade das Suspensões Coloidais	60
4.2.3.5.	Liberção Controlada, in Vitro, de Azadiractina em nanosuspensão coloidal	61
4.2.4.	Análise de Degradação Térmica	62
4.2.5.	Análise de Fotodegradação	62
4.2.6.	Preparação e Caracterização de Nanocápsulas em pó	63
4.2.6.1.	Secagem das nanocápsulas	63
4.2.6.2.	Caracterização das nanocápsulas em pó	64
4.2.7.	Ensaio Biológico com Ácaros da espécie <i>Tetranychus urticae</i> (Acari: Tetranychidae)	65
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	68
5.1.	Caracterização dos Produtos utilizados na Síntese de Nanocápsulas	68
5.1.1.	Análise do produto Azamax por Cromatografia Líquida.....	68
5.1.1.1.	Avaliação do Azamax® por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	70
5.1.1.2.	Avaliação do Azamax por Cromatografia Líquida acoplado ao Espectrômetro de Massa	71
5.1.1.3.	Avaliação do Azamax por Cromatografia Gasosa acoplado ao Espectrômetro de Massa	74
5.2.	Determinação do EHL – Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico	76
5.3.	Caracterização das Suspensões Coloidais.....	77
5.3.1.	Avaliação morfológica em Suspensão Coloidal - Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	85
5.3.2.	Estabilidade das Suspensões Coloidais	88

5.3.3. Liberação Controlada, <i>in vitro</i> , de Azadiractina em Suspensão Coloidal ..	92
5.4. Caracterização e Rendimento das Microcápsulas em Pó.....	94
5.5. Degradação Térmica	97
5.6. Fotodegradação	101
5.7. Ensaio Biológico com Ácaros <i>T. urticae</i>.....	104
6. CONCLUSÕES	109
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
ANEXOS	130

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Árvore de Nim (a), frutos e folhas (b) e semente (c) em detalhe (Fonte: Alves, 2007)	26
Figura 3.2. Fórmula estrutural da Azadiractina A. (Fonte: Morgan,2009).....	27
Figura3.3. Benefícios da utilização de nanotecnologia na agricultura.....	33
Figura 3.4. Ilustração da penetração de nanomateriais através das folhas e raízes (Fonte: Pérez-de-Luque e Hermosín, 2013).....	34
Figura 3.5. Imagens de diferentes tipos de nanoestruturas (Fonte: Nuruzzanam et al., 2016).	35
Figura 3.6. Preparo de nanocápsulas pelo método de nanoprecipitação (Fonte: Mora-Huertas, Fessi e Elaissari, 2010).....	37
Figura 3.7. Formação de nanocápsulas pelo método de nanoprecipitação (Fonte: Horn e Rieger, 2001).....	38
Figura 3.8. Escala de Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico segundo Griffin (Fonte: Prista, Alves e Morgado, 1990).	39
Figura 3.9. Estrutura química dos tensoativos, a) Span 60 e b) Tween 80, utilizados nesse trabalho (Fontes: Merck; Nair et al., 2003).....	40
Figura 3.10. Estrutura molecular do PLA (Fonte: Brito et al., 2011).	41
Figura 3.11. Estruturas químicas do PLA (Fonte: Raquez et al., 2013).	42
Figura 3.12. Estrutura molecular do PCL (Fonte: Domingues, 2006).....	42
Figura 3.13. Reação de hidrólise do PLA (Fonte: Lemos, 2017).....	43
Figura 3.14. Reação de hidrólise do PCL (Fonte: Lemos, 2017).....	43
Figura 3.15. Foto da esquerda, ácaro <i>T. urticae</i> . (Fonte: Biostasia, 2019) e foto da direita, ácaros e ovos (pontos transparentes) (Fotos: Martha Horn).	45
Figura 4.4. Fotos das arenas referentes ao acompanhamento dos ovos até a fase adulta.	66
Figura 20. Cromatograma e espectro DAD do padrão de Azadiractina	68

- Figura 21. Curva de calibração da Azadiractina determinada no HPLC-DAD.....69
- Figura 22. Cromatograma do Azamax extraído, com a identificação do pico do composto Azadiractina por HPLC-DAD.....71
- Figura 23. Perfil cromatográfico com zoom dos picos do extrato de Azamax, identificados por LC-MSMS.....72
- Figura 24. Estruturas dos compostos Azadiractina A e B (3-tigloyl-azadirachtol)73
- Figura 25. Cromatograma do GC-MS dos compostos voláteis presentes na fase hexanóica do óleo de Nim. Picos identificados na Tabela 7.74
- Figura 26. Cromatograma do GC-MS de ácidos graxos presentes na fase hexanóica do óleo de Nim, após a derivatização. Picos identificados na Tabela 8. 75
- Figura 27. Fotos dos testes de determinação de EHL, a) imediatamente após preparo e b) após 24 horas de repouso.....76
- Figura 28. Microscopia óptica, após 24 horas de repouso amostra 2 (a) e amostra 3 (b), ambas com aumento de 10 x.....77
- Figura 29. Esquema de possíveis instabilidades que podem ocorrer durante o congelamento de suspensões coloidais. A) antes da liofilização; B) depois da liofilização sem influência na morfologia e tamanho de partícula; C) com agregação/fusão; C') com ruptura de parede polimérica e consequente agregação/fusão, D) com quebra, D') com ruptura de parede polimérica e extravasamento do conteúdo oleoso e E) deformação de partícula. (Fonte: Araújo, 2009).....80
- Figura 30. Distribuição de tamanho de partículas das amostras NC1La, NC4Lc, NC13Ra e NC16Rc, medidas por DLS.84
- Figura 31. Imagens de MET, das nanosuspensões, a-b) nanoformulação NC25Ra (PLA 0,1%, sem óleo), c-d) nanoformulação NC26Rc (PCL 0,1%, sem óleo), e-f) nanoformulação NC13Ra (PLA 0,1%, com óleo), g-h) NC16Rc (PCL 0,1%, com óleo), nas magnitudes de 26500 x e 130000x.....87
- Figura 32. Variação do pH das suspensões de biopesticidas encapsulados por PLA ou PCL em função do tempo, na temperatura de 4°C.....89
- Figura 33. Variação dos parâmetros: a) % de Retenção, b) Potencial Zeta, c) Tamanho de Partícula, d) Índice de Polidispersão, das nanoformulações no início (t0) e após 6 meses (tf), armazenamento a 4°C.91
- Figura 34. Perfil de liberação de Azadiractina das nanoformulações NC13Ra (0,1% PLA) e NC16Rc (0,1% PCL).93

- Figura 35. Imagens de MEV para as nanoformulações secas com SiO₂, por spray dryer e liofilização, a e b) NC13RaS, c e d) NC16RcS, e) NC13RaL e f) Nc16RcL..... 97
- Figura 36. Curvas de Análises Termogravimétricas, TGA e DTG, dos componentes PLA, PCL e óleo de Nim. 98
- Figura 37. Curvas de degradação térmica por temperatura de Azadiractina presente no óleo de Nim e das nanosuspensões. 99
- Figura 38. Curvas de porcentagem de recuperação de Azadiractina presente no óleo de Nim e nanosuspensões poliméricas, utilizando lâmpada UVC..... 101
- Figura 39. Curvas de porcentagem de recuperação de Azadiractina presente no óleo de Nim bruto e nas nanosuspensões poliméricas, utilizando lâmpada Dulux. 102
- Figura 40. Resultados da % da mortalidade corrigida de ácaros pelo tempo (dias) em diferentes concentrações de Azadiractina no óleo e em nanoformulações. 106
- Figura 41. Resultados da % da redução da oviposição de ácaros pelo tempo (dias) em diferentes concentrações de Azadiractina..... 107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Publicações com Azadiractina ou óleo de Nim em estruturas diferenciadas.	29
Tabela 2. Composição das emulsões preparadas para determinação do EHL do Azamax.	54
Tabela 3. Identificação das diferentes nanoformulações testadas.	57
Tabela 4. Parâmetros utilizados na aspersão.	64
Tabela 5. Resultados obtidos na investigação de precisão e exatidão, intra e interensaios, para a análise de Azadiractina.	70
Tabela 6. Identificação de compostos com espectrômetro de massas (LC-MSMS) conforme o tempo de retenção e razão m/z dos principais reportados em literaturas.....	73
Tabela 7. Identificação dos compostos voláteis presentes na fase hexanóica do óleo de Nim.....	74
Tabela 8. Identificação de ácidos graxos presentes na fase hexanóica do óleo de Nim após a derivatização.	75
Tabela 9. Resultados da caracterização de suspensões coloidais produzidos com diferentes quantidades de polímeros, surfactantes e solvente orgânico.	78
Tabela 10. Resultados da caracterização de suspensões coloidais com evaporação por rotaevaporação em diferentes temperaturas no balão receptor.....	81
Tabela 11. Resultados das medidas de tamanho de partículas comparando as técnicas de medidas, ImageJ-MET e DLS.	87
Tabela 12. Resultados do rendimento e doseamento das suspensões coloidais.	95
Tabela 13. Resultados da análise por DLS das amostras secas por Spray dryer e liofilização.....	96
Tabela 14. Resultados da análise térmica dos componentes PLA, PCL e óleo de Nim, por TGA.....	98
Tabela 15. Resultados de tempo de meia vida das amostras para os ensaios de termodegradação.	100

Tabela 16. Resultados de tempo de meia vida das amostras para os ensaios de fotodegradação.	104
--	-----

LISTA DE SÍMBOLOS

Da	Dalton
eV	Elétron-Volt
kDa	Quilodalton
kPa	Quilopascal
kV	Quilovolt
m/v	Massa por volume
m/z	Massa carga
nm	Nanômetro
pH	Potencial Hidrogeniônico
rpm	Rotação por minuto
v/v	Volume por volume
PLA	poli ácido láctico
PCL	poli (ϵ -Caprolactona)
% EE	Porcentagem de Eficiência de Encapsulamento
PBS	Tampão Fosfato Salino
AZA	Azadiractina
P.A.	Princípio Ativo

RESUMO

HORN, Martha B. **Nano-microencapsulamento por Precipitação polimérica, do óleo de Nim: caracterizações e aplicações para controle de Ácaro *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae)**. Porto Alegre. 2019. Tese. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

O presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de biopesticida a base de óleo de Nim nanoencapsulado com polímeros biodegradáveis para o controle do ácaro *Tetranychus urticae*. Inicialmente foi realizada a caracterização do óleo utilizando as técnicas de HPLC-DAD, LC-MSMS, GCMS e TGA. Nanosuspensões foram então preparadas com poli ácido láctico (PLA) ou poli ϵ -caprolactana com o intuito de melhorar a proteção térmica e fotoquímica do princípio ativo Azadiractina e controlar a sua liberação. A caracterização das nanosuspensões foram realizadas por DLS, MET, HPLC-DAD e pH, os resultados indicaram tamanhos de nanocápsulas entre 215 e 289 nm, índice de polidispersão de 0,13 a 0,25 e eficiência de encapsulamento superior a 93 %. Cabe destacar, melhor desempenho do PLA frente ao PCL, assim como a evaporação de solvente por rotaevaporação. Tanto o óleo como as nanosuspensões avaliadas apresentaram excelente ação biopesticida tanto em relação a mortalidade quanto na redução da oviposição do ácaro, destacando-se a amostra NC13Ra (PLA 0,1%) como a mais efetiva. Esses resultados sugerem a possibilidade do uso do PLA como matriz polimérica alternativa e competitiva ao PCL para o nanoencapsulamento do óleo de Nim visando seu uso como biopesticida.

Palavras-Chaves: Nanoprecipitação, polímeros biodegradáveis, óleo de Nim, *Tetranychus urticae*.

ABSTRACT

HORN, Martha B. **Polymeric Precipitation Nano-microencapsulation of Nim oil: characterizations and applications for the control of *Tetranychus urticae* mite (Acari: Tetranychidae)**. Porto Alegre. 2019. PhD Thesis. Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

The present work aims the development of biopesticide based on biodegradable nanoencapsulation Neem oil for the control of the *Tetranychus urticae* mite. Initially oil characterization was performed using HPLC-DAD, LC-MSMS, GCMS and TGA techniques. Nanosuspensions were then prepared with poly lactic acid (PLA) or poly ϵ -caprolactan in order to improve the thermal and photochemical protection of the active ingredient Azadiractin and to control its release. The characterization of nanosuspensions were made by DLS, MET, HPLC-DAD and pH with results indicating nanocapsule sizes between 215 and 289 nm, polydispersity index from 0.13 to 0.25 and encapsulation efficiency greater than 93%. It should be noted, better performance of PLA compared to PCL, as well as solvent evaporation by rotation and evaporation. Both the oil and the nanosuspensions evaluated showed excellent biopesticide action both in relation to mortality and reduction of mite oviposition, highlighting the NC13Ra (PLA) sample as the most effective. These results suggest the possibility of using PLA as an alternative and competitive polymer matrix to PCL for Neem encapsulation of Neem for its use as a biopesticide.

Key-words: Nanoprecipitation, biodegradable polymers, Neem oil, *Tetranychus urticae*.

1. INTRODUÇÃO

A população mundial, nos últimos 20 anos, aumentou em torno de 20% (Banco Mundial, 2017) e com essa elevação surgem grandes desafios, principalmente relacionados a oferta de alimentos essenciais e combustíveis, cujo fornecimento é dependente da agricultura. Com esse crescente, há a necessidade da ampliação do uso de fertilizantes químicos e pesticidas, causando a escassez de recursos naturais e limitações de produtividade de culturas (Kumar et al., 2019).

O uso indiscriminado de pesticidas é uma preocupação constante, principalmente em relação ao meio ambiente e a saúde do agricultor e do consumidor. Estima-se que 90% dos pesticidas aplicados são degradados antes de alcançar o seu objetivo, devido a fatores como a umidade, chuvas, ventos, radiação solar e temperatura (Ghormade, Deshpande e Paknikar, 2011; Balaure, Gudovan e Gudovan, 2017). Sua utilização também pode diminuir a qualidade dos alimentos e solos, principalmente desestabilizando a flora microbiana (Chhipa, 2017), limitando assim a produtividade (Kumar et al., 2019). O uso de pesticidas sem restrições e a falta de seletividade destes produtos podem levar a eliminação de inimigos naturais, causando o rápido crescimento de pragas. Além disso, muitos insetos e microrganismos criam resistência a estes produtos (Mogul et al., 1996; Kumar et al., 2019).

A preocupação com o uso sustentável dos recursos naturais tem levantado importantes questões ambientais, como o escoamento e acumulação de fertilizantes e pesticidas, alimentos de boa qualidade e a preocupação com a saúde da população. Surge com isso a necessidade de melhorar as práticas agrícolas convencionais, com a utilização de tecnologias avançadas como a nanotecnologia, sistemas eficientes e sustentáveis, com controle adequado de pesticidas (Ali et al., 2014; Kumar et al., 2019).

A nanotecnologia é uma abordagem interdisciplinar e inovadora com desenvolvimento de materiais em escala nanométrica, ou seja, um bilionésimo de metro. O uso da nanotecnologia na agricultura está entre os mais importantes campos

de sua aplicação. É possível obter vantagens na melhoria qualitativa dos alimentos sob teor nutricional, ter insumos agrícolas reduzidos, qualidade da água, tratamento de sementes, controle de pragas-alvo, distribuição de fertilizantes e maior prazo de validade. Ocorrendo uma remodelação na agricultura e da produção a fim de atender as demandas de produção de maneira eficiente, sustentável e rentável (Ali et al., 2014, Jampílek e Král'ová, 2017; Kumar et al., 2019).

Dentre as diferentes nanotecnologias cabe destacar as nanoformulações que são compostas por dois componentes principais: ingrediente ativo e um nanocarregador. As nanoformulações são amplamente pesquisadas na agricultura, seu uso se dá em nanofertilizantes, nanoinseticidas, nanofungicidas, nanoherbicidas, principalmente por ser caracterizada pela liberação controlada do princípio ativo. Suas nanoformulações são variadas desde polímeros biodegradáveis, à partículas de sílica, prata e cobre (Jampílek e Král'ová, 2017).

Com a preocupação na diminuição do uso de insumos agrícolas, os biopesticidas se apresentam como uma alternativa. A partir da sua utilização é possível reduzir a quantidade de resíduos químicos no alimento, pois estes produtos decompõem-se rapidamente e fornecem uma proteção natural a planta (Czaja et al., 2014). Entre os biopesticidas mais pesquisados encontra-se os derivados do Nim, com o principal princípio ativo a Azadiractina.

A *Azadiractina indica* A. juss (Nim) é uma árvore cujas folhas, frutos e sementes apresentam características como inseticidas, acaricidas e fungicidas. Para tal, tem se mostrado um bom substituto a pesticidas químicos já conhecidos. Apresentando características desejáveis de um pesticida botânico (Forim, 2014a), como rápida degradação, potente ação inseticida e baixa toxicidade.

O óleo e/ou extrato de Nim são compostos por triterpenóides, sendo o principal deles a Azadiractina. Porém esse composto é termo e fotossensível, dificultando seu uso na agricultura. Uma forma de protegê-lo se dá com a utilização da nanotecnologia, tornando seu princípio ativo estável. Forim et al. (2013) propôs nanoformulações de óleo e extrato de Nim, utilizando poli ϵ -caprolactana (PCL) como matriz polimérica e aplicaram em larvas de *Plutella Xylostella* obtendo resultados satisfatórios com o óleo de Nim, demonstrando boa estabilidade e capacidade de dispersão em meio aquoso. Já Carvalho e seus colaboradores (2015) utilizaram de PCL e PHB (Poli- β -hidroxibutirato) para combater a ovos e ninfas de *Bemisia tabaci* apresentando mortalidade de no mínimo 50% das ninfas. Porém nenhum estudo foi encontrando

utilizando PLA, como base polimérica encapsulante para o óleo de Nim e aplicações de nanoformulações polimérica com ácaros *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae).

O ácaro *Tetranychus urticae*, ou ácaro rajado, tornou-se um sério problema no Brasil, principalmente nos cultivos de morango, uva, feijão e pêssego. Os danos causados por esta espécie de ácaro é a descoloração das folhas, lesão esta que pode levar desde a perda das folhas até a morte das plantas (Martínez-Villar et al., 2005; Veronez, Sato e Castro, 2012; Castro et al., 2015). O controle dos ácaros vem sendo realizado exclusivamente com uso de pesticidas químicos, como: organofosforados, organoclorados, carbamatos, piretróides, arsenicais, pirazóis ou formamidina, que provocam grande impacto ambiental. Estes produtos não são seletivos e não apresentam eficiência, mesmo com aplicações regulares, devido à resistência dos ácaros ou a ressurgência destes, e a eliminação de predadores. Os biopesticidas surgem como opção para este controle com menor toxicidade, entre eles o óleo de Nim, cujos estudos realizados demonstraram potencial acaricida (Martínez-Villar et al., 2005; Veronez, Sato e Castro, 2012; Hanifah et al., 2011; Sundaram et al., 1995).

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo desenvolver um nanobiopesticida a base de óleo de Nim por nanoprecipitação polimérica para aplicação no controle do ácaro *T. urticae*.

2.1. Objetivos Específicos

Caracterizar o óleo comercial Azamax – Óleo de Nim, através das técnicas de LC-MSMS e GCMS e desenvolver e validar metodologia analítica de dosagem de Azadiractina A no Óleo Azamax por HPLC-DAD;

Otimizar a técnica de nanoprecipitação polimérica para o óleo comercial Azamax, comparando dois polímeros biodegradáveis, PCL e PLA, e dois processos de evaporação de solvente, liofilização e rotaevaporação;

Caracterizar as nanosuspensões coloidais obtidas por diferentes técnicas (DLS, MET, pH) e avaliar suas estabilidades em diferentes temperaturas de estocagem;

Avaliar a liberação do princípio ativo, Azadiractina A, das nanosuspensões coloidais, bem como a proteção térmica e fotoquímica do encapsulamento;

Obter e caracterizar o biopesticida na forma de pó, a partir das nanosuspensões coloidais com o auxílio de adjuvante SiO₂, e comparar duas técnicas de secagem, *spray drying* e Liofilização;

Estudar a ação do óleo de Nim e do produto encapsulado como acaricida frente ao *T. urticae*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Pesticidas

Pesticidas ou praguicidas são substâncias ou misturas utilizadas com o objetivo de impedir, destruir ou repelir pragas podendo ser de origem sintética orgânica (química) ou natural (biopesticidas) (Balaure, Gudovan e Gudovan, 2017). Essas substâncias são utilizadas para combater e/ou repelir pragas como: fungos, bactérias, nematóides, insetos, ácaros, moluscos, pássaros, roedores e outros organismos, que possam prejudicar a produção de alimentos e a saúde humana (Sarwar e Salman, 2015). Esses produtos são amplamente utilizados, devido a sua eficiência, fácil aplicação, disponibilidade e baixo custo (Balaure, Gudovan e Gudovan, 2017).

Os pesticidas apresentam vários problemas como: baixa solubilidade do princípio ativo em água, comportamento não seletivo, liberação descontrolada causando uma série de inconvenientes, entre eles aplicação não seletiva que podem atingir agentes polinizadores, como aves e insetos. Além disso, estas substâncias apresentam características lipofílicas, inserindo-se na cadeia alimentar, pois tendem a acumular-se nos tecidos adiposos, tornando-se assim bioacumulativos. Outro ponto importante ao uso destes produtos está relacionado a saúde humana, já que podem causar diversos problemas como: alergias, obesidade, câncer, distúrbios neurológicos, problemas endócrinos (Balaure, Gudovan e Gudovan, 2017; Kumar et al., 2019).

Além dos problemas relacionados acima existe a resistência de insetos devido ao uso indiscriminado destes produtos (Moreira et al., 2005), aumentando a quantidade de patógenos (Ghormade, Deshpande e Paknikar, 2011), reduzindo a biodiversidade do solo e dificultando a fixação de nitrogênio (Tilman et al., 2002), causando a escassez dos recursos naturais e limitando a produtividade (Kumar et al., 2019).

Apesar do seu uso indiscriminado estima-se que até 90% dos pesticidas aplicados são degradados antes de alcançar o objetivo (Ghormade, Deshpande e Paknikar, 2011), devido a fatores como: umidade, chuvas, ventos, radiação solar e temperatura (Balaure, Gudovan e Gudovan, 2017).

Devido aos problemas apresentados, a necessidade de maximizar a eficiência e minimizar os prejuízos, a proibição de alguns países com a utilização de alguns agroquímicos e suas quantidades e ao desenvolvimento da agricultura orgânica, os inseticidas químicos, ou a forma como estão sendo aplicados, estão perdendo espaço no mercado para os inseticidas naturais ou biopesticidas ou ainda nanopesticidas (Moreira et al., 2005; Shennan et al., 2017; Kumar et al., 2019).

A agricultura orgânica é limitada por vários obstáculos, como: falta de informação, políticas de inexistentes, infra-estrutura fraca, percepções errôneas e muitos desafios econômicos (Kumar et al., 2019). Representa um segmento ainda com pouca produção, menos de 1% das terras agricultáveis globais e sua venda em varejos de alimentos, menos de 5%. Porém em países desenvolvidos é um dos setores de alimentos que mais cresce devido à grande busca por qualidade de vida (Shennan et al., 2017; Albuquerque et al., 2019). Além de apresentar benefícios ambientais, humanos e sociais, pois em sua produção utilizam-se defensivos naturais e produtos com valor agregado, oferecendo novos mercados e maior retorno financeiro (Shennan et al., 2017).

3.1.1. Biopesticidas

Biopesticidas são pesticidas derivados de materiais naturais como plantas, animais, bactérias e certos minerais que possuem substâncias que naturalmente controlam as pragas, apresentando baixa toxicidade (Martín et al., 2012; Ghodake et al., 2018; United States Environmental Protection Agency, 2017).

Em 2015, os biopesticidas, correspondiam cerca de 2% dos pesticidas utilizados, mas a sua utilização otimizada vem crescendo 10% ao ano (Kumar e Singh, 2015). Segundo a EPA em abril de 2016 haviam 299 biopesticidas registrados no mercado norte americano.

Os biopesticidas derivados de plantas, também conhecidos como pesticidas botânicos, são compostos de ação inseticida e/ou repelentes obtidos de diferentes tipos de plantas (Moreira et al., 2005). Provou-se que essas substâncias são

biodegradáveis, sustentáveis e livres de resíduos, o que chamou a atenção de pesquisadores, pois há uma grande biodiversidade de vegetais com substâncias biologicamente ativas (fitoquímicos) (Gahukar, 2014).

Estes pesticidas naturais apresentam amplo espectro de ação, rara persistência bioacumulativa e moderada toxicidade, causando um efeito pouco tóxico aos mamíferos, porém podem ser tóxicos aos invertebrados aquáticos (Sarwar e Salman, 2015). Segundo El-Wakeil (2013), além destes aspectos apresentados, estes agem e degradam-se rapidamente. Apresentando não somente a capacidade de repelência, mas também por possuir efeitos de pesticidas de contato, fumegantes contra pragas específicas e ações fungicidas. Seu modo de ação ocorre normalmente por interação bioquímica, agindo nas enzimas e proteínas das pestes.

Entre as espécies mais conhecidas estão as famílias das plantas *Meliaceae*, *Rutaceae*, *Asteraceae*, *Labiatae* e *Canellaceae* (Moreira et al., 2005). Na família da *Meliaceae*, a árvore que atualmente está sendo mais utilizada é a Nim, (*Azadirachta indica* A. Jussieu, *Meliaceae*), utilizada para fins medicinais e como matéria-prima para biopesticidas. A árvore de Nim é cultivada na América Latina, África, Austrália, Índia e China (Gahukar, 2014).

3.1.2. Árvore do Nim (*Azadirachta indica* A. Jussieu, *Meliceae*)

A *Azadirachta indica* A. Jussieu, também conhecida como árvore de Neem ou Nim é nativa do Oriente, sul da Ásia. Conhecida há séculos por possuir diversas propriedades como planta medicinal (anti-inflamatório, contra hipertensão, febre, infecções virais), repelente, combustível, adubo, lubrificante e mais recentemente como praguicida (Mossini e Kemmelmeier, 2005).

A árvore do Nim quando adulta apresenta altura entre 15 a 25 metros, caule marrom-escuro para cinza, possui folhas em abundância na cor verde-escura, folhas brancas e aromáticas (Figura 1) (Brito, 2013). Cresce rapidamente, tolera um solo pobre ou degradado, condições de clima semi-árido (Morgan, 2009). Frutos apresentam coloração verde-clara e quando maduros, amarelados com apenas uma semente, rodeada por polpa branca (Brito, 2013).



Figura 3.1. Árvore de Nim (a), frutos e folhas (b) e semente (c) em detalhe (Fonte: Alves, 2007)

As árvores de Nim com aproximadamente 15 anos de idade, podem produzir em torno de 20 kg de fruto, isto corresponde a 2 kg de semente, que serão utilizadas para a obtenção do óleo de Nim (Ley, Denholm e Wood, 1993; Alves, 2007). Estas sementes são ricas em óleo não comestível, em torno de 40% (Morgan, 2009). As folhas são comumente utilizadas para a proteção destes grãos até a sua prensagem a frio (Ley, Denholm e Wood, 1993).

O Nim como árvore inseticida, surge no mundo ocidental, na década de 1950. Através do professor Heinrich Schmutterer (Universidade de Griessen, Alemanha), ao constatar que foi a única planta que permaneceu intacta após a migração de gafanhotos (*Schistocerca gregaria*) no Sudão (Silva, 2010).

No Brasil, foi introduzida em 1986, pelo Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR, com sementes vindas das Filipinas, em 1989 e após de três diferentes países, Índia, Nicarágua e República Dominicana. Hoje está disseminada em todo o país (Martinez, 2002).

Na região Nordeste do Brasil (bioma Caatinga), a árvore do Nim já produz frutos em escala industrial e também é utilizada na produção de madeira. Nas regiões Sul (noroeste do Paraná), Sudeste (exceto caatinga mineira), Centro-Oeste e Norte, a árvore é utilizada somente para a produção de frutos e sementes para extração de óleo (Neves e Carpanezi, 2008).

3.1.2.1. Azadiractina ou Azadiractina A (AZA-A)

O óleo de Nim, presente na semente do fruto, apresenta alto potencial repelente, inseticida, antimicrobiana. Os compostos que apresentam esta característica são os limonóides, substâncias amargas, conhecidas como meliacinas ou tetranotriterpenóides (Silva, 2010, Rawat et al., 2017). Acredita-se que em torno de 550 espécies de insetos artrópodes, apresentem alguma sensibilidade a estes compostos (Gahukar, 2014; Rawat et al., 2017).

Apresenta em sua composição pelo menos 9 limonóides potencialmente capaz de bloquear o crescimento de pragas agrícolas (Mossini e Kimmelmeier, 2005). A complexa mistura de ingredientes ativos e sistêmicos protegem toda a planta e são de amplo espectro. Na sua composição apresentam diversos compostos, entre eles Salanim, Meliantriol, Nimbim, Azadiractina A, B, C, D, E, F e G. Dentre estes compostos o mais biologicamente ativo e mais difundido é Azadiractina A ou Azadiractina (Bebashri e Tamal, 2012).

A Azadiractina, possui fórmula molecular ($C_{35}H_{44}O_{16}$), apresentando 16 estereoisômeros, 7 carbonos quaternários e 9 secundários (Figura 2). Os grupos funcionais presentes são: 4 ésteres, 2 grupos hidróxi, hemiacetal, epóxido e dihidrofurano. Devido a este elevado número de grupos funcionais, suas proximidades e a presença de oxigênio nestes grupos, o composto Azadiractina é facilmente oxidado e bastante reativo (Forim, 2006; Ley, Denholm e Wood, 1993; Morgan, 2009).

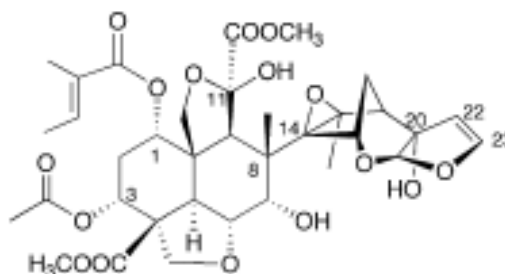


Figura 3.2. Fórmula estrutural da Azadiractina A. (Fonte: Morgan, 2009).

A Azadiractina é uma substância não volátil, altamente polar, solúvel em solventes polares (metanol e etanol) e ligeira solubilidade em água (Morgan, 2009).

Devido a sua instabilidade química é facilmente degradada por diversos fatores, como: temperatura, fotodegradação, microrganismo; e se aplicada ao solo, pH e umidade (Forim, 2006). Alguns pesquisadores afirmaram que este composto se degrada entre 3 a 8 dias no solo (Mossini e Kemmelmeier, 2005; Sundaram e Sundaram, 1996; Carvalho et al., 2015) e na água apresentam uma longevidade maior entre 8 e 13 dias (Sundaram e Sundaram, 1996). Por este motivo, existem muitas pesquisas para tornar o princípio ativo mais estável, sofrendo menos influência de agentes externos.

Pesquisas recentes têm utilizado micro ou nanoestruturas com o objetivo de tornar a AZA-A mais estável, facilitar a solubilização e dispersão de substâncias lipofílicas em água, dar maior mobilidade e diminuir sua toxicidade (Forim et al, 2013, Balaure, Gudovan e Gudovan, 2017, Carvalho et al., 2015, Jampílek e Král'ová, 2017, Riyajan e Sakdapipanich, 2009, Roy et al., 2014, Jerobin et al., 2012, Costa et al., 2013, Oliveira et al., 2014).

A Tabela 1 apresenta alguns estudos de maneiras diferenciadas de dispor esse composto, com o objetivo de protegê-lo da fotodegradação, temperaturas elevadas, alterações de pH e umidade, e favorecendo a liberação controlada.

Tabela 3.1. Publicações com Azadiractina ou óleo de Nim em estruturas diferenciadas.

Forma	Material utilizado	Princípio Ativo	Autor
Partículas	Carboximetil – quitosana	Padrão de Azadiractina 98%	Feng e Peng, 2012
Nanopartículas	Prata	Extrato de Nim	Rather et al., 2016
Microcápsulas	Poli (vinil acetato)	Extrato de Nim	Riyajan e Sakdapipanich, 2009
Micro/nanocápsulas	PCL, PHB	Extrato e óleo de Nim	Forim et al., 2013
Nano-microencapsulado	Lignina	Extrato de Nim	Costa, 2014
Nanocápsulas	PCL	Óleo de Neem	Pasquoto-Stigliani et al., 2017
Nanocápsulas	PCL, PHB	Óleo de Nim	Carvalho et al., 2015
Nanocapsulas, Nanosferas	PCL, PHB, PMMA	Extrato de Nim	Giongo, Vendramim e Forim, 2015
Nanosferas	PCL	Óleo de Nim	Costa et al., 2013
Microemulsão	Tween 80, SDBS	Óleo de Nim	Xu et al., 2010
Nanoemulsão	Tween 20	Óleo de Nim	Anjali et al., 2012
Nanoemulsão	Alginato de sódio/PEG	Óleo de Nim	Jerobin et al., 2012
Nanocompósitos	PVA/Alg-MMT	Óleo de Nim	Rashidzadesh et al., 2013
Nanomicelas	PEG, PVC	Isolado de Azadiractina 25%	Kumar et al., 2010
Nanoformulação	TiCl ₄	Goma de Nim	Kamaraj et al., 2018
Nanopartículas	Prata	Extrato de Nim	Roy et al., 2017
Nanoemulsão	PHBV	Óleo de Nim	Mendonça, 2019
Nanofibra	PVA, Quitosana	Extrato de Nim	Ali et al., 2019
Nanopartículas	TiO ₂	Extrato de Nim	Thakur, Kumar e Kumar, 2019

Nanopartículas	Zeína ¹ do milho	Óleo de Nim	Pascoli et al., 2019
PCL – Policaprolactano, PHB – polihidroxibutirato, PEG – Polietilenoglicol, SDBS – Dodecilbenzenossulfonato de sódio, PMMA – Polimetilmetacrilato, PVC – Cloreto de Polivinil, PVA/Alg-MMT – Álcool Polivinílico/Alginato de Montmorillonita, PVA – Álcool Polivinílico, PHBV – Polihidroxibutirato-co-ivalerato.			

Dentre os trabalhos indicados na Tabela 1 cabe destacar a utilização do óleo e/ou extrato de Nim na síntese de diferentes estruturas com a justificativa de elevar a eficiência e solubilidade, além de evitar a degradação precoce do produto (Kumar et al., 2019; Jampílek e Král'ová, 2017; Chandra e Rustgi, 1998).

3.1.2.2. Mecanismos de Ação da Azadiractina

A Azadiractina vem sendo muito estudada para identificar seu modo de ação, além do cuidado com a toxicidade. Além de insetos, esse princípio ativo pode influenciar outros organismos como nematóides, caramujos, crustáceos, viroses de planta e fungos e estimular em aproximadamente 25% no aumento de minhocas, melhorando o solo (Mossini e Kemmelmeier, 2005).

Segundo Hummel, Hein e Schmutterer (2012) a Azadiractina apresenta a função de biopesticida, pois ela tem a capacidade de regular o crescimento de insetos e artrópodes. O princípio ativo interfere na síntese de RNA e no metabolismo dos hormônios cerebrais das pragas agrícolas.

El-Wakeil, N. E. (2013) reporta que a AZA, bloqueia as glândulas protorácicas, causando o crescimento incompleto: ecdise e em fêmeas adultas a esterilidade. Apresenta baixa toxicidade a mamíferos, peixes e polinizadores, pois a sua ação é rapidamente degradada pela luz solar. Segundo Nuruzzanam et al. (2016), a Azadiractin-A apresenta baixa toxicidade se comparado a outros compostos naturais, possui um DL₅₀ para ratos >5000 mg kg⁻¹, enquanto a nicotina, por exemplo, apresenta DL₅₀ de 50 mg kg⁻¹.

¹ Zeína do milho é uma proteína extraída do endosperma do grão de milho.

Mossini e Kemmelmeier (2005) reportaram outros efeitos sobre pragas como: efeito antialimentar, regulador de crescimento, interações nas funções bioquímicas e fisiológicas, repelência ao depositar ovos, até a morte.

A Azadiractina apresenta também atividade antifúngica, com potencial controle de fitopatógeno indicando a presença de compostos com características elicitores² ou antimicrobiana. Na ação fungitóxica direta ocorre a inibição do crescimento micelial e a germinação de esporos e a capacidade de indução do acúmulo de fitoalexinas (Schwan-Estrada, Stangarlin e Cruz, 2000, Carvalho, 2010).

As fitoalexinas são metabólitos secundários, de baixo peso molecular e produzidos por plantas em resposta a estresses físicos, químicos e biológicos, sendo capazes de inibir a atividade patogênica. Em fungos o modo de ação inclui a granulação citoplasmática, desorganização celular, ruptura de membrana plasmática, inibição de enzimas fúngicas, causando a inibição da germinação e redução ou inibição de crescimento micelial, germinação e alongamento do tubo germinativo (Schwan-Estrada, Stangarlin e Cruz, 2000, LO, 1996, Carvalho, 2010, Stangarlin et al., 1999).

A ação acaricida do óleo de Nim está associada a sua eficiência como repelente, regulador de crescimento, inibição da alimentação, baixa oviposição, fecundidade e fertilidade, alterações de comportamento e alta mortalidade. Devido ao seu curto efeito residual, rápida degradação apresentam baixa toxicidade ao homem, e menor probabilidade de resistência artrópode-praga (Soto et al., 2010; Veronez, Sato e Castro, 2012; Seifi, Moharramipour e Ayyari, 2018; Dorri et al., 2018; Martínez-Villar et al., 2005).

A partir dos mecanismos de ação citados acima por diversos autores, entende-se que o nanoencapsulamento pode ser uma excelente alternativa para dispor o Azadirachtina ao meio com o auxílio da nanotecnologia realizando a proteção deste o

² Moléculas presentes em um organismo ou moléculas produzidas pela própria planta que tem como função gerar a defesa.

princípio ativo. Esta nanoformulação poderia ser disposta através da irrigação ou pulverização para que possa fazer a proteção das plantas.

3.2. Nanotecnologia Aplicada a Liberação de Pesticidas

Nanotecnologia é considerada pela Comissão Europeia como 1 das 6 chaves tecnológicas (Parisi, Vigani, Rodríguez-Cerezo, 2015), uma abordagem inovadora, com potencial de revolucionar a agricultura. Esta tecnologia interdisciplinar que envolve a concepção de desenvolvimento e aplicação de materiais em escala nanométrica, com dimensões que variam de 1 a 100 nm (Ali et al., 2014; Kumar et al., 2019).

Entretanto, para algumas aplicações, o termo “nano” é aceito com pelo menos uma das dimensões da estrutura com tamanho até 500 nm. As formas podem ser esféricas, hastes, tubos, irregulares; fase cristalina ou amorfa, sua composição química pode ser metálica, de carbono, orgânica, inorgânica, poliméricas, entre outros (Hayles et al., 2017).

A nanotecnologia na agricultura está em rápido desenvolvimento, com a introdução de novos materiais e a preocupação com o meio ambiente. Nesta área a nanotecnologia está presente no desenvolvimento de dispositivos de controle de pragas, nanopesticidas, nanofertilizantes, nanosensores (Hayles et al., 2017). Empresas multinacionais, como Bayer, Monsanto, Syngenta e BASF, estão desenvolvendo e patenteando seus produtos nesta área (Hayles et al., 2017; Nuruzzamam et al., 2016).

As aplicações da nanotecnologia na agricultura estão presentes no tratamento de sementes, germinação, crescimento e desenvolvimento de plantas, controle de pragas, entrega de fertilizantes, detecção de agrotóxicos e patógenos (Nuruzzamam et al., 2016). O segmento com maior quantidade de pesquisas e patentes registradas é de nanopesticidas, estas formas de aplicações da nanotecnologia na agricultura visam principalmente, a diminuição da porção de pesticidas e elevação na eficiência das aplicações.

A nanotecnologia pode superar diversas limitações, fornecendo culturas de qualidade e equilibrando os nutrientes. Além disso, pode auxiliar na qualidade da água, tratamento de sementes, controle de pragas, distribuição de fertilizantes e redução de efeitos tóxicos (Kumar et al., 2019).

Nanopesticidas podem consistir de diferentes materiais (polímeros, metais, inorgânicos) e de diversas formas (micelas, nanoemulsões, nanocápsulas, nanoesferas, nanopartículas) (Ragaei e Sabry, 2014). Podem ser tanto de pesticidas químicos já existentes e com eficiência já conhecida, como de biopesticidas que tem como princípio ativo bactérias, fungos, óleos essenciais, entre outras substâncias que apresentam a característica de repelir ou exterminar pragas.

Na Figura 3 são apresentados os benefícios que os nanopesticidas podem trazer ao homem e ao meio ambiente.



Figura3.3. Benefícios da utilização de nanotecnologia na agricultura.

Nanopesticidas agem por contato direto com insetos ou com a ingestão do princípio ativo, que estará localizado na superfície da planta ou na seiva (Figura 4). Para que isso ocorra é preciso que o produto penetre no interior da planta, alcance os vasos condutores e seja transportado por toda planta ou parte dela. O tamanho da partícula é muito importante para que ocorra a penetração do princípio ativo de maneira eficiente (Boehm et al., 2003).

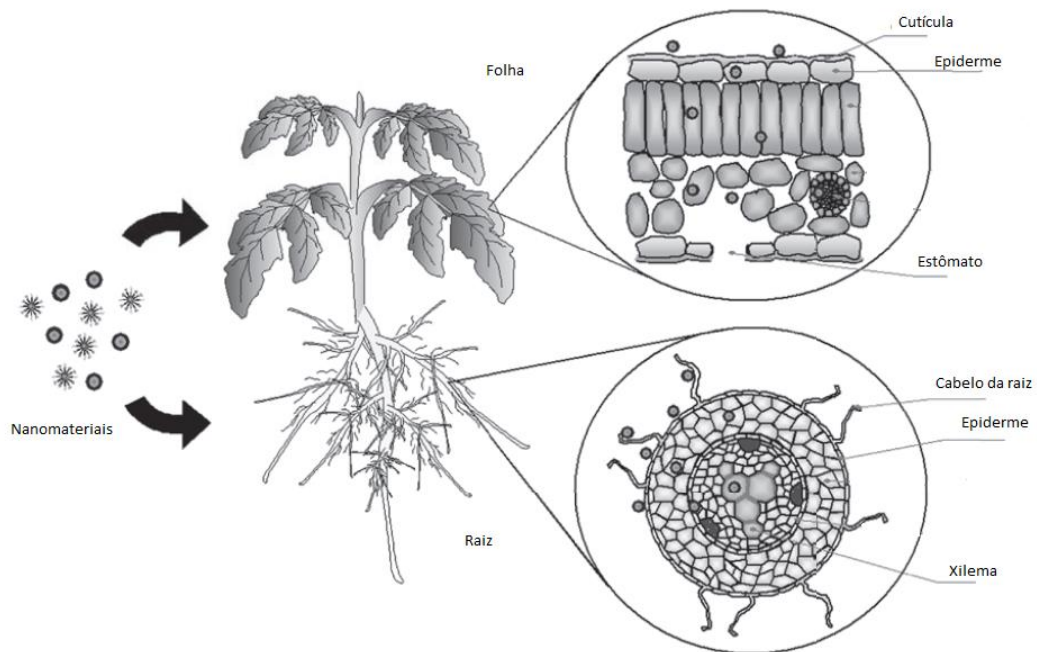


Figura 3.4. Ilustração da penetração de nanomateriais através das folhas e raízes (Fonte: Pérez-de-Luque e Hermosín, 2013).

As adaptações da nanotecnologia para a agricultura apresentam desafios diferentes e complexos. Os nanopesticidas necessitam atravessar vários tecidos e barreiras antes de atingir o sistema vascular das plantas (Pérez-de-Luque e Hermosín, 2013). Apresentam comportamentos diferenciados em ambientes terrestres e aquáticos; para tanto podem ser transportadas, dissolvidas ou coloidais, e dependem do tipo de solo, tamanho de partícula, parâmetros hidráulicos, textura do material e quantidade de matéria orgânica, no meio em que será inserida (Kah e Hofmann, 2014).

3.2.1. Nanoformulações poliméricas

Nanoformulações é uma combinação dos princípios ativos com surfactantes, polímeros e ou partículas metálicas (Kah et al., 2014) apresentando estruturas em escalas nanométricas. Os surfactantes têm como funções facilitar a emulsão entre óleo e água, ou vice-versa, e aumentar a solubilidade de óleos em água. Já os polímeros e partículas metálicas podem promover a proteção, estabilidade e a liberação controlada do princípio ativo (Oliveira et al., 2014).

Existem diferentes tipos de nanoformulações, as principais ou mais comuns, são: nanocápsulas, nanoesferas, micelas e nanogéis. Nas nanoesferas o princípio ativo está homogeneizado e distribuído na matriz polimérica.

As micelas são portadoras de bioativos, ideais para pesticidas insolúveis em água. São materiais capazes de se auto-montar, devido às suas propriedades anfifílicas, e formar micelas esféricas em solução aquosa. Mantendo as extremidades hidrofílicas, como revestimento externo e as extremidades hidrofóbicas, como núcleo (Nuruzzanam et al., 2016).

Nanogéis são dispersões aquosas de partículas de hidrogéis, apresentam um grande potencial para armazenar compostos ativos, muito utilizado para fármacos. Apresentam alta capacidade de armazenamento, estabilidade e capacidade de resposta a fatores como: força iônica, temperatura e pH. Na Figura 5 é possível verificar as diferenças destes quatro tipos de estruturas (Nuruzzanam et al., 2016).

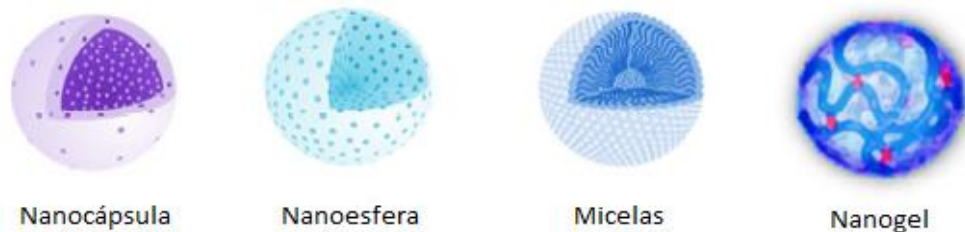


Figura 3.5. Imagens de diferentes tipos de nanoestruturas (Fonte: Nuruzzanam et al., 2016).

As nanocápsulas foram utilizadas neste trabalho por ser um sistema moderno de proteção na agricultura, pois tem a capacidade de liberação controlada do pesticida, elevando a solubilidade do princípio ativo, protegendo da degradação prematura, aumentando a estabilidade do composto de interesse.

Nanocápsulas são sistemas vesiculares constituídos por membranas poliméricas encapsulando compostos ativos em seu interior. Possuem uma disposição núcleo-casca, na qual o invólucro é constituído por estrutura ou revestimento polimérico e as substâncias ativas são dissolvidas no núcleo. Substâncias estas encapsuladas de maneira instantânea durante a sua formação (Nuruzzanam et al., 2016).

Segundo Mora-Huertas, Fessi e Elaissari (2010), a vesícula interna pode conter substâncias líquidas, sólidas ou dispersão molecular, podendo ser hidrofóbicas ou hidrofílicas, transportando as substâncias ativas.

As nanocápsulas podem ser preparadas por diversas técnicas de acordo com a sua aplicação e o tipo de princípio ativo. Existem diversas técnicas de encapsulamento que englobam processos químicos, físico-químicos e físicos. Dentre os processos químicos podemos citar a condensação ou polimerização interfacial e a geleificação. Os processos físico-químicos mais usados são a coacervação simples³ ou coacervação complexa⁴, nanoprecipitação e evaporação por solvente após emulsificação. Já os processos físicos incluem a aspensão, extrusão e liofilização (Perlatti et al., 2013).

A técnica ideal de encapsulamento deve ser simples, rápida, fácil e principalmente reproduzível (Kissel et al., 2006). Na escolha do processo de encapsulamento deve ser considerado: a taxa de encapsulamento do princípio ativo e reprodutibilidade de liberação (Oliveira, 2014).

No método de nanoprecipitação, também conhecido como deslocamento de solvente ou deposição interfacial, para que a síntese de nanocápsulas ocorra é necessário a presença de duas fases, uma solvente e outra não solvente (Fessi, 1988). A fase solvente (fase orgânica) composta de um ou mais solventes miscíveis em água (etanol, acetona, hexano, cloreto de metileno ou dioxano), polímero, tensoativo de baixo Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico (EHL) e a substância ativa. A fase não solvente (fase aquosa) é composta de água e tensoativo de alto EHL.

Nanocápsulas são obtidas pelo método de precipitação após a obtenção de suspensão coloidal formada quando a fase orgânica é adicionada moderadamente a

³ Precipitação do polímero que na presença de sais, que apresentam maior afinidade com a água, desidratam e resultam em gotículas sólidas tornando um revestimento endurecido.

⁴ Um processo polieletrólítico é formado, requer uma mistura de dois colóides a um pH em que os dois polímeros de cargas opostas são conduzidos a separação de fases e formação de capsulas sólidas ou gotículas de líquido fechadas.

fase aquosa, com agitação (Mora-Huertas, Fessi e Elaissari, 2010). A etapa se dá instantaneamente após a mistura, devido a miscibilidade completa dos solventes. O polímero precipita, na interface óleo/água, na forma de partículas no momento em que solvente orgânico se dissolve na água, (Moinard-Checot et al., 2006, Fessi et al., 1989). A rápida difusão do solvente resulta na redução da tensão interfacial entre as duas fases, acarretando no aumento da área superficial, conduzindo a formação de pequenas gotículas de solvente orgânico (Ribas, 2013).

Segundo Horn e Rieger (2001), a rápida difusão do solvente gera uma turbulência na camada limite fazendo com que o polímero e o princípio ativo precipitem.

Na Figura 6 está apresentada a ilustração para a formação da suspensão coloidal na formação de nanocápsulas a partir do processo de precipitação.

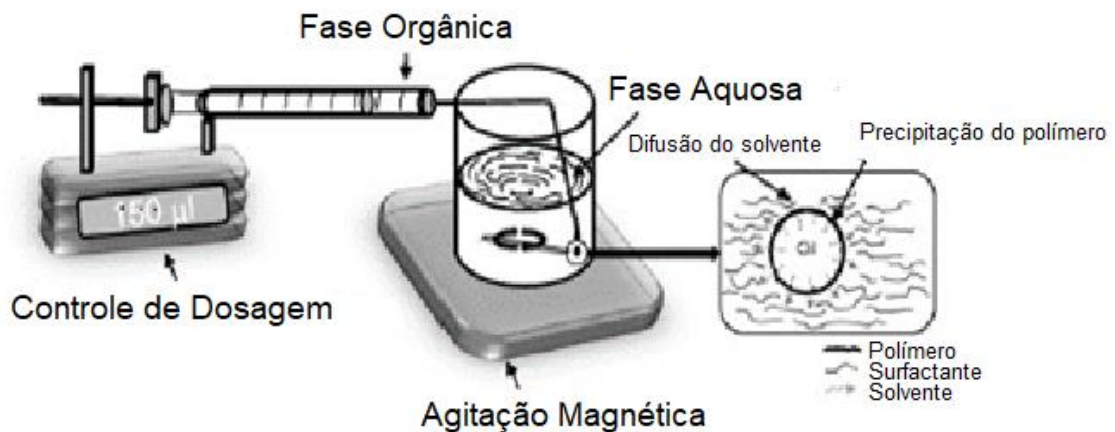


Figura 3.6. Preparo de nanocápsulas pelo método de nanoprecipitação (Fonte: Mora-Huertas, Fessi e Elaissari, 2010).

Na Figura 7 é possível observar o processo de formação de nanocápsulas poliméricas por precipitação.

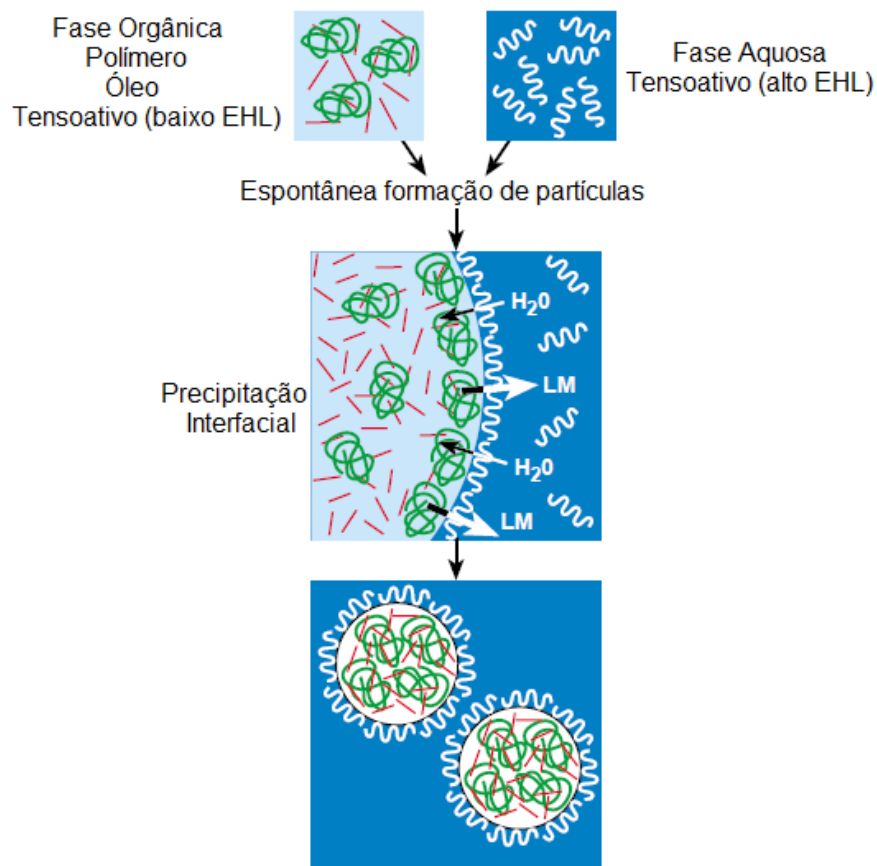


Figura 3.7. Formação de nanocápsulas pelo método de nanoprecipitação (Fonte: Horn e Rieger, 2001).

As principais variáveis da produção de nanocápsulas são: a) condição de adição de fase orgânica a fase aquosa; b) taxa de adição de fase orgânica; c) taxa de agitação da suspensão coloidal; d) evaporação de solvente; e) esfriamento da suspensão coloidal. Essa última etapa é feita a 4°C tem por objetivo sintetizar nanocápsulas com tamanho mais uniformes (Ezhilarasi et al., 2013; Mora-Huertas, Fessi e Elaissari, 2010).

Após a precipitação é necessário a evaporação do solvente, essa etapa pode ser realizada por liofilização, aspensão a quente ou por rotaevaporação (Fessi, 1988; Fessi et al., 1989; Forim et al., 2013).

Segundo Mora-Huertas, Fessi e Elaissari (2010), o tamanho da partícula obtida em escala laboratorial está entre 150 e 200 nm, podendo ser considerada uma nanocápsula, pois possui tamanho inferior a 500 nm (Hayles et al., 2017).

Em nanocápsulas poliméricas, utilizando como método de síntese a nanoprecipitação, os polímeros biodegradáveis comumente utilizados são os poliésteres alifáticos, como o poli ácido láctico (PLA), poli (ϵ -caprolactana) (PCL), poli

(lactíco-co-glicolídeo) (PGLA) e poli (hidroxi-butirato) (PHB) (Grillo et al., 2012; Schaffazick et al., 2003; Mora-Huertas, Fessi e Elaissari, 2010; Moinard-Checot et al., 2006).

3.2.2. Tensoativos

Tensoativos são moléculas anfílicas e apresentam afinidade com óleo e água por possuírem estruturalmente duas regiões: hidrofílica (polar) e hidrofóbica (apolar). Por este motivo promovem estabilidade nas emulsões, reduzindo a tensão interfacial (Morais, 2006; Delgado, 2013)

Griffin, em 1947, desenvolveu o diagrama de Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico (EHL), com valores de 0 a 20, que permite classificar numericamente as substâncias a partir de suas características, hidrofílicas e lipofílicas. Os valores de EHL aumentam a medida que o composto se torna mais hidrofílico (Figura 3.8) (Prista, Alves e Morgado, 1990).

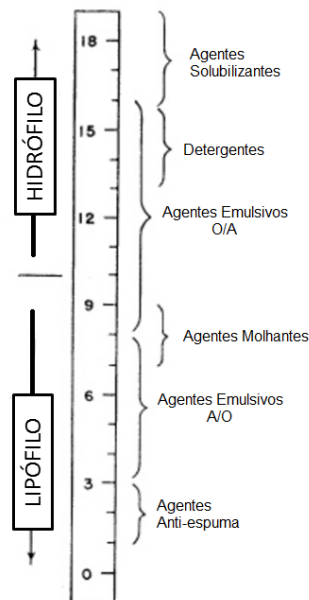


Figura 3.8. Escala de Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico segundo Griffin (Fonte: Prista, Alves e Morgado, 1990).

Este sistema auxilia na determinação das proporções das misturas de tensoativos na emulsão. O EHL de um óleo desconhecido pode ser determinado a partir de testes com faixas de EHL conhecidas, Equação 3.1. Na relação óleo/água

em que a emulsão estiver mais estável será correspondente ao valor do EHL do óleo (Prista, Alves e Morgado, 1990; Morais, 2006).

$$EHL_{req} = ((EHL A * \%A) + (EHL B * \%B))/100 \quad (3.1)$$

Onde, EHL req = valor do EHL do óleo;

A = tensoativo lipofílico;

B = tensoativo hidrofílico.

Os tensoativos, utilizados neste trabalho para a síntese de nanocápsulas poliméricas foram Span 60[®] ou monoesterato de sorbitano e Tween 80[®] ou monooleato de sorbitano, ambos são classificados como tensoativos não iônicos e apresentam o EHL, 4,7 e 15, respectivamente (Prista, Alves e Morgado, 1990). Segundo a escala de Griffin (Figura 3.9) o Span 60 é um tensoativo lipofílico, enquanto o Tween 80 é hidrofílico.

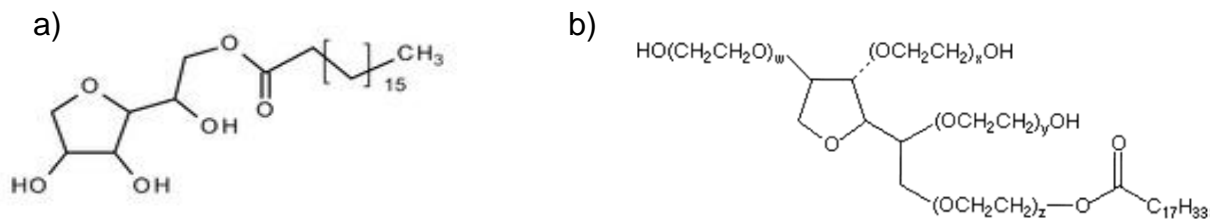


Figura 3.9. Estrutura química dos tensoativos, a) Span 60 e b) Tween 80, utilizados nesse trabalho (Fontes: Merck; Nair et al., 2003).

3.2.3. Polímeros Biodegradáveis

Polímeros biodegradáveis são polímeros ou copolímeros produzidos a partir de matérias-primas não renováveis, produzidos a partir de combustíveis fósseis e renováveis como: milho, cana-de-açúcar, celulose, quitina, entre outros. Polímeros derivados de recursos renováveis são alternativas promissoras aos tradicionais polímeros obtidos a partir de petróleo (Raquez et al., 2013).

O termo biodegradável é definido para materiais capazes de sofrerem decomposição em dióxido de carbono, metano, água, compostos inorgânicos e

biomassa (Brito et al., 2011). Entre os polímeros biodegradáveis mais comuns podemos citar: PLA, PHB, PCL, PHA (Polihidroxicarbonatos), entre outros.

O PLA ou poli (ácido láctico) é um poliéster alifático termoplástico, atóxico e hidrolisável, semicristalino ou amorfo, pouco deformável a tensão, com alta massa molar e temperaturas de transição vítrea (T_g) e de fusão cristalina (T_m) em torno de 57°C e 175°C , respectivamente (Brito et al., 2011; Rasal, Janorkar e Hirt, 2010; Raquez et al., 2013). Biocompatível, biodegradável e sintetizado a partir do ácido láctico obtido de fontes renováveis. O ácido láctico utilizado na preparação do PLA é proveniente de fontes contendo amido ou açúcar como: milho, trigo, beterraba, cana-de-açúcar e batata (Brito et al., 2011).

O PLA possui muitas vantagens com relação aos polímeros derivados de petróleo, como: “eco-friendly”, biocompatibilidade, boa processabilidade, pouco dependente de energia, podendo substituir alguns polímeros já reconhecidos e derivados de petróleo, como o PEAD (Polietileno de alta densidade), PP (Polipropileno), PS (Poliestireno), PA (Poliamida), PET (Polietileno tereftalato). Mas também apresenta algumas limitações como: baixa resistência térmica, hidrofobicidade, pouco reativo, pois não apresenta cadeias laterais (Figura 3.10) (Rasal, Janorkar e Hirt, 2010, Brito et al., 2011).

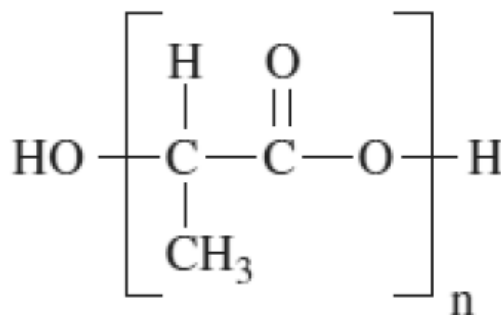


Figura 3.10. Estrutura molecular do PLA (Fonte: Brito et al., 2011).

Devido à presença de dois centros quirais o PLA apresenta dois isômeros ópticos: D-D-Lactato (D-LA) e L-L-Lactato (L-LA). Dois PLA opticamente inativos também estão disponíveis: meso-LA, bem como a mistura racêmica de L-LA e D-LA, chamada rac-LA (Raquez et al., 2013) (Figura 3.11).

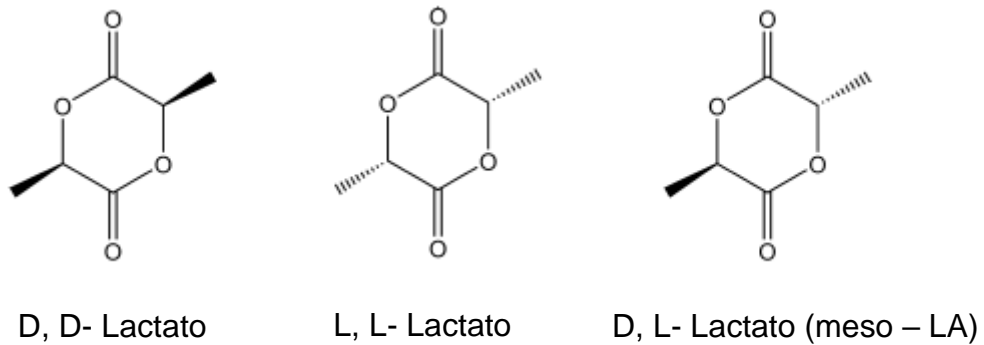


Figura 3.11. Estruturas químicas do PLA (Fonte: Raquez et al., 2013).

O PCL ou poli (ϵ -caprolactona) é um poliéster alifático termoplástico, atóxico e hidrolisável, semicristalino, solúvel em vários solventes orgânicos, baixas temperaturas de fusão (T_m) e transição vítrea (T_g), entre 59 e 64°C e -70°C, respectivamente (Figura 3.12). Sua cristalinidade tende a diminuir com o aumento da massa molar, que pode variar de 10.000 a 80.000 g mol⁻¹ (Sinha et al., 2004, Grillo et al., 2012, Domingues, 2006).

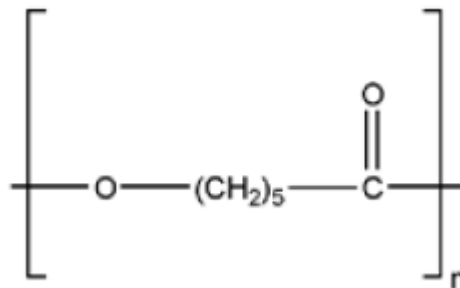


Figura 3.12. Estrutura molecular do PCL (Fonte: Domingues, 2006).

Ao contrário do PLA que conforme citado anteriormente é sintetizado a partir de fontes renováveis, o PCL é obtido de fontes fósseis, como o petróleo, porém ambos são facilmente biodegradáveis (Brito et al., 2011; Grillo et al., 2012; Sinha et al., 2004).

A degradação dos polímeros é causada por diversos fatores, que o leva a perda de suas propriedades físico-químicas. Algumas condições podem estimular a degradação dos polímeros, como fatores abióticos (sol, calor e umidade) e microrganismos (fungos e bactérias), chamados de biológicos ou bióticos (Lemos, 2017).

A degradação hidrolítica é comum em poliésteres, como PCL e PLA, neste mecanismo ocorre a difusão da água para o interior do polímero promovendo a quebra

de ligações ésteres (Lemos, 2017), esta difusão ocorre em diversas etapas. O processo de hidrólise inicia com a penetração da água em regiões amorfas onde esse acesso é facilitado devida a desordem das cadeias poliméricas. Após a penetração ocorre a degradação hidrolítica destas regiões, podendo ser verificada a queda da massa molar do polímero. Em seguida a água começa a penetrar lentamente nas regiões cristalinas ocorrendo perda da cristalinidade (Lemos, 2017).

O PLA reage com a H_2O e é convertido em ácido lático, Figura 3.13, sendo este degradado por microrganismos. No mecanismo proposto ocorre ataque enzimático pela ação destes microrganismos que irão metabolizar os fragmentos gerados, levando a decomposição do PLA (Lemos, 2017).

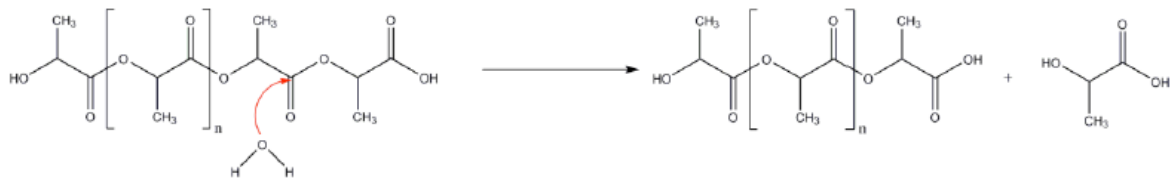


Figura 3.13. Reação de hidrólise do PLA (Fonte: Lemos, 2017).

A degradação hidrolítica do PCL ocorre por meio de hidrólise dos ésteres em presença de água. A perda de massa inicia-se pela difusão de pequenos fragmentos, Figura 3.14, originando o ácido 6-hidróxi capróico. Essa degradação ocorre mais lentamente quando comparado ao PLA, por exemplo (Lemos, 2017).

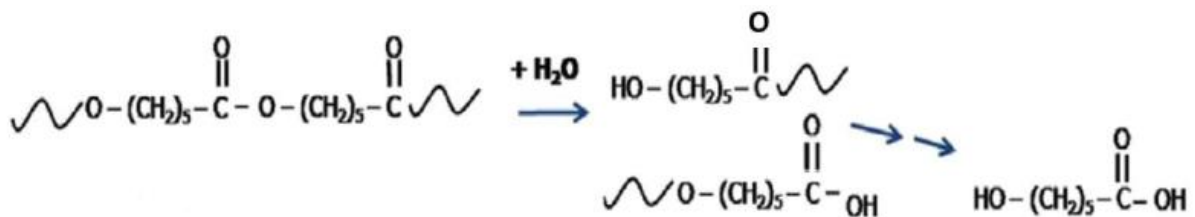


Figura 3.14. Reação de hidrólise do PCL (Fonte: Lemos, 2017).

O PLA e PCL são muito utilizados em nanocápsulas poliméricas principalmente devido a suas características de biodegradabilidade e biodisponibilidade. As nanocápsulas produzidas com PLA podem ser degradadas por ação enzimática ou hidrolisadas, demonstrando boa aplicação nos setores agrícolas e farmacêuticos. Colaborando com o meio ambiente, pois se decompõe em campo, sem deixar resíduos (Forim, 2014b). O PCL é bastante utilizado em sistema de liberação de

fármacos, já o PLA é utilizado em suturas por apresentar boa biocompatibilidade e biodegradabilidade ao serem degradados por hidrólises simples das cadeias de éster em condições fisiológicas e em meio aquoso. (Sinha et al., 2004, Kumar et al., 2010; Chandra e Rustgi, 1998).

A massa molar é um fator de extrema importância, pois afeta a resistência mecânica e a capacidade de sofrer hidrólise. A taxa de degradação está relacionada a cristalinidade e ao tipo de polímero e como suas cadeias estão distribuídas (Chandra e Rustgi, 1998; Montoro, 2010).

O PLA foi citado em duas patentes como biopolímeros possíveis de serem utilizados na síntese de nanocápsulas. Fessi (1988) sugeriu entre outros polímeros o PLA na síntese de nanocápsulas poliméricas com aplicações na indústria farmacêutica. Forim (2014a) também sugeriu entre outros polímeros biodegradáveis, a utilização de PLA, na síntese de nanocápsulas para aplicação agrícola. Esse autor sugeriu como princípio ativo no encapsulamento a utilização de óleo, juntamente com extrato de Nim e tensoativos.

Neste trabalho está sendo desenvolvido o encapsulamento polimérico, utilizando o PLA e PCL que ocorrerá pelo método de nanoprecipitação sugerido por Fessi (1988). O PCL já é conhecido como biopolímero bastante utilizado como matriz de liberação controlada, já o PLA tem poucas publicações a respeito, principalmente quando aplicado a agricultura, além de ser produzido a partir de fontes naturais. O princípio ativo é o produto comercial oleoso a base de Nim, composto principalmente por Azadiractina, Azamax[®]. Este insumo é aprovado para controle de pragas na agricultura orgânica de acordo com as normas: NOP-EUA, COR/CANADÁ, IBD/IFOAM, CEE889/08, DEMETER e a Lei Brasileira n° 10.831/2003.

3.3. **Ácaros – *Tetranychus urticae***

Os ácaros *Tetranychus urticae*, pertencem a ordem Acari e a família Tetranychidae. São popularmente conhecidos como ácaros rajados devido a sua coloração verde amarelada, apresentando par de manchas verde-escuro em seu dorso (Figura 3.15).



Figura 3.15. Foto da esquerda, ácaro *T. urticae*. (Fonte: Biostasia, 2019) e foto da direita, ácaros e ovos (pontos transparentes) (Fotos: Martha Horn).

As fêmeas são ovaladas e robustas com cerca de 0,5 mm de comprimento, apresentam longevidade de 10 a 30 dias, enquanto que os machos são menores e esguios, medindo cerca de 0,3 mm e longevidade de 15 a 40 dias. Sua reprodução pode ser sexuada ou partenogênica e as fêmeas depositam seus ovos entre os fios de teias. Os ovos são esféricos, medindo aproximadamente 0,14 mm, logo após a deposição são transparentes e a medida do tempo tornam-se opacos e vítreos, próximo a eclosão apresentam coloração amarelada (Flechtmann, 1972).

As teias produzidas por estes ácaros servem para facilitar o encontro do macho e da fêmea, dispersão dos ácaros, proteção contra chuvas e também para sua proteção de predadores, pois estes terão dificuldades de se movimentar por apresentar espaços pequenos entre as teias (Pacheco e Alves, 2017).

Os ácaros rajados são fitófagos, ou seja, alimentam-se exclusivamente de plantas, perfurando as células da epiderme de folhas, sugando o seu conteúdo celular e cloroplastos, impedindo assim que a planta realize fotossíntese (Pacheco e Alves, 2017). Altas infestações causam a descoloração de folhas, perda da capacidade de realizar a fotossíntese, causando a eventual morte de folhas e plantas (Veronez, Sato e Castro, 2012; Martínez-Villar et al., 2005; Knapp e Kashenge, 2003; Dabrowski e Seredyńska, 2007).

Segundo Moraes e Fletchtmann (2008), sua disseminação ocorre pelo vento de forma natural ou pelo contato entre folhagens de plantas, por meio de vegetais infestados e transportados de uma área a outra ou ainda por meios de ferramentas ou utensílios agrícolas. O cultivo protegido aumenta o risco de infestação, pois a

temperatura elevada e a umidade relativa baixa são favoráveis ao seu desenvolvimento.

Esses ácaros são importantes pragas encontrados em diversas culturas no Brasil, como morangueiros, feijoeiros, mamoeiros, pessegueiros e plantas ornamentais (Veronez, Sato e Castro, 2012). Principalmente devido ao controle incorreto ou não controle da praga, podendo reduzir em até 80% a produção de frutas (Moraes, 2008). O *T. urticae* tornou-se um grave problema devido ao uso de pesticidas que ocasionou a redução de seus inimigos naturais (Martínez-Villar et al., 2005) e ao elevado potencial reprodutivo e curto ciclo de vida, que acaba favorecendo a resistência de acaricidas (Stumpf e Nauen, 2001).

Atualmente a exigência do mercado consumidor por produtos de padrão de qualidade e segurança alimentar, a procura por alimentos mais saudáveis e isentos de produtos químicos, impulsionam o surgimento de pesticidas a base de plantas, entre elas o óleo de Nim e o controle biológico com ácaros predadores (Martínez-Villar et al., 2005; Veronez, Sato e Castro, 2012; Soto et al., 2010; Moraes e Flechtmann, 2008; Moharramipour e Ayyari, 2018).

Knapp e Kashenge (2003) realizaram ensaios com o ácaro *T. urticae* com diferentes nanoformulações de Nim comerciais. As folhas utilizadas nos ensaios foram mergulhadas durante 5 segundos em diferentes diluições. Após 24 horas, a mortalidade encontrada foi de 95,6%, além de apresentarem redução na oviposição, para a marca Neemroc EC.

Os autores Veronez, Sato e Castro (201), Schlesener et al. (2013) e Martínez-Villar et al. (2005) pulverizaram óleo de Nim sob diferentes concentrações em folhas para o acompanhamento de mortalidade e redução da oviposição do *T. urticae*. Os resultados encontrados para a mortalidade foram superiores a 90%.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

Azamax[®]- UPL do Brasil – Indústria e Comércio de Insumos Agropecuários S/A – Ituverava SP (Acesso ao Patrimônio Genético como produto intermediário solicitado (SisGen Cadastro A26AB90, p. 1-2), Anexo 1.

Poli (ácido láctico) – PLA, Mw 119.000 g mol⁻¹ (PLA 4060D, Nature Works, EUA)

Poli (ε-caprolactona) – PCL, Mw 50.000 g mol⁻¹ (CAPA 6500, Nature Works, EUA)

Água Ultrapura–Milli Q, Milipore

Span 60[®]- Plury Química

Tween 80[®] - Synth

Acetona PA- Synth

Padrão de Azadiractina 95% – Sigma Aldrich

Metanol grau HPLC – J. T. Backer

Acetonitrila grau HPLC – J. T. Backer

SiO₂ Fumed – Aldrich

4.2. Metodologia

4.2.1. Caracterização dos produtos utilizados para a síntese de nanocápsulas

4.2.1.1. Extração líquido-líquido do Azamax

O produto comercial Azamax® é constituído do princípio ativo Azadiractina, 12 g L⁻¹ (1,2% m/v) e 988 g L⁻¹ (98,8% m/v) de outros componentes emulsionáveis. Indicação de uso é como inseticida e acaricida do grupo dos tetratriterpenóides (FISPQ - Azamax®).

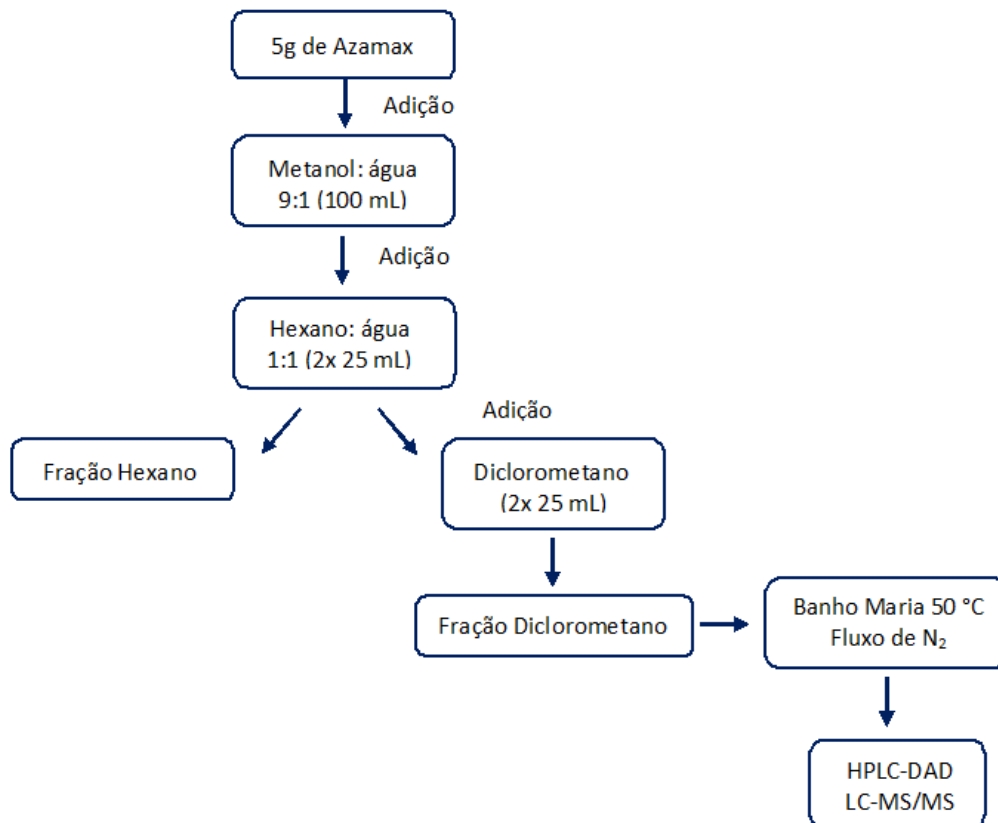


Figura 0.1. Fluxograma do processo de extração e análise do Azamax.

Para as análises e caracterizações tornou-se necessária a extração do princípio ativo, a extração líquido-líquido foi realizada conforme Barrek et al., 2004 e Yamasaki et al., 1986 (Figura 4.1). Após a extração obteve-se 2 frações: diclorometano e hexano. Na fração de diclorometano, foi analisada a concentração do princípio ativo Azadiractina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC-DAD), perfil

cromatográfico a partir do Cromatógrafo Líquido acoplado ao Espectrômetro de massas (LC-MSMS), estas análises foram realizadas para identificação da composição do produto.

Na fração do hexano foi realizado o perfil cromatográfico, através de Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de massas, para qualificar a composição de compostos voláteis do óleo em estudo.

4.2.1.2. Desenvolvimento e validação de método analítico para a Quantificação da Azadiractina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

4.2.1.2.1 Condições Cromatográficas – HPLC-DAD

A quantificação da Azadiractina foi realizada por HPLC, marca Shimadzu, com as configurações, desgaseificador DGU-20AT, bomba LC-20AT, auto amostrador Sil 20AHT, forno CTO-20A, detector DAD SPD-M20A. A metodologia foi baseada e adaptada reportada por Forim et al., 2010.

As condições de análises foram:

- ✓ Coluna utilizada foi CLC-ODS (M), Shim-pack, 150 x 4,6 mm ID e pré-coluna G-ODS-4, Shim-pack, 10 x 4.0 mm ID;
- ✓ Fase móvel: Acetonitrila: água ultrapura (65: 35);
- ✓ Detector de rearranjo de diodos, comprimento de onda 201 nm;
- ✓ Fluxo de 1,1 mL min⁻¹;
- ✓ Volume de injeção de amostra 20 µL;
- ✓ Temperatura do forno 30°C;
- ✓ Tempo de corrida de 10 min.

A curva foi construída a partir da diluição do padrão Azadiractina (Sigma Aldrich), em metanol, com 8 pontos e concentrações entre 0,5 a 200 mg L⁻¹.

4.2.1.2.2 Validação do Método

- Linearidade

Linearidade de um método refere-se à proporcionalidade das concentrações de interesse e a resposta obtida. Para a determinação é necessária a construção de

uma curva analítica que será relacionada a área ou altura do pico cromatográfico versus a concentração do analito.

A avaliação da linearidade foi obtida com a preparação de 3 curvas com diferentes concentrações de Azadiractina. Após as leituras no HPLC os gráficos área dos picos versus concentração (mg L^{-1}) foram construídos e a proporcionalidade entre concentração e sinal do equipamento foram verificados mediante o cálculo do coeficiente de correlação linear (r^2) e equação da reta ($y = ax + b$). Foi considerado o coeficiente linear mínimo de 0,99.

- Seletividade

Seletividade é a capacidade que através de um método é possível determinar a concentração de determinado analito sem a interferência de impurezas, produtos de degradação em uma amostra complexa.

Neste trabalho a seletividade foi avaliada com o objetivo de identificar possíveis interferentes da nanoformulação nos resultados obtidos nos testes de Eficiência de Encapsulamento (% EE). Desta forma foram sintetizados nanocápsulas com os dois polímeros, PCL e PLA, porém sem a adição do Azamax a sua nanoformulação. Foram analisados como forma de validar a seletividade do método a adição de padrão nas concentrações de 10 e 50 mg L^{-1} .de Azadiractina.

- Precisão e exatidão

A precisão é determinada para verificar a concordância de resultados de uma amostra ou solução padrão de maneiras repetidas. A exatidão informa o grau de concordância entre os resultados obtidos.

A precisão e exatidão foram verificadas por análises inter e intraensaios. A exatidão e precisão intraensaios (repetibilidade) foram determinados por 10 análises de 3 diferentes concentrações (1, 5 e 200 mg L^{-1}) realizadas no mesmo dia.

A exatidão e precisão interensaios (intermediária) foram realizadas nas mesmas condições e concentrações, porém analisadas em triplicata e em cinco dias consecutivos.

A precisão é obtida pelo coeficiente de variação:

$$CV \% = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (4.1)$$

Em que CV é o coeficiente de variação, S é o desvio padrão e X é a média dos valores obtidos.

O valor aceitável de $CV \leq 5\%$

A exatidão é a relação entre a concentração obtidas nos estudos de intra e interensaios e a concentração teórica:

$$E \% = \frac{\text{valor obtido} - \text{valor teórico}}{\text{valor teórico}} \times 100 \quad (4.2)$$

O intervalo aceitável $-10 \leq e \leq 10\%$.

- Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade de um analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada.

O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão.

Ambos foram calculados com o auxílio do software Labsolution a partir da curva de calibração. Utilizando como cálculo:

LD = desvio padrão do intercepto x 3,3 / Coeficiente angular da reta

LQ = desvio padrão do intercepto x 10 / Coeficiente angular da reta

4.2.1.2.3 Identificação de compostos presentes no óleo de Nim por LC-MSMS

A extração líquido-líquido do produto Azamax resultou em um líquido amarelo, proveniente da fração de diclorometano, que foi diluído com H₂O: acetonitrila e injetada 10 µL desta amostra no LC-MSMS. O objetivo foi identificar os compostos presentes no óleo de Nim, através de uma varredura (Scan), com a utilização do ionizador ESI, operando no modo positivo e negativo. O modo positivo foi adicionado ácido fórmico a água ultra-pura, e o modo negativo formiato de amônio.

O equipamento utilizado neste estudo foi LC-MSMS marca Shimadzu, as configurações do LC Nexera X2, desgaseificador DGU-20A 5R, bomba LC-30AD, auto amostrador Sil 30AC, forno CTO-30A, detector UV SPD-20A e o analisador de massas LCMS-8040. As condições de análises foram:

✓ Coluna utilizada foi XR-ODS III, Shim-pack, 150 x 2,0 mm ID;

- ✓ Fase móvel: Acetonitrila: água ultrapura (60: 40);
- ✓ Detector de ultravioleta, comprimento de onda 215 nm;
- ✓ Fluxo de 0,2 mL min⁻¹;
- ✓ Volume de injeção de amostra 10 µL;
- ✓ Temperatura do forno 40°C;
- ✓ Tempo de corrida de 60 min;
- ✓ Temperatura do bloco e da probe, 135°C e 300°C, respectivamente;
- ✓ Fluxos de gás de nebulização e dessolvatação, 1 L min⁻¹ e 6 L min⁻¹.

4.2.1.2.4 Identificação dos Compostos Presentes no óleo de Nim por GCMS

Após a extração líquido-líquido a fração hexanóica foi separada para análises de perfil cromatográfico dos ácidos graxos presentes no óleo de Nim, utilizando o GCMS.

Na fase hexanóica, oriunda da extração do óleo de Nim, foram realizados dois ensaios: ácidos graxos e compostos voláteis. Estas análises tiveram como objetivo identificar seus compostos e garantir a composição do produto.

As análises de ácidos graxos, partem da fase hexanóica, onde a amostra foi evaporada e novamente dissolvida em 1 mL de éter etílico e, os ácidos graxos livres foram derivatizados aos seus ésteres metílicos pelo reagente trifluoreto de boro 3% em metanol (BF₃-MeOH (3%)). A mistura foi aquecida a 85°C por 1 hora e em seguida foi resfriada e extraída com n-hexano (3 vezes). O extrato foi seco sob fluxo de nitrogênio e novamente dissolvido a uma concentração de 1 mg mL⁻¹, filtrado (PTFE 0,45 µm) e analisado no GCMS. Já na análise de compostos voláteis não foi necessário o preparo, utilizou-se o extrato hexanóico filtrado com filtro seringa PTFE 0,45 µm (Oshiobugie, Olaniyi e Raphael, 2017, Hossain et al., 2013).

O equipamento utilizado foi GCMS marca Shimadzu, modelo QP2010 Ultra, auto amostrador AOC-5000 Plus, a identificação dos compostos foi baseada na comparação dos espectros obtidos com os descritos na biblioteca do software (Mass Spectral Database NIST/EPA/NIH).

As análises de ácidos graxos utilizaram a seguinte metodologia: coluna capilar de sílica fundida de baixa polaridade; fase ligada 5% difenil e 95% dimetilpolissiloxano RTx-5MS de (Restek, 30 m de comprimento x 0,25 mm *d.i.*, 0,25 µm de espessura de filme); velocidade linear 19,6 mL min⁻¹ com gás Hélio (He); pressão da coluna 48,0

kPa; volume de injeção de amostra 1 μL ; temperatura do injetor 250°C; rampa do forno 60 a 250°C: 5 minutos a 60°C, 10 minutos de 60°C a 250°C e 30 minutos a 250°C; ionização eletrônica 70eV; varredura de m/z de 40 a 500 Da; temperatura da fonte de íons e interface, 260°C e 280°C, respectivamente.

Para a análise de compostos voláteis as configurações utilizadas foram: coluna capilar de sílica fundida de baixa polaridade; fase ligada 5% difenil e 95% dimetilpolissiloxano RTx-5MS de (Restek, 30 m de comprimento x 0,25 mm *d.i.*, 0,25 μm de espessura de filme); velocidade linear de 23,4 mL min^{-1} , com gás de arraste Hélio (He); pressão na coluna de 50,8 kPa; volume de injeção de 1 μL ; temperatura do injetor de 220°C e rampa de aquecimento do forno de 60°C - 280°C (3°C/min). O espectrômetro de massa foi utilizado no modo de ionização eletrônica a 70 eV, com varredura de m/z de 40 a 800 Da. A fonte de íons foi mantida a 260°C e a interface a 280°C.

4.2.1.2.5 Determinação do EHL

A determinação do EHL do Azamax foi realizada experimentalmente. As emulsões foram preparadas por aquecimento em banho-maria a 75°C, as duas fases, oleosa e aquosa separadamente. Posteriormente as fases foram unidas, mantendo o aquecimento e agitando por 15 minutos. Decorrido este tempo as emulsões foram retiradas do banho-maria, mantendo-se sob agitação por 15 minutos em temperatura ambiente. Após as amostras foram mantidas em repouso e temperatura ambiente por 24 horas. Ao final deste período as amostras foram analisadas (Zanin et al.,2002, Prista, Alves e Morgado, 1990). Algumas amostras também foram analisadas por microscópio óptico (marca BW Optics, modelo MPL620-2, aumento 10x).

Os surfactantes utilizados nos testes foram o Tween 80 (EHL 15,0; fase aquosa) e o Span 60 (EHL 4,7; fase orgânica), foram realizados cinco diferentes testes com diferentes concentrações dos tensoativos (Tabela 2). Os valores de EHL foram calculado com na base na equação 3.1.

Tabela 4.1. Composição das emulsões preparadas para determinação do EHL do Azamax.

Emulsão	Span 60 % (massa)	Tween 80 % (massa)	Óleo (mL)	Água (mL)	EHL* (mistura)
1	80 (2,00 g)	20 (0,50 g)	5	42,5	6,76
2	70 (1,75 g)	30 (0,75 g)	5	42,5	7,79
3	60 (1,50 g)	40 (1,00 g)	5	42,5	8,82
4	50 (1,25 g)	50 (1,25 g)	5	42,5	9,85
5	40 (1,00 g)	60 (1,50 g)	5	42,5	10,88

* Valor calculado teoricamente (Prista, Alves e Morgado, 1990).

4.2.2. Síntese de Nanocápsulas

A síntese de nanocápsulas a partir do processo de nanoprecipitação seguiu a metodologia proposta por Fessi e seus colaboradores (1989), no que se refere ao processo de mistura de 2 fases com leve agitação. A nanoprecipitação ocorre em 4 etapas: 1) solubilização dos compostos em fase orgânica e aquosa; 2) mistura das 2 fases; 3) agitação para evaporação da acetona; e 4) evaporação do solvente.

Na primeira etapa a fase orgânica, ou fase A, é constituída de óleo (Azamax), polímero (PLA 4060D ou PCL CAPA 6500), surfactante (Span 60) e acetona. Esta etapa é feita sob agitação magnética, temperatura a 40°C, até a completa dissolução dos compostos. A fase B, ou fase aquosa, é constituída de surfactante (Tween 80) e água, preparada sob agitação magnética.

Na segunda etapa, ocorre a adição da fase A à fase B, com leve agitação. A terceira etapa, a agitação deve ser mantida por 30 min após a mistura completa, formando a emulsão (solução torna-se leitosa devido a precipitação) e para que parte da acetona seja eliminada. Na quarta etapa foram utilizadas duas técnicas de evaporação de solvente: a) liofilização e b) rotaevaporação, conforme Figura 17.

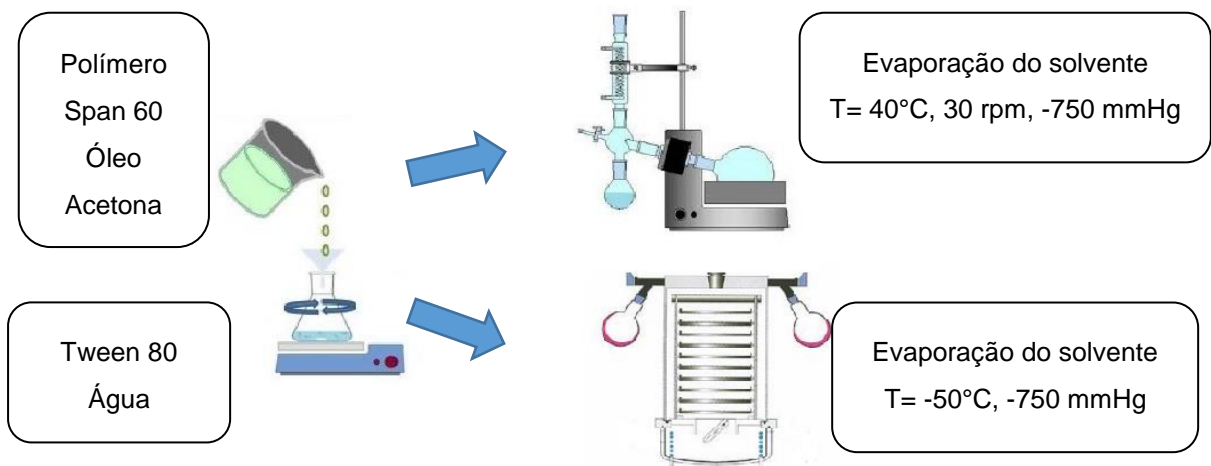


Figura 0.2. Ilustração da síntese de nanocapsulas, utilizando o rotaevaporador e liofilizador para a evaporação do solvente.

Os testes estão apresentados na Tabela 4.2 com as diferentes nanoformulações, alterando o tipo e quantidade de polímeros e surfactantes, e os tipos de evaporação de solvente. Nas amostras em que foram alteradas as quantidades de surfactantes, considerou-se a relação entre Span 60 e Tween 80, calculadas através do EHL, 60 e 40%, respectivamente.

Os diferentes testes foram realizados com o objetivo de obter a formação de nanocápsulas, com menores tamanhos de partículas e boa dispersividade, evitando assim a agregação.

Dois diferentes polímeros foram utilizados, o PLA e PCL, com o objetivo de comparar os polímeros na obtenção de partículas, já que a maior parte dos trabalhos utilizam o PCL, como polímero no processo de nanoprecipitação e/ou encapsulamento de óleo e/ou extrato de Nim (Forim et al., 2013; Pasquoto-Stigliani et al., 2017; Carvalho et al., 2015; Giongo, Vendramim e Forim, 2015; Costa et al., 2013).

As nomenclaturas mencionadas na Tabela 3 indicam: NC – nanocápsulas, X – número do teste, L ou R – evaporação por Liofilização (L) ou Rotaevaporação (R), **a** ou **c** – referenciam o polímero utilizado nos testes, PLA (a) e PCL (c).

Neste trabalho, a concentração de surfactante foi variada entre 0,2 a 0,85% m/m, e a concentração do polímero, entre 0,1 e 0,5% m/m, baseando-se nas condições otimizadas reportadas por Fessi (1988). As nanoformulações NC3La e NC15Ra foram adicionadas maior quantidade de acetona, já as NC8La, NC9Lc, NC20Ra e NC21Rc foram mantidas por 24 horas em geladeira, após a precipitação. Estes ensaios foram precisamente realizados pois em diferente proporção de

solventes ou diminuição de temperatura, poderia ocasionar tamanho de partículas menores.

Além das nanoformulações com óleo, foram preparadas nanoformulações sem óleo, com 0,1% m/m de polímero PLA ou PCL denominadas NC25Ra e NC26Rc, respectivamente. Essas nanoformulações foram caracterizadas e utilizadas como “brancos” sob o objetivo de verificar a eventual influência dos polímeros nos diferentes testes realizados.

Após a formação das nanocápsulas se faz necessária a etapa de evaporação do solvente (etapa 4), realizada por duas técnicas diferentes: liofilização e rotaevaporação, esta etapa era interrompida ao volume final de aproximadamente 50 mL. As condições experimentais de cada técnica foram otimizadas, com o objetivo de obter-se um menor tamanho de partícula e cápsulas mais estáveis.

Tabela 4.2. Identificação das diferentes nanoformulações testadas.

Nanoformulações	Composição							Surfactante Total (%)**
	Fase orgânica				Fase aquosa			
	Azamax (g)	Span 60 (g)	Polímero		Acetona (mL)	Tween 80 (g)	Água ultrapura (mL)	
% (massa)			Tipo					
NC1La	1	0,3	0,1 (0,3 g)	PLA	81	0,2	159	0,2
NC2La	1	0,3	0,2 (0,6 g)	PLA	81	0,2	159	0,2
NC3La	1	0,3	0,1 (0,3 g)	PLA	100	0,2	159	0,2
NC4Lc	1	0,3	0,1 (0,3 g)	PCL	81	0,2	159	0,2
NC5La	1	0,3	0,4 (0,9 g)	PLA	81	0,2	159	0,2
NC6La	1	0,3	0,5 (1,2 g)	PLA	81	0,2	159	0,2
NC7Lc	1	0,3	0,4 (0,9 g)	PCL	81	0,2	159	0,2
NC8La*	1	0,3	0,1 (0,3 g)	PLA	81	0,2	159	0,2
NC9Lc*	1	0,3	0,1 (0,3 g)	PCL	81	0,2	159	0,2
NC10La	1	0,6	0,1 (0,3 g)	PLA	81	0,4	159	0,4
NC11La	1	0,9	0,1 (0,3 g)	PLA	81	0,6	159	0,6
NC12La	1	1,1	0,1 (0,3 g)	PLA	81	0,8	159	0,8
NC13Ra	1	0,3	0,1 (0,3 g)	PLA	81	0,2	159	0,2
NC14Ra	1	0,3	0,2 (0,6 g)	PLA	81	0,2	159	0,2
NC15Ra	1	0,3	0,1 (0,3 g)	PLA	100	0,2	159	0,2
NC16Rc	1	0,3	0,1 (0,3 g)	PCL	81	0,2	159	0,2
NC17Ra	1	0,3	0,4 (0,9 g)	PLA	81	0,2	159	0,2
NC18Ra	1	0,3	0,5 (1,2 g)	PLA	81	0,2	159	0,2
NC19Rc	1	0,3	0,4 (0,9 g)	PCL	81	0,2	159	0,2
NC20Ra*	1	0,3	0,1 (0,3 g)	PLA	81	0,2	159	0,2
NC21Rc*	1	0,3	0,1 (0,3 g)	PCL	81	0,2	159	0,2
NC22Ra	1	0,6	0,1 (0,3 g)	PLA	81	0,4	159	0,4
NC23Ra	1	0,9	0,1 (0,3 g)	PLA	81	0,6	159	0,6
NC24Ra	1	1,1	0,1 (0,3 g)	PLA	81	0,8	159	0,8
NC25Ra	0	0,3	0,1 (0,3 g)	PLA	81	0,2	159	0,2
NC26Rc	0	0,3	0,1 (0,3 g)	PCL	81	0,2	159	0,2
NC13Ra7	1	0,3	0,1 (0,3 g)	PLA	81	0,2	159	0,2
NC16Rc7	1	0,3	0,1 (0,3 g)	PCL	81	0,2	159	0,2

* Indica que após a mistura ficou sob agitação magnética durante 24 h para maior evaporação dos solventes.

** Surfactante total refere-se a soma do Span 60 e Tween 80.

NC13Ra7 e NC16Rc7, são as amostras que o pH final foi ajustado a 7,0.

Nas nanoformulações NC13Ra7 e NC16Rc7, o pH foi ajustado a aproximadamente 7,0, com o auxílio de solução de NaOH 0,05 M. O ajuste foi necessário em função da aplicação destas formulações serem em ambiente de pH próximo ao neutro e assim evitar a degradação do princípio ativo (Forim et al., 2013; Forim 2014a; Barrek et al., 2004).

4.2.3. Caracterização das Suspensões Coloidais

4.2.3.1. Distribuição de Tamanho Médio das Partículas, Índice de Polidispersão, Potencial Zeta e pH em Suspensão Coloidal

A medida do tamanho médio de partículas, índice de dispersão e potencial zeta, foram realizadas por meio da técnica de Dispersão Dinâmica de Luz (DLS). Nessas análises foi utilizado o equipamento Zetasizer Nano Zs, modelo Zen 3600, marca Malvern Instruments. As amostras foram diluídas na proporção de 1:100 (v/v) em água ultrapurificada e transferidas para a cubeta de análise.

A distribuição de tamanho médio das partículas é realizada através do diâmetro hidrodinâmico da amostra. A amostra é iluminada por um feixe de luz na suspensão, a captação do espalhamento dessa luz é realizada por um detector posicionado em um ângulo fixo e transformada em sinal elétrico. O detector captura a intensidade da luz com influência da movimentação das partículas, devido ao movimento Browniano. Partículas pequenas se movimentam com maior velocidade, apresentando rápidas flutuações de intensidade de luz, enquanto as maiores, são mais lentas, causando uma lenta flutuação de intensidade (Fonseca, 2012).

A polidispersão (Pdl) indica a homogeneidade de tamanho das partículas na nanosuspensão. Pode-se considerar que valores baixos (inferior a 0,5) indicam que há uma pequena variação no tamanho das nanopartículas (Shaffazick, 2003).

O potencial zeta é a medida do potencial da superfície das partículas, os tensoativos e polímeros irão influenciar no valor desta medida, pois estarão na superfície externa destas partículas. A técnica utilizada para determinação é a eletroforese, que consiste na aplicação de um campo elétrico a dispersão de partículas, ocasionando o deslocamento em direção ao eletrodo de carga oposta. O

potencial zeta é medido a partir da velocidade de migração das partículas e quanto maior o seu valor, mais estável ela será, pois, valores elevados causam maior repulsão entre as nanopartículas evitando que ocorra o agrupamento (Shaffazick, 2003).

4.2.3.2. Eficiência de Encapsulamento das Suspensões Coloidais

A determinação da eficiência de encapsulamento (% EE) foi realizada seguindo a metodologia reportada por Forim et al., 2013, que consiste na determinação da quantidade total e do princípio ativo livre na suspensão, através da equação 4.3.

A eficiência de encapsulamento (% EE) foi calculada e pode ser expressa pela equação:

$$\%EE = [(total\ de\ Aza - Aza\ livre)/total\ de\ Aza] * 100 \quad (4.3)$$

Para a determinação total de Azadiractina foi necessário utilizar um solvente para que ocorresse a ruptura das nanocápsulas. O solvente utilizado foi acetona, adicionando-se 0,3 mL de nanosuspensão e 2,7 mL de acetona em um tubo de ensaio e deixou-se em repouso por 2 horas e após foi centrifugado em centrífuga (Thomas Scientific Brand, por 30 min). Retirou-se uma alíquota de 1,5 mL do sobrenadante e este foi evaporado com N₂ e após ressuspendido com 1,5 mL de metanol, filtrado em filtro PTFE 0,45 µm e analisado no HPLC-DAD.

Na determinação do princípio ativo livre, utilizou-se 0,5 mL da nanosuspensão coloidal e foi utilizado o processo de ultrafiltração-centrifugação com a utilização de filtro para centrífuga Amicon® Ultra 0,5 mL, 10 kDa, após a centrifugação as amostras foram analisadas no HPLC (Schaffazick et al., 2003).

Os valores de pH foram determinados a partir da suspensão de nanocápsulas, com o auxílio de um pHmetro da marca Metrohm, modelo 827 pH lab, previamente calibrado com soluções tampão pH 7,0 e 4,0 (SpecSol).

4.2.3.3. Avaliação morfológica em Suspensão Coloidal - Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A morfologia das amostras foi realizada com a utilização do Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET), marca FEI, modelo Tecnai G2T200. Os ensaios foram realizados com alíquotas de 10 μ L das amostras NC13Ra e NC16Rc (melhores nanoformulações) e NC25Ra e NC26Rc (nanoformulações sem óleo). As amostras foram previamente fixadas com acetato de uranila, dispostas em grids de cobre e secas em temperatura ambiente.

4.2.3.4. Estabilidade das Suspensões Coloidais

A estabilidade das suspensões coloidais foi realizada com o objetivo de compreender o comportamento destas nanoformulações em diferentes temperaturas, -20°C , 4°C e 20°C , durante o período de 6 meses de armazenamento. Para isto foram retiradas alíquotas de 10 mL das amostras NC1La, NC4Lc, NC13Ra e NC16Rc, recém preparadas, a escolha destas nanoformulações foram devido aos resultados obtidos na caracterização. Os critérios para escolha das melhores suspensões foram: tamanho de partícula (150 e 300 nm), índice de polidispersão (IP), $< 0,6$ e %EE, $> 90\%$, baseados em dados de literatura (Fessi, 1988, Schaffazick et al., 2003, Forim et al., 2013, Losa et al., 1993).

Os ensaios realizados foram pH, uma vez por mês e os parâmetros % EE, tamanho de partícula, potencial zeta, índice de polidispersão, no tempo zero e no final de seis meses (Schaffazick et al., 2003; Calvo, Vila-Jato e Alonso, 1996; Guterres, et al. 1995; Fessi et al., 1989).

A determinação do pH tem por objetivo obter informações a respeito da estabilidade das suspensões, pois variações nesse parâmetro indicam a degradação polimérica (Guterres et al., 1995; Paul et al., 1997; Fonseca, 2012).

As análises realizadas no tempo inicial e após o período de 6 meses tiveram como objetivo observar o comportamento das suspensões com relação a liberação do princípio ativo e da aglomeração das nanopartículas em suspensão (Schaffazick et al., 2003; Calvo, Vila-Jato e Alonso, 1996; Guterres et al., 1995).

4.2.3.5. Liberação Controlada, in Vitro, de Azadiractina em nanosuspensão coloidal

A liberação controlada foi realizada nas nanoformulações NC13Ra (0,1% PLA) e NC16Rc (0,1% PCL), utilizou-se membranas de acetato celulose 14000:25 mm (Sigma Aldrich) como sacos de diálises. Os sacos foram hidratados com água ultrapura, 30°C, durante 30 minutos, após foram preenchidos por 3,6 mL de suspensão, imersos 20 mL de tampão fosfato salino - PBS (pH 7,4), utilizado como meio de liberação. O béquer foi fechado com parafilme com o objetivo de evitar a evaporação do meio e conservar a temperatura de 30°C ± 2°C, utilizando agitação magnética, 250 rpm, para garantir a homogeneidade (Riyajan e Sakdapipanich, 2010; Sittipummongkol e Pechyen, 2018; Almouazen et al., 2013; Forim et al., 2013; Antonow, 2012).

Alíquotas de 1 mL do meio de liberação foram coletadas em intervalos de tempos pré-determinados (0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 horas). A cada retirada de alíquotas, era recolocado a mesma quantidade de meio de liberação a fim de manter o volume constante. As amostras foram filtradas em filtros de acetato celulose 0,45 µm e analisadas no HPLC-DAD para a determinação da concentração de Azadiractina liberada.

Os dados cinéticos foram avaliados pelo modelo matemático de Korsmeyer e Peppas (1981). Indicado na equação 4.4. Esse modelo foi aplicado em outros estudos para determinação da liberação controlada de fármacos e agroquímicos (Forim et al., 2013; Cruz, 2005; Antonow, 2012; Sittipummongkol e Pechyen, 2018; Kumar et al., 2010; Kaushik et al., 2013; Shakil et al., 2010).

$$M_t/M_\infty = kt^n \quad (4.4)$$

Onde k é a constante que incorpora características estruturais e geométricas do transportador n , mecanismo de liberação. M_t/M_∞ é a fração do princípio ativo liberado em função do tempo e t o tempo em horas

O valor de n está relacionado com a forma geométrica do sistema carregador que irá determinar o mecanismo desta liberação. Sistemas com formas geométricas

esféricas apresentam os seguintes mecanismos de liberação: $n < 0,43$ indica processo de difusão através das paredes poliméricas; $n > 0,85$ erosão da matriz polimérica; e entre 0,43 e 0,85, transporte anômalo, combinação entre difusão e erosão (Siepmann e Peppas, 2001).

4.2.4. Análise de Degradação Térmica

Os principais produtos utilizados nas sínteses das nanocápsulas foram analisados por medidas termogravimétricas (TGA), com a finalidade de conhecer o comportamento térmico dos compostos Azamax®, PCL, PLA,

As análises termogravimétricas (TGA) foram realizadas com a utilização do equipamento, modelo TGA 4000, marca Perkin Elmer. Utilizou-se aproximadamente 10 mg de massa e o aquecimento de 25°C a 700°C, taxas de 10°C e o nitrogênio, utilizado como gás inerte, com fluxo de 50 mL min⁻¹ (Fonseca, 2012).

Ao Azamax e a algumas suspensões coloidais, NC1La, NC4Lc, NC13Ra, NC16Rc foram também realizados testes de degradação térmica assistida, com o objetivo de estudar a sensibilidade do produto quando exposto a temperatura de 60°C (Costa, 2014). Alíquotas de 1,5 g de Azamax e 0,3 mL das suspensões, dispostos em vial de vidro de 2 mL (fechados), foram submetidas ao aquecimento em estufa (modelo SL-102, marca Solab), a temperatura de 60±3°C, durante 48 horas. As escolhas das amostras tiveram o objetivo de comparar as nanoformulações tanto aos tipos de polímeros, formas de evaporação de solventes e avaliar qual poderia proteger termicamente a Azadiractina.

Nesta análise foi acompanhado o comportamento da Azadiractina exposta ao calor, através da concentração inicial do princípio ativo e após 5, 10, 24, 29, 34 e 48 horas de exposição (Costa, 2014).

Segundo Forim (2006), a Azadiractina é facilmente degradada. Sua concentração pode ser reduzida a 60% após 4 horas, podendo chegar a 50% em 15 horas, quando exposta a temperaturas acima de 50°C e a luz solar (Martinez, 2002).

4.2.5. Análise de Fotodegradação

Os estudos de fotodegradação foram realizados com o Azamax e as amostras NC1La, NC4Lc, NC13Ra e NC16Rc. Foram realizados dois ensaios de

fotodegradação com diferentes tipos de lâmpadas: germicida, comprimento de onda UVC de 254 nm (marca Philips 450 mm, 15 W) e a Dulux L, comprimento de onda UVA entre 315 e 400 nm (marca Osram, 36 W, 840 mm de comprimento). Essas duas lâmpadas foram escolhidas por apresentarem diferentes comprimentos de onda para verificar a proteção que o polímero poderia oferecer ao princípio ativo Azadiractina.

Nesses testes foram usadas alíquotas de 0,3 mL de óleo e suspensão coloidal dispostas em frascos de vidro com capacidade de 2 mL (fechados), sob temperatura controlada ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). Os ensaios foram realizados em triplicatas e as amostras foram retiradas nos tempos de 0, 5, 10, 24, 48, 72, 96 e 120 horas. Após estes períodos as amostras eram preparadas e os ensaios realizados por HPLC para quantificar a concentração final de Azadiractina. O Azamax foi extraído conforme o item 4.2.1.1. e as nanocapsulas conforme o item 4.2.4.4 para a determinação da concentração total em suspensão coloidal.

Os ensaios foram realizados dentro de capela de fluxo laminar (lâmpada UVC) e caixa de madeira (lâmpada UVA) tendo as paredes protegidas com papel alumínio para refletirem a radiação (Costa, 2014 e Johnson e Dureja, 2006), ventilação para evitar o aquecimento das amostras e distância entre as amostras e a lâmpada de 15 cm.

4.2.6. Preparação e Caracterização de Nanocápsulas em pó

4.2.6.1. Secagem das nanocápsulas

A manutenção de nanopartículas em suspensão coloidal apresenta algumas desvantagens, como o risco de contaminação microbológica, degradação polimérica por hidrólise, instabilidades físico-químicas devido a agregação e sedimentação de partículas. A fim de obter um produto com maior estabilidade, as melhores nanoformulações, determinadas nos ensaios de caracterização, foram secas por duas diferentes técnicas: liofilização e aspensão (*spray drying*) (Pohlmann et al., 2002).

Os pós resultantes dos processos de secagem poderiam ser aplicados de diferentes maneiras; através da pulverização ou pela ressuspensão do pó em água.

As amostras secas por aspensão, marca Labmaq, modelo MSD 0.5 (Figura 18), as condições de trabalho foram informadas na Tabela 4.3.

Tabela 2.3. Parâmetros utilizados na aspersão.

Parâmetros	Condições
Diâmetro do Bico	0,7 mm
Controle de Vazão	0,15 L/min
Temperatura de entrada	125°C
Temperatura de saída	105°C
Fluxo do ar atomização	45 m ³ /min



Figura 0.3. Foto do Spray Dryer utilizado neste trabalho.

As amostras foram liofilizadas utilizando o equipamento Solab, modelo SL-404, temperatura de -50°C e pressão de -750 mmHg.

Em ambos os testes foi adicionado o adjuvante de SiO₂ para ajudar na etapa de secagem das nanocápsulas, na concentração de 3% em suspensão coloidal conforme sugerido na literatura (Pohlmann et al., 2002; Beck, Pohlmann e Guterres, 2004). A razão entre a suspensão coloidal e suspensão do adjuvante utilizada foi 1:1 (suspensão coloidal:suspensão de SiO₂ 3%) estes testes foram realizados para os dois processos de secagem de liofilização e spray dryer (Forim et al., 2013; Fessi et al., 1989; Tewa-Tagne et al., 2007; Müller et al., 2000; Pohlmann et al., 2002).

4.2.6.2. Caracterização das nanocápsulas em pó

Após a transformação das nanosuspensões coloidais em pó, estas foram caracterizadas quanto: ao rendimento, morfologia, concentração total de Azadiractina, tamanho de partícula, potencial zeta e índice de polidispersão.

O rendimento foi calculado através da soma de todos os ingredientes das suspensões coloidais, descontando o teor de água. A massa final, após etapa de Spary Dryer ou liofilização, era dividida pela soma dos ingredientes (Tewa-Tagne et al., 2007; Müller et al., 2000, Forim et al., 2013, da Fonseca, 2012), expressa pela equação:

$$R = (Massa\ obtida\ de\ Pó / Massa\ Total) * 100 \quad (4.5)$$

A análise morfológica foi realizada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), através das partículas em pó. Utilizou-se uma alíquota das amostras em pó secas pelas duas técnicas, aplicada sobre a fita de carbono. As amostras foram recobertas com um filme fino de ouro, em seguida analisadas no MEV, detector SE e voltagem de 20kV. O equipamento utilizado marca Carl Zeiss, modelo LS-10.

A concentração total de Azadiractina no pó foi analisada dispersando 25 mg de pó em 5 mL de acetona, deixando sob agitação por 60 min e temperatura ambiente, para a dissolução do polímero. Após este período, retirou-se 1 mL desta solução e foi centrifugada por 30 min, retirou-se o sobrenadante e este foi evaporado em fluxo de N₂. Sendo em seguida solubilizado com 0,5 mL de metanol, filtrada com filtro de PTFE 0,45 µm e analisado por HPLC-DAD.

O tamanho de partícula, potencial zeta e índice de polidispersão foi analisado por NanoSizer com a ressuspensão do pó. Foram pesados 10 mg de amostras em pó e adicionou-se 2 mL de água ultrapura.

4.2.7. Ensaios Biológicos com Ácaros da espécie *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae)

As populações de ácaros *T. urticae* (SisGen Cadastro A959D66) utilizados nestes ensaios foram retirados da criação estoque do laboratório de acarologia (Univates) e datados em arenas com folhas de feijão. As fêmeas de *T. urticae* foram dispostas em arenas para oviposição e retiradas após dois dias (Figura 19), os ovos foram acompanhados por 10 dias até alcançarem a fase adulta e mantidos em câmaras climáticas a $25\pm 1^\circ\text{C}$, umidade $65 \pm 5\%$ e fotoperíodo de 16:8 horas (luz:noite). Estas mesmas condições foram mantidas durante os testes.



Figura 16. Fotos das arenas referentes ao acompanhamento dos ovos até a fase adulta.

As unidades de criações (arenas) utilizados nestes ensaios foram compostas por algodão umedecido, folhas verdes de feijão com 4 cm de diâmetro dispostas em placas de petri (6,5 cm de diâmetro). Em seguida foram pulverizadas com o auxílio de um aerógrafo (Sw-775 air-brush, pressão de trabalho entre 10 e 45 psi), utilizou-se 0,5 mL de soluções de óleo de Nim, com distância de pulverização aproximadamente de 15 cm. Foram preparadas 4 concentrações diferentes de Azadiractina, 32, 64, 128 e 256 ppm que foram diluídas com uma solução de água destilada e 0,05% de Tween 80, utilizado como controle (Martínez-Villar et al., 2005).

Após a etapa de pulverização aguardou-se 5 minutos para que os discos estivessem secos e foram transferidos 5 ácaros para cada arena. Os ensaios para cada concentração de Azadiractina e controle foram realizados em triplicatas. Os ácaros, ovos e larvas foram acompanhados e contabilizados a cada 24 horas, durante o período de 7 dias.

Inicialmente foram preparadas 4 concentrações diferentes de Azadiractina, 32, 64, 128 e 256 mg L⁻¹ que foram diluídas a solução de água destilada e 0,05% de

Tween 80, utilizado como testemunha (Martínez-Villar et al., 2005). Este ensaio foi realizado com o objetivo de obter a concentração de Azadiractina mais efetiva para o ácaro *T. urticae* e posteriormente a aplicação das nanocápsulas em suspensão.

Após a verificação da concentração efetiva foram utilizadas as nanoformulações tratamento NC13Ra, NC16Rc, com a concentração de Azadiractina de aproximadamente 256 mg L⁻¹ em cada uma e as nanoformulações testemunhas NC25Ra e NC26Rc.

A mortalidade corrigida e a redução da oviposição foram calculadas a partir de 24 horas, sendo considerado morto o ácaro que não se moveu após o toque com fino pincel. A mortalidade corrigida foi calculada pela fórmula de Abbott (1925):

$$\% \text{ Mortalidade} = (x - y/x) * 100 \quad (4.6)$$

Onde, x é mortalidade testemunha e y é a mortalidade tratamento com o Nim.

Os ovos também foram contabilizados com o objetivo de calcular a redução da oviposição através da fórmula adaptada de Obeng-Ofori (1995):

$$PR = ((NC - NT)/(NC + NT)) * 100 \quad (4.7)$$

Onde, PR é a porcentagem média da redução da oviposição; NC a média de ovos testemunha e NT média ovos tratamento.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Caracterização dos Produtos utilizados na Síntese de Nanocápsulas

5.1.1. Análise do produto Azamax por Cromatografia Líquida

As análises da quantificação de Azadiractina A foi determinada por HPLC, a partir de uma solução padrão de Azadiractina 95%. O tempo de retenção (t_r) foi de 4,7 min., o comprimento de onda que apresentou maior intensidade de absorção detectado pelo DAD foi de 201 nm (Figura 20).

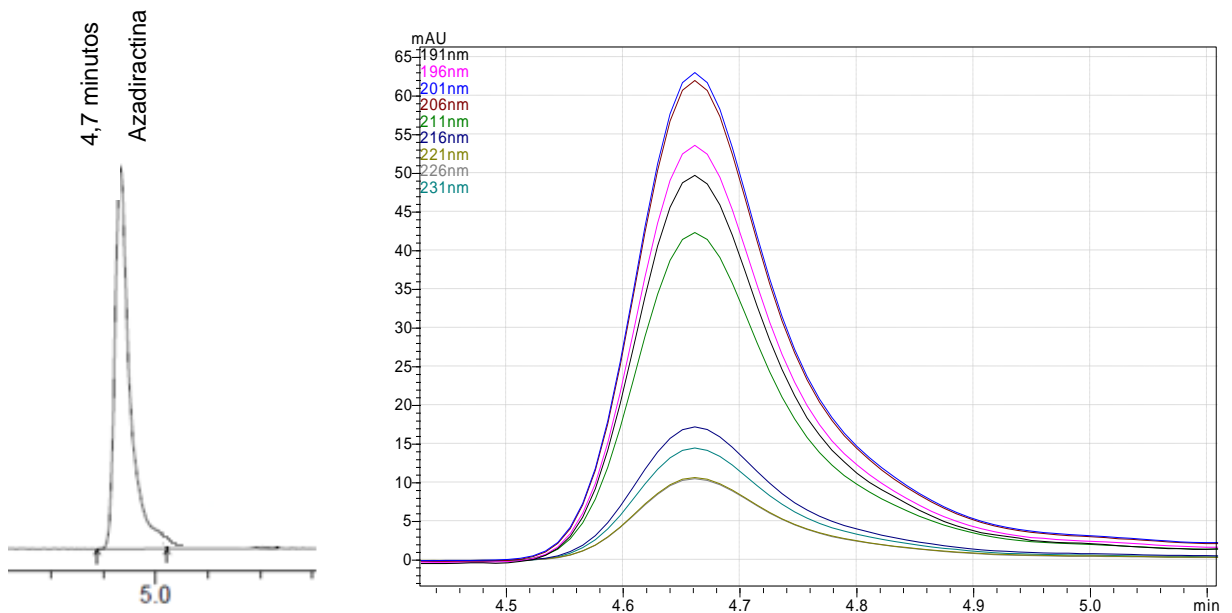


Figura 17. Cromatograma e espectro DAD do padrão de Azadiractina

- Linearidade

A linearidade foi investigada através da construção de 3 curvas de calibração, utilizando a área do pico cromatográfico versus a concentração de Azadiractina, a faixa de concentração avaliada foi entre 0,5 a 200 mg L⁻¹. A partir da curva de calibração média foi realizada a regressão linear, com o auxílio do programa Origin, gerando a reta apresentada na Figura 21. Os resultados obtidos estão representados pela equação e coeficiente de correlação (r^2), $y = 3729,0 x - 4127,3$ e $r^2 = 0,9996$, respectivamente.

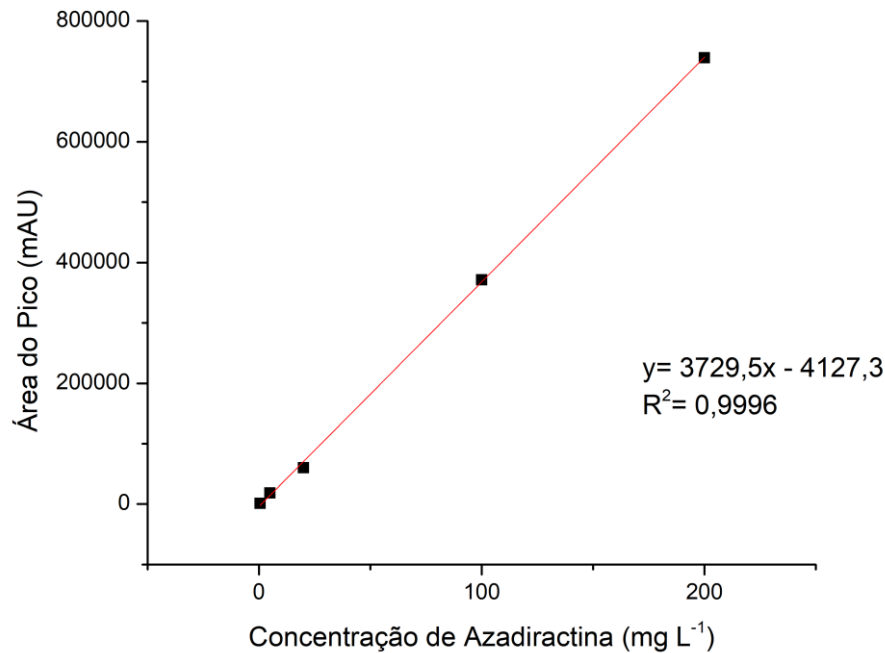


Figura 18. Curva de calibração da Azadiractina determinada no HPLC-DAD.

- Seletividade

A seletividade foi determinada pela comparação entre nanocápsulas de PLA e PCL, porém sem a adição de Azamax na sua nanoformulação. Foram utilizadas as concentrações 10 e 50 mg L⁻¹, como forma de validar a seletividade do método, com a adição de padrões a estas nanoformulações. Em ambas as concentrações e diferentes polímeros os resultados encontrados mostraram que a resposta da área do pico cromatográfico e o tempo de retenção não foram alterados nestas condições. Esses resultados indicam que as matérias-primas e os solventes utilizados nas sínteses de nanocápsulas, não apresentam interferência na detecção do princípio ativo Azadiractina.

- Precisão e Exatidão

A precisão representa a avaliação da proximidade dos resultados em uma série de medidas e estas análises foram realizadas através de intraensaios e interensaios. Os valores obtidos estão expressos em coeficiente de variação (CV%). Já a exatidão representa o grau de concordância entre os resultados obtidos e os resultados teóricos, e seus resultados são expressos em exatidão (E%).

A Tabela 5 apresenta os valores de precisão e exatidão para as concentrações de 1, 5 e 200 mg L⁻¹, para os ensaios intra e inter. Conforme os níveis aceitáveis de coeficiente de variação < 5% e exatidão entre -10 e 10%, os valores para as concentrações calculadas apresentaram valores satisfatórios.

Tabela 3. Resultados obtidos na investigação de precisão e exatidão, intra e interensaios, para a análise de Azadiractina.

Parâmetros	Concentração teórica (mg L ⁻¹)					
	1		5		200	
	CV (%)	E (%)	CV (%)	E (%)	CV (%)	E (%)
Intraensaios (n=10)	3,46	8,37	3,35	2,25	0,31	-2,37
Interensaios (n=3/5 dias)	4,54	9,08	4,16	1,78	0,36	1,86

- Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) também foram determinados a partir da curva de calibração, apresentando valores de 0,9 mg L⁻¹ e 1,2 mg L⁻¹, respectivamente. Estes limites foram determinados com o auxílio do software Labsolution. A partir destes resultados pode-se concluir que o composto Azadiractina pode ser quantificado a partir de 1,2 mg L⁻¹, pelo método otimizado neste trabalho.

5.1.1.1. Avaliação do Azamax[®] por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Após a validação do método para a determinação da Azadiractina por HPLC, foi realizada a extração do Azamax para a determinação exata da concentração do princípio ativo de interesse.

Segundo o fabricante a concentração de Azadiractina é de 12 g L⁻¹, após 3 extrações, conforme metodologia citada no item 4.2.1.2 a média de concentração do princípio ativo encontrado nas análises de HPLC-DAD foi de 12,803 g L⁻¹. Este valor foi considerado como a concentração real para os testes de % EE. Na Figura 22, está representado o cromatograma do produto Azamax extraído que também será

analisado no LC-MSMS para determinar o perfil cromatográfico e a identificação de seus principais componentes presentes no óleo comercial Azamax.

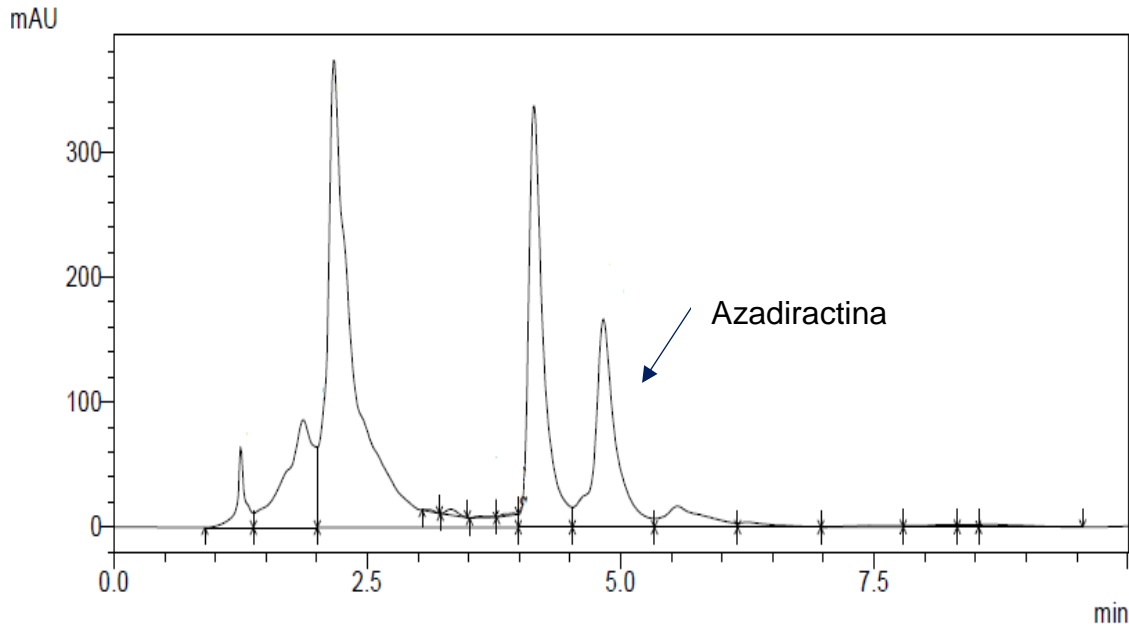


Figura 19. Cromatograma do Azamax extraído, com a identificação do pico do composto Azadiractina por HPLC-DAD.

5.1.1.2. Avaliação do Azamax por Cromatografia Líquida acoplado ao Espectrômetro de Massa

O extrato amarelo, produto originado da extração do Azamax, foi diluído, filtrado com filtro seringa PTFE 0,22 μm e após injetado no LC-MSMS. Analisou-se o perfil cromatográfico da amostra (Figura 23) através da varredura com o objetivo de identificar os compostos presentes.

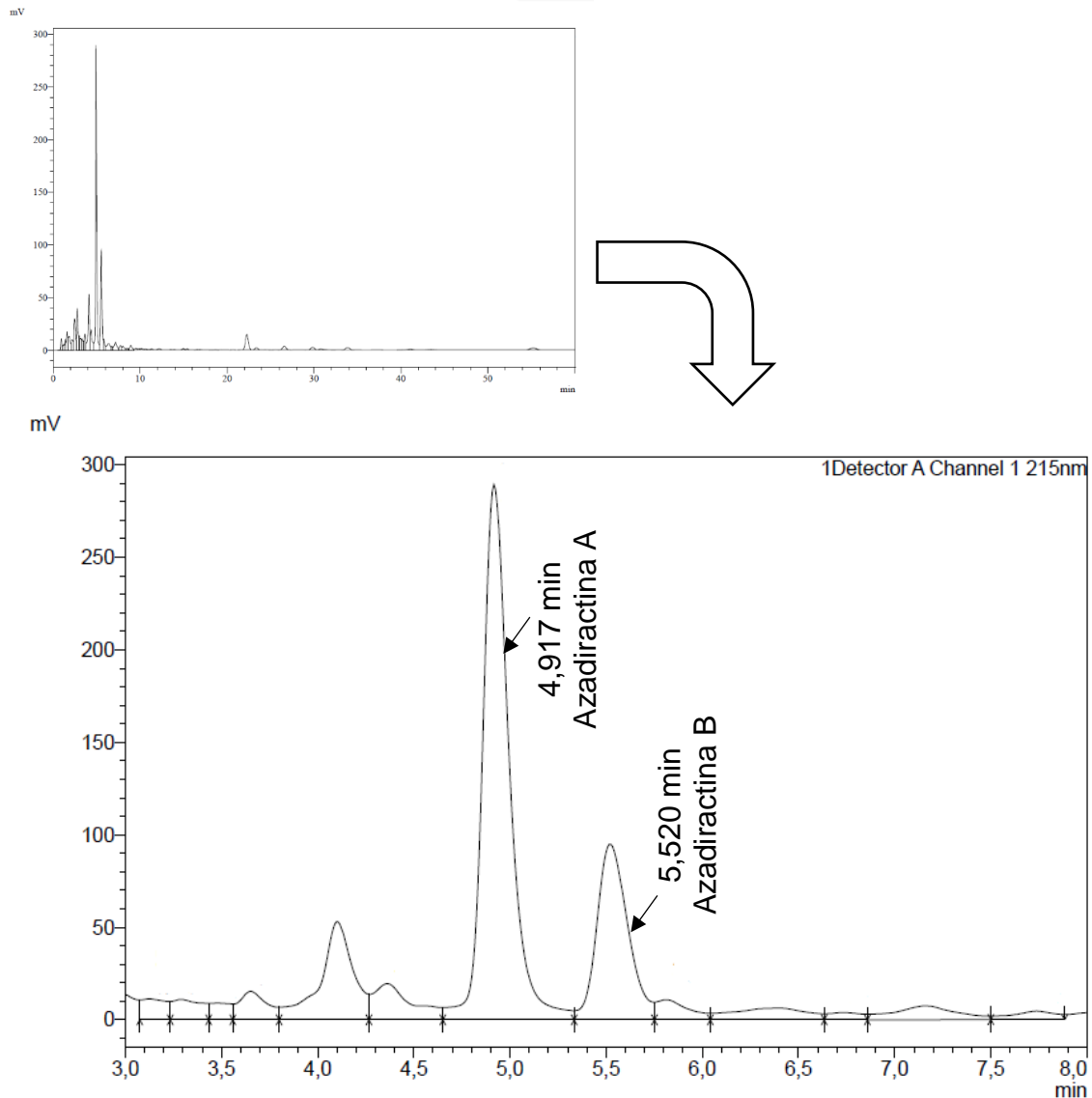


Figura 20. Perfil cromatográfico com zoom dos picos do extrato de Azamax, identificados por LC-MSMS

O extrato do Azamax apresentou vários picos cromatográficos, entre eles foram identificados os compostos Azadiractina A e Azadiractina B (3- tigloyl-azadirachtol), como as principais substâncias presentes no óleo de Nim, e suas estruturas são apresentadas na Figura 24 (Barrek et al., 2004; Forim et al., 2010; Sharma et al., 2006; Ambrósio, 2003). A partir da intensidade dos picos é possível concluir que o composto majoritário na amostra é a Azadiractina A. Assim como ao analisarmos a área dos picos, dos dois compostos identificados, foi possível obter uma relação entre a Azadiractina A e Azadiractina B de 2,4.

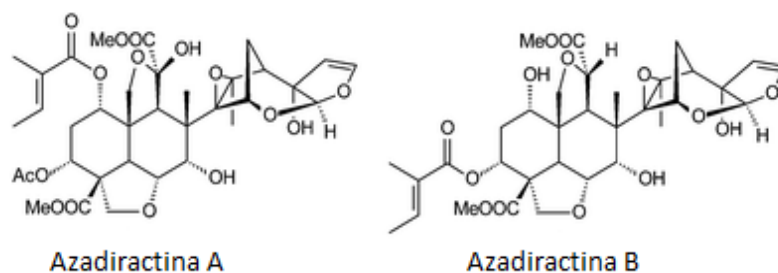


Figura 21. Estruturas dos compostos Azadiractina A e B (3-tigloyl-azadirachtol)

A Tabela 6, apresenta a identificação dos dois compostos a partir da massa/carga e da fragmentação de seus compostos.

Tabela 4. Identificação de compostos com espectrômetro de massas (LC-MSMS) conforme o tempo de retenção e razão m/z dos principais reportados em literaturas.

Compostos	Tempo de retenção (min)	m/z	Atribuição
Azadiractina A	4,917	743	[M+Na] ⁺
		719	[M-H] ⁻
		685	[M+H-2H ₂ O] ⁺
		545	[M+H-(2H ₂ O + tigOH)] ⁺
Azadiractina B	5,520	685	[M+Na] ⁺
		661	[M-H] ⁻
		645	[M+H-2H ₂ O] ⁺

A Azadiractina A apresentou fragmentos com m/z 719 [M-H]⁻ proveniente da desprotonação da molécula; m/z 743 [M+Na]⁺ derivado da adição de sódio ao íon de interesse, o sódio pode ser proveniente das impurezas dos solventes (Schaaf et al., 2000); m/z 685 [M+H-2H₂O]⁺ da eliminação de 2 moléculas de água; m/z 585 [M+H-(2H₂O+tigOH)]⁺ da eliminação de água e ácido tíglico (Barrek et al., 2004).

A Azadiractina B apresentou fragmento com m/z 641 [M-H]⁻ íon proveniente de sua desprotonação; m/z 685 [M+Na]⁺ da adição de sódio e m/z 645 [M+H-H₂O]⁺ da eliminação de uma molécula de água (Barrek et al., 2004; Schaaf et al., 2000).

5.1.1.3. Avaliação do Azamax por Cromatografia Gasosa acoplado ao Espectrômetro de Massa

A fase hexanóica obtida a partir da extração líquido-líquido do óleo foi analisada por GC-MS com o objetivo de identificar os compostos voláteis e ácidos graxos presentes no óleo de Nim. A identificação dos ácidos graxos foi confirmada com a realização da derivatização das amostras, convertendo-as em ésteres metílicos, com a finalidade de melhorar a volatilidade destes compostos. Os cromatogramas destas análises são apresentados nas Figuras 25 e 26 e a identificação dos compostos estão indicadas nas Tabelas 7 e 8, respectivamente.

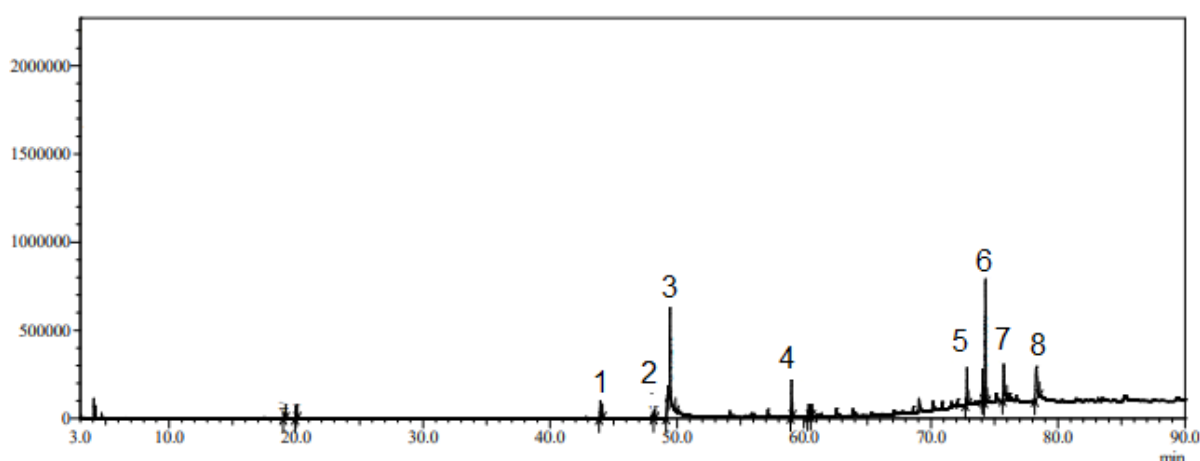


Figura 22. Cromatograma do GC-MS dos compostos voláteis presentes na fase hexanóica do óleo de Nim. Picos identificados na Tabela 7.

Tabela 5. Identificação dos compostos voláteis presentes na fase hexanóica do óleo de Nim.

Pico	Nome do composto	Tempo de retenção (min)	% Área	Atividades
1	Ácido Palmítico	43,977	2,05	Antioxidante, antimicrobial, anti-inflamatório (Akpuaca et al., 2013)
2	Ácido Linolêico	49,133	2,87	Antioxidante, inseticida (Hema, Kumaravel e Alagusudaram, 2011)
3	Ácido Oleico	49,456	10,99	Alergênico, anti-inflamatório, inseticida (Hema, Kumaravel e Alagusudaram, 2011)
4	Ácido Butanóico	59,017	3,91	NE
5	Sitosterol	72,836	4,46	Fitoesteróide (Abdelhamid, Kondratenko, Lomteva, 2015)

6	Asarin	74,080	3,60	Fitoesteróide (Abdelhamid, Kondratenko, Lomteva, 2015)
7	3-Amino 4-piperonyl 5-pyrazolone	75,733	6,16	NE
8	Gama –sitosterol	78,287	7,97	Antioxidante, antibactericida (Akpuaca et al., 2013)

NE = não encontrado na literatura

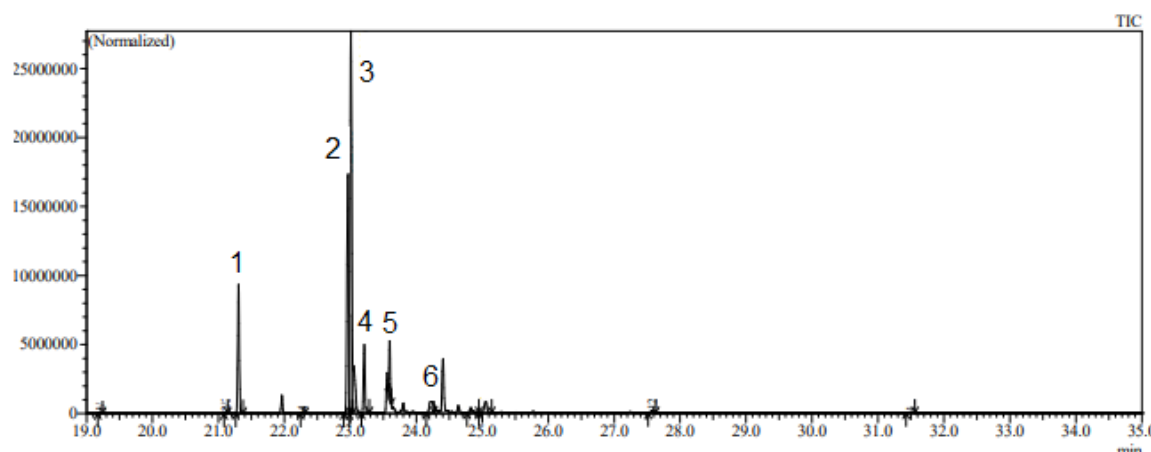


Figura 23. Cromatograma do GC-MS de ácidos graxos presentes na fase hexanóica do óleo de Nim, após a derivatização. Picos identificados na Tabela 8.

Tabela 6. Identificação de ácidos graxos presentes na fase hexanóica do óleo de Nim após a derivatização.

Pico	Nome do composto	Tempo de retenção	% Área	Atividades
1	Ácido Palmítico, metil éster	21,305	12,53	Antioxidante, antimicrobial, anti-inflamatório (Akpuaca et al., 2013)
2	Ácido linolêico, metil éster	22,963	27,91	Antioxidante, inseticida (Hema, Kumaravel e Alagusudaram, 2011)
3	Ácido 9-Octadenóico, metil éster	23,010	42,23	Antioxidante, inseticida (Hema, Kumaravel e Alagusudaram, 2011)
4	Metil esterato	23,211	6,80	Conservantes utilizados na agricultura (Oshiobugie, Olaniyi e Raphael, 2017)
5	Etil Oleato	23,596	3,91	NE
6	Ácido Octadenóico, 9,10,12-trimetil, metil éster	24,221	2,99	Antioxidante, inseticida (Hema, Kumaravel e Alagusudaram, 2011)

NE = não encontrado na literatura

Não foram encontrados nas análises de GC-MS, tanto para compostos voláteis como para ácidos graxos, substâncias sintéticas. Concluindo assim que o óleo de Nim avaliado possui somente compostos naturais, conforme reportados em outros estudos, confirmando a não contaminação do produto comercial escolhido para o desenvolvimento do estudo.

5.2. Determinação do EHL – Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico

Nos ensaios de determinação de EHL, utilizou-se concentrações conhecidas de Span 60 e Tween 80 para preparar as emulsões com concentração fixa de óleo de Nim. Foram preparadas 5 diferentes emulsões, sendo que todas apresentaram aspecto leitoso e coloração branca logo após o preparo (Figura 27a). Após 24 horas de repouso analisou-se a separação/cremeação e os aspectos macroscópicos destas emulsões.

Os resultados da determinação do EHL após 24 horas de repouso, possibilitaram verificar a separação das fases nas emulsões 4 e 5 (Figura 27b), enquanto que a amostra 1 apresentou razoável homogeneidade (presença de grumos). Já as amostras 2 e 3 apresentaram homogeneidade, correspondendo a melhor estabilidade do sistema, porém visualmente a amostra 2 apresentou maior viscosidade e aparência “aerada”.

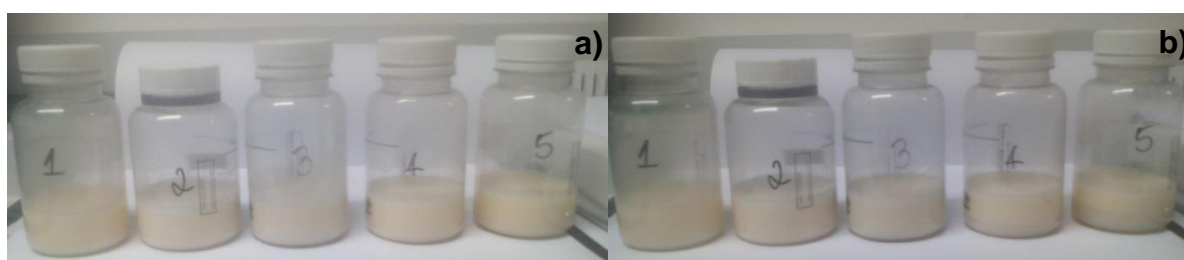


Figura 24. Fotos dos testes de determinação de EHL, a) imediatamente após preparo e b) após 24 horas de repouso.

As amostras 2 e 3, por apresentarem melhores homogeneidades, foram analisados por microscopia óptica para observar a presença de glóbulos dispersos e maior regularidade no diâmetro das bolhas presentes.

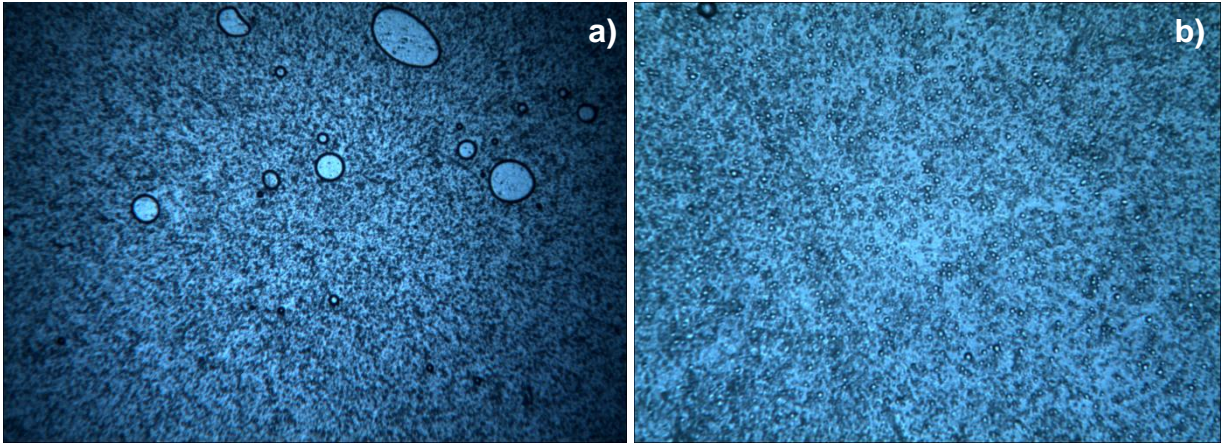


Figura 25. Microscopia óptica, após 24 horas de repouso amostra 2 (a) e amostra 3 (b), ambas com aumento de 10 x.

Após as observações, o melhor resultado das emulsões foi a amostra 3, pois apresentou melhor dispersão e tamanho de glóbulos uniformes, demonstrando assim maior estabilidade (Figura 28). Portanto, a melhor proporção entre os surfactantes foi utilizando 40% de Tween 80 (fase aquosa) e 60% de Span 60 (fase orgânica).

Os valores já conhecidos de EHL para os dois surfactantes utilizados, Span 60, tensoativo lipofílico, EHL de 4,7 e Tween 80, tensoativo hidrofílico, EHL 15 e da proporção entre eles é possível utilizar a equação 5.1.

$$EHL_{req.} = ((EHL A * \%A) + (EHL B * \%B))/100 \quad (5.1)$$

A partir destes estudos é possível concluir que o valor de EHL para o óleo em estudo é 8,8. Conhecendo a emulsão com melhor estabilidade nos estudos de EHL é possível iniciar os testes das nanoformulações de suspensões coloidais.

5.3. Caracterização das Suspensões Coloidais

Neste estudo as suspensões coloidais foram produzidas pelo método de nanoprecipitação a partir de óleo de Nim (Azamax). Os resultados das análises de pH, tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (PZ) e % EE, são apresentados na Tabela 9. As amostras estão classificadas em função do tipo de polímero e o processo de evaporação de solventes utilizado (L- Liofilização e R- Rotaevaporação), mais detalhes das nanoformulações podem ser vistos na Tabela 3.

Tabela 7. Resultados da caracterização de suspensões coloidais produzidos com diferentes quantidades de polímeros, surfactantes e solvente orgânico.

Nanoformulações	pH	Tamanho da partícula (nm)	Índice de polidispersão	Potencial Zeta (mV)	Eficiência de Encapsulamento (%)
NC1La	4,89 ± 0,04	426 ± 40	0,56 ± 0,05	-30,4 ± 0,9	99,66
NC2La	4,29 ± 0,07	417 ± 66	0,56 ± 0,06	-23,4 ± 0,7	99,82
NC3La	4,35 ± 0,10	461 ± 68	0,65 ± 0,07	-43,1 ± 1,2	97,17
NC4Lc	4,99 ± 0,12	463 ± 24	0,48 ± 0,02	-32,2 ± 0,2	99,38
NC7Lc	4,61 ± 0,02	281 ± 12	0,76 ± 0,09	-18,9 ± 0,7	100,00
NC8La	4,15 ± 0,00	203 ± 13	0,61 ± 0,11	-24,3 ± 0,7	97,09
NC9Lc	4,69 ± 0,03	436 ± 32	0,79 ± 0,03	-22,9 ± 0,5	100,00
NC10La	4,49 ± 0,00	311 ± 3,1	0,30 ± 0,03	-44,2 ± 3,1	95,21
NC11La	4,33 ± 0,01	314 ± 6,5	0,35 ± 0,02	-49,1 ± 1,4	92,22
NC12La	4,56 ± 0,01	214 ± 4,3	0,32 ± 0,02	-27,4 ± 0,5	98,26
NC13Ra	4,31 ± 0,04	277 ± 3,2	0,13 ± 0,01	-24,6 ± 0,8	100,00
NC14Ra	4,04 ± 0,01	289 ± 16	0,16 ± 0,02	-31,8 ± 0,1	98,15
NC15Ra	4,24 ± 0,01	286 ± 4,9	0,14 ± 0,01	-25,6 ± 0,9	99,99
NC16Rc	4,66 ± 0,03	265 ± 11	0,14 ± 0,02	-47,8 ± 0,8	92,98
NC19Rc	4,61 ± 0,03	215 ± 11	0,18 ± 0,01	-21,2 ± 1,7	99,84
NC20Ra	4,16 ± 0,02	272 ± 55	0,22 ± 0,01	-22,6 ± 0,9	100,00
NC21Rc	4,58 ± 0,02	266 ± 27	0,25 ± 0,01	-25,5 ± 0,6	99,20
NC22Ra	3,99 ± 0,03	223 ± 3,7	0,2 ± 0,01	-14,0 ± 0,5	99,15
NC23Ra	4,14 ± 0,01	216 ± 3,0	0,15 ± 0,04	-25,0 ± 1,0	98,20
NC24Ra	4,21 ± 0,01	229 ± 2,7	0,16 ± 0,01	-47,4 ± 0,5	99,35
NC25Ra	4,81 ± 0,07	148 ± 1,4	0,23 ± 0,02	-27,3 ± 0,3	n.p.
NC26Rc	4,32 ± 0,01	179 ± 0,8	0,17 ± 0,01	-40 ± 1,1	n.p.
NC13Ra7	6,89 ± 0,02	275 ± 2,6	0,14 ± 0,01	-22,1 ± 0,9	98,98
NC16Rc7	6,95 ± 0,04	263 ± 9,8	0,16 ± 0,02	-50,2 ± 0,7	90,23

n.p. Não pertinente.

Nas amostras NC5La, NC6La, NC17Ra e NC18Ra, não ocorreram formação de nanocápsulas, apenas um filme polimérico, por esse motivo não foram caracterizadas e não estão presentes na Tabela 9. Nestas nanoformulações utilizaram-se concentrações mais elevadas do polímero PLA (0,4 e 0,5% m/m) o que possivelmente causou a não formação das partículas. Esse comportamento pode ter ocorrido devido à dificuldade da dessolvatação do polímero no momento da adição à fase aquosa (Fessi et al., 1989; Bicudo, 2011).

Os resultados de pH das suspensões apresentaram valores entre 3,99 e 4,99. Estes valores de pH podem estar relacionados às características ácido-base dos compostos utilizados nas nanoformulações como polímeros, tensoativos e o próprio Azamax (pH 5,5). Este comportamento é devido a presença dos grupos ésteres que apresentam como características baixo pH, entre 3 e 5 (Forim et al., 2013, Pohlmann et al., 2013, Pasquoto-Stigliani, 2016, Müller et al., 2000, Raffin et al., 2003, Fontana et al., 2010). Valores baixos de pH podem contribuir para a degradação do polímero (Schaffazick et al., 2003, Forim et al., 2013) e do princípio ativo Azadiractina (Forim et al., 2013, Barrek et al., 2004). Por este motivo algumas suspensões foram alterados o pH final com adição de NaOH 0,05 M, elevando esse parâmetro para aproximadamente 7,0. As amostras que sofreram estas alterações foram: NC13Ra e NC16Rc, e após a elevação do pH a nomenclatura foi alterada para NC13Ra7 e NC16Rc7. Poucas variações foram observadas nos parâmetros analisados, indicando que a elevação do pH não alterou a estabilidade da suspensão coloidal, nem a quantidade de Azadiractina encapsulada.

Os tamanhos de partículas apresentam grandes variações (148 a 463 nm), principalmente entre as amostras liofilizadas (203 a 463 nm), quando comparadas com as rotaevaporadas (215 e 289 nm). Sendo as amostras liofilizadas as que apresentaram maior variação no tamanho de partícula devido ao estresse mecânico que ocorre em todas as etapas do processo de liofilização.

O processo de liofilização consiste em três etapas: 1) congelamento; 2) secagem primária: sublimação do gelo; 3) secagem secundária: remoção da água absorvida que não foi congelada na etapa 1. Durante as etapas descritas ocorrem instabilidades das partículas, causadas pelo estresse mecânico sofrido durante o congelamento. Estas instabilidades podem modificar ou danificar estas partículas, causando a fusão, ruptura, extravasamento do óleo ou deformação, conforme Figura

29 (Choi et al., 2004; Fonseca, 2012; Araújo, 2009, Abdelwahed et al., 2006; Schaffazick et al., 2003; Ahlin et al., 2002).

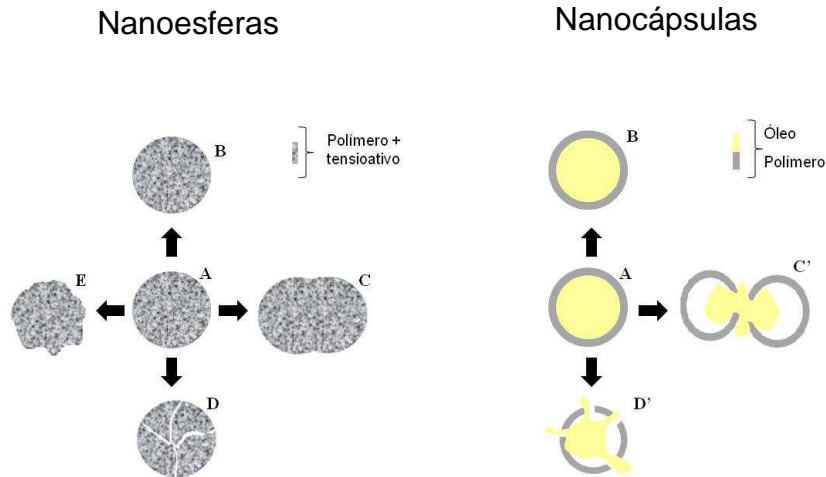


Figura 26. Esquema de possíveis instabilidades que podem ocorrer durante o congelamento de suspensões coloidais. A) antes da liofilização; B) depois da liofilização sem influência na morfologia e tamanho de partícula; C) com agregação/fusão; C') com ruptura de parede polimérica e consequente agregação/fusão, D) com quebra, D') com ruptura de parede polimérica e extravasamento do conteúdo oleoso e E) deformação de partícula. (Fonte: Araújo, 2009)

Segundo Abdelwahed et al. (2006) para amenizar este problema, teria de ser adicionada a suspensão crioprotetores que são comumente açúcares como sacarose e glicose na concentração entre 2 a 30% (m/v). Estes crioprotetores teriam como função impedir a agregação e proteger as partículas contra o estresse mecânico durante a solidificação da amostra. Essa proteção seria através de uma formação de matriz amorfa ao redor das nanopartículas, promovendo o espaçamento entre elas, além de ocorrer as formações de ligações de hidrogênio com a água, fazendo com que grupos polares (surfactantes) presentes na superfície das partículas, sejam parcialmente dessolvatadas pela água (Abdelwahead et al., 2006; Araújo, 2009). Porém esta adição traria um custo maior às nanoformulações, além disso, o processo de rotaevaporação apresentou melhores resultados.

A evaporação de solvente por rotaevaporação além de ter gerado partículas menores (~200 e 300 nm) apresentou menor dispersão na distribuição de tamanhos, como pode ser constatado pelos baixos índices de polidispersão. Nesse sistema as partículas em suspensão estão mais dispersas e sofrem menos interferência do processo de evaporação do solvente, quando comparada a técnica de liofilização.

Esses resultados estão de acordo com a literatura, como os estudos de Schaffazick et al. (2003) que reportaram tamanhos de partículas de 150 e 300 nm e de Fessi et al. (1989) que utilizou PLA para encapsular diversos fármacos e reportou tamanhos entre 240 e 260 nm.

É possível observar que diferentes concentrações de surfactantes (Tween 80 e Span 60), concentrações e tipos de polímeros, quantidade de fase orgânica e tempo de agitação não influenciam no tamanho de partícula e nem no índice de polidispersão. Segundo Moinard-Checot et al. (2006) o tamanho da partícula está relacionado com a composição da fase orgânica e não com concentrações de compostos. As amostras NC25Ra e NC26Rc, nanoformulações sem o óleo, foi possível verificar que os tamanhos das partículas são menores, confirmando que a presença do óleo influencia no tamanho. Aspecto já reportado na literatura por Forim (2014a) no qual sugere que o tamanho de partícula será influenciado pela quantidade de óleo adicionado na sua síntese.

Observou-se que a rotaevaporação estava ocorrendo de forma lenta e poderia ocasionar na agregação de partículas, causando a elevação do tamanho de nanocápsulas e índice de polidispersão. Ensaios foram realizados com o objetivo de otimizar o tempo de evaporação do solvente que consiste na adição de banho de gelo ao balão receptor, resultando em modificações significativas nas características das nanocápsulas, quando comparadas a evaporação lenta (temperatura ambiente no balão receptor). Na Tabela 10 é possível verificar as diferenças observadas.

Tabela 8. Resultados da caracterização de suspensões coloidais com evaporação por rotaevaporação em diferentes temperaturas no balão receptor.

Amostras	Rotaevaporação lenta			Rotaevaporação rápida		
	pH	Tamanho partícula (nm)	Índice de Polidispersão	pH	Tamanho partícula (nm)	Índice de Polidispersão
NC13Ra	5,18 ± 0,09	327 ± 3,9	0,37 ± 0,03	4,31 ± 0,04	277 ± 3,2	0,13 ± 0,01
NC14Ra	4,25 ± 0,10	402 ± 13	0,45 ± 0,03	4,04 ± 0,01	289 ± 16	0,16 ± 0,02
NC15Ra	4,27 ± 0,14	141 ± 6,9	0,76 ± 0,04	4,24 ± 0,01	286 ± 4,9	0,14 ± 0,01
NC16Rc	3,67 ± 0,06	402 ± 17	0,44 ± 0,04	4,66 ± 0,03	265 ± 11	0,14 ± 0,02
NC19Rc	4,50 ± 0,01	356 ± 21	0,71 ± 0,04	4,61 ± 0,03	215 ± 11	0,18 ± 0,01
NC20Ra	4,06 ± 0,01	360 ± 65	0,53 ± 0,02	4,16 ± 0,02	272 ± 55	0,22 ± 0,01
NC21Rc	4,59 ± 0,01	512 ± 29	0,62 ± 0,04	4,58 ± 0,02	266 ± 27	0,25 ± 0,01

Os principais parâmetros que sofrem alterações entre a rotaevaporação de forma rápida foram: tamanho de partículas e o índice de polidispersão. Nestes dois parâmetros observou-se que, na evaporação lenta, o índice de polidispersão

apresentou valores elevados que variaram entre 0,37 e 0,76, indicando a formação de diferentes tamanhos de nanopartículas em um mesmo sistema resultando em suspensão coloidal heterogênea. Também ocorreu a formação de partículas maiores superiores a 300 nm, estes parâmetros podem indicar a aglomeração e diferentes tamanhos de partículas. Já na rotaevaporação de forma mais rápida, ocorrem a formação de partículas mais estáveis e com menor probabilidade de aglomeração. Os resultados obtidos foram satisfatórios, com tamanho de partícula entre 189 e 215 nm, e o índice de polidispersão entre 0,13 e 0,25, ou seja, nanoformulação homogênea.

O potencial zeta está relacionado com a carga superficial das nanocápsulas e é importante para a avaliação da estabilidade das suspensões e a interação entre nanopartículas. Valores elevados (em módulo), aproximadamente 30 mV, são importantes para boa estabilidade físico-química das suspensões coloidais, já que grandes forças repulsivas tendem evitar a agregação em função das colisões ocasionais (Schaffazick et al., 2003; Trierweiler, 2009). Os polímeros PLA e PCL favorecem um potencial zeta negativo, este pode ser observado em todas as nanoformulações, apresentando valores entre -14 e -50,2 mV. Ao compararmos as amostras NC13Ra (0,1% PLA) e NC16Ra (0,1% PCL), a medida que foi aumentada a concentração de PLA, aumentou em módulo o potencial zeta. O mesmo ocorreu ao aumentar a concentração de surfactantes ou polímeros, devido a diferença na dupla camada, presente na parte superficial das nanocápsulas. Os surfactantes estão presentes na região interfacial entre o sólido e o líquido aumentando a carga de repulsão (Forim et al., 2013; Mosqueira et al., 2005; Abreu, 2011) e também na organização molecular quando o polímero é re-precipitado na formação das nanocápsulas (Mora-Huertas, Fessi e Elaissari, 2010).

Os resultados para porcentagem de encapsulamento foram obtidos por HPLC-DAD através da concentração do princípio ativo, Azadiractina. Foi possível obter suspensões coloidais com valores de % EE excelentes para o óleo de Nim, ficando entre 92 e 100%. No geral as amostras rotaevaporadas apresentaram melhores % EE, com exceção somente da nanoformulação NC16Rc (0,1% PCL). Forim e seus colaboradores (2013), utilizaram óleo e extrato de Nim e o polímero PCL e obteve o encapsulamento de aproximadamente 98%. Khoee e Yaghoobian (2009) observaram comportamento semelhante e atribuíram esse fenômeno ao aumento da viscosidade das fases, a medida que aumentava as concentrações de surfactantes, impedindo assim o vazamento das substâncias encapsuladas.

Os resultados do índice de polidispersão é muito importante para obter a homogeneidade da suspensão, já que valores baixos indicam boa dispersão, sem formação de precipitados, formados principalmente devido a cristalização da Azadiractina (Forim et al., 2013) ou a agregação de partículas (Abdelwahead et al., 2006). Os resultados apresentados na Tabela 9 indicam valores mais elevados para o método de evaporação de solvente por liofilização (0,3 a 0,79) quando comparados aos obtidos para as amostras rotaevaporadas (0,1 e 0,2). Esta diferença identifica a uniformidade do tamanho de partícula, se está ocorrendo aglomeração ou precipitação de algum composto.

Estes resultados estão melhores apresentados nos gráficos de tamanho de partícula (nm) x intensidade, que apresentam diferentes comportamentos e distribuições de tamanhos de partículas entre os métodos de evaporação de solventes (Figura 30), rotaevaporação (R) ou liofilização (L). Nestes gráficos é possível observar que as nanoformulações rotaevaporadas, apresentaram somente um pico, indicando que as nanocápsulas em suspensão estão com tamanhos uniformes. Enquanto que as amostras liofilizadas apresentaram de dois a três picos, indicando que possuem no mínimo dois diferentes tamanhos de partículas. Esse fenômeno pode ocorrer devido a aglomeração de partículas ou a outras instabilidades que possam ocorrer durante o processo de liofilização, conforme apresentadas na Figura 30.

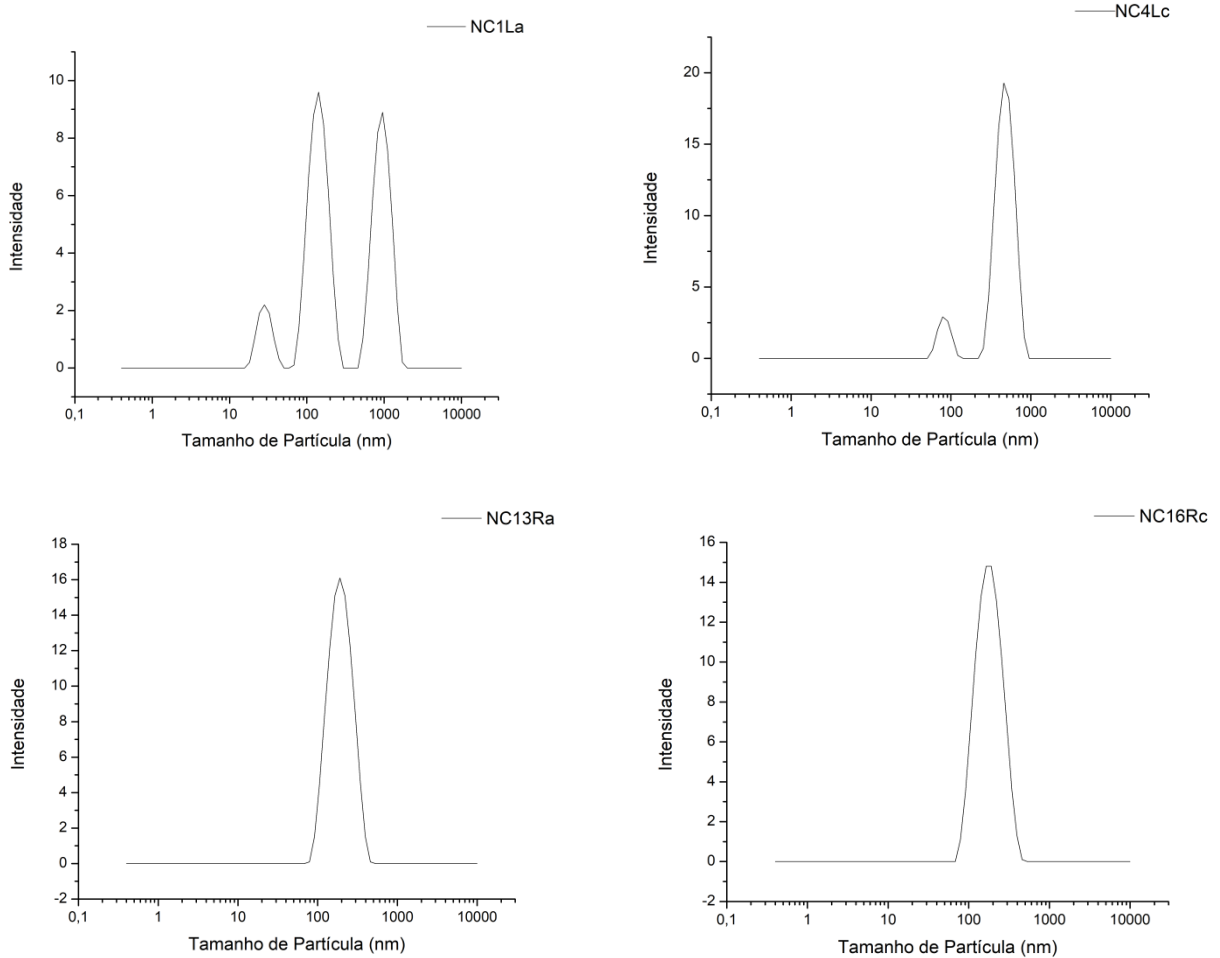


Figura 27. Distribuição de tamanho de partículas das amostras NC1La, NC4Lc, NC13Ra e NC16Rc, medidas por DLS.

Constata-se que as amostras NC1La e NC13Ra apresentam a mesma nanoformulação, porém diferentes tipos de evaporação de solventes, indicando que as amostras rotaevaporadas apresentaram tamanho de partículas, índice de polidispersão e potencial zeta menores, consequentemente partículas mais estáveis e uniformes.

As amostras NC13Ra (0,1% PLA) e a NC16Rc (0,1% PCL), são diferenciadas unicamente pelo tipo de polímero utilizado, PLA e PCL, respectivamente. Podemos observar nos resultados de % EE, para a nanoformulação NC13Ra (0,1% PLA), que atingiu 100%, já os parâmetros pH e tamanho de partícula, apresentaram valores um pouco mais elevado ao compararmos com a formulação NC16Rc. O valor de potencial zeta mais elevado (-47,8 mV), em módulo, para a formulação do PCL, poderá indicar menor probabilidade de aglomeração do que a formulação com PLA (-24,6 mV).

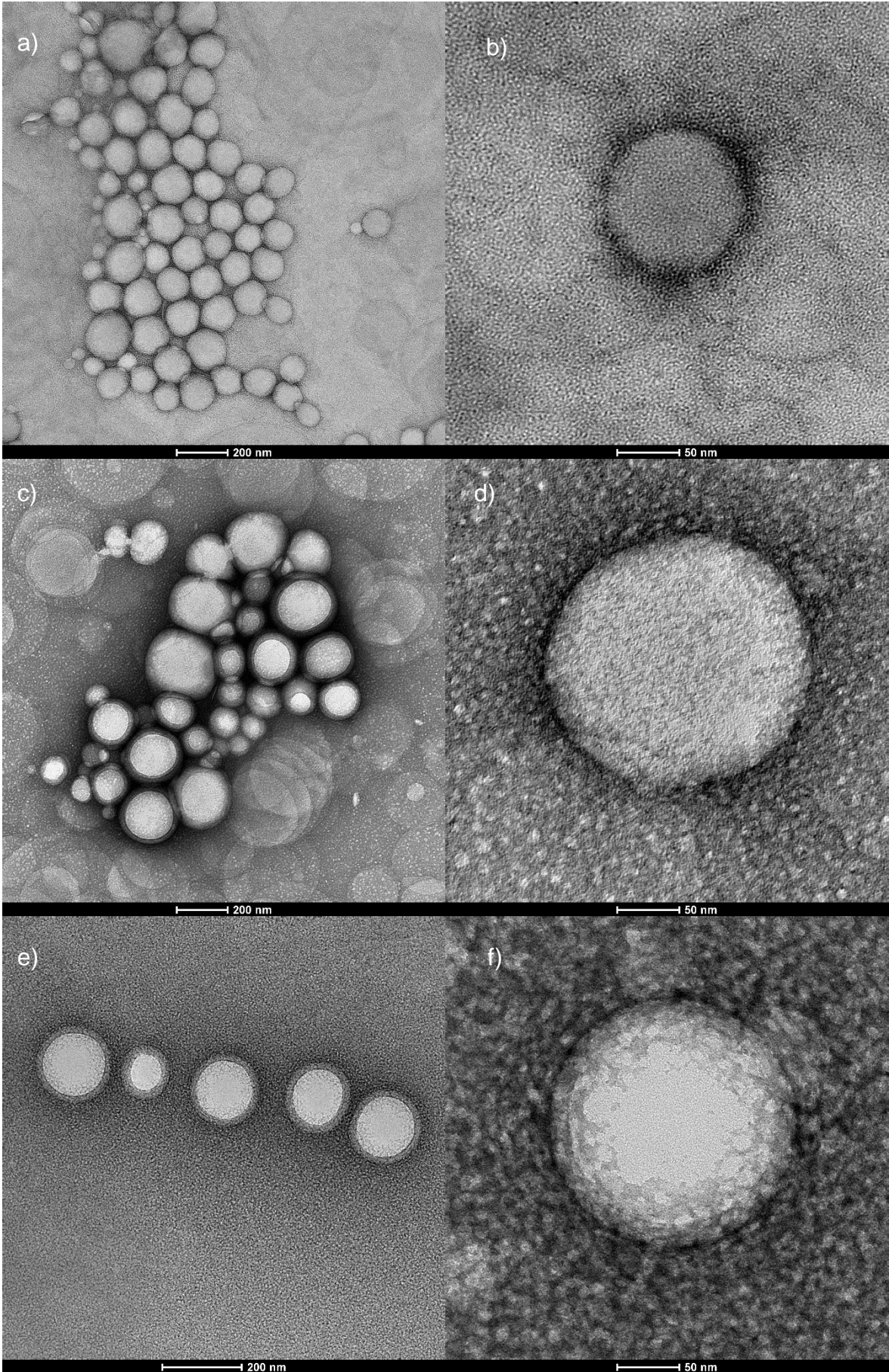
Já nas amostras NC13Ra (0,1% PLA) e NC14Ra (0,2% PLA), na qual as diferenças estão na quantidade de PLA, 0,1% e 0,2% m/m, respectivamente, pouca

diferença foi observada nos resultados, ou seja, características semelhantes ao seu comportamento. O potencial zeta ficou um pouco mais elevado quando a concentração do PLA utilizado foi maior. Enquanto o tamanho de partícula e % EE, que são os parâmetros mais importantes, apresentaram melhores resultados na formulação NC13Ra (0,1% PLA), com menores tamanhos de partículas e maior porcentagem de encapsulamento.

5.3.1. Avaliação morfológica em Suspensão Coloidal - Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Na Figura 31, são apresentadas a morfologia das amostras de suspensões analisadas por MET, NC13Ra e NC25Ra (PLA, com e sem óleo), NC16Rc e NC26Rc (PCL, com e sem óleo). Observa-se nas imagens morfologias típicas, formatos esféricos, de nanocápsulas sintetizadas por nanoprecipitação. As imagens a - b (NC25Ra – 0,1% PLA, sem óleo), c - d (NC26Rc – 0,1% PCL, sem óleo) correspondem as nanoformulações sem a presença do óleo, enquanto as imagens e - f (NC13Ra – 0,1% PLA, com óleo), g - h (NC16Rc – 0,1% PCL, com óleo) referem-se às nanoformulações com o óleo.

Observa-se na imagem e) que as nanocápsulas produzidas com PLA estão melhor distribuídas e distantes umas das outras, enquanto que as nanocápsulas de PCL, g) estão aglomeradas, apresentando morfologias mais irregulares devido à proximidade entre elas. Guinebretière et al. (2002), reportou que nanocápsulas de PCL contendo óleo Miglyol, se deformam tornando-se paralelas e planas, mostrando que as esferas não são rígidas, devido ao conteúdo interno. Na figura 31 e), refere-se a amostra NC13Ra, 0,1% PLA é possível observar a presença do raio hidrodinâmico e o núcleo das nanocápsulas.



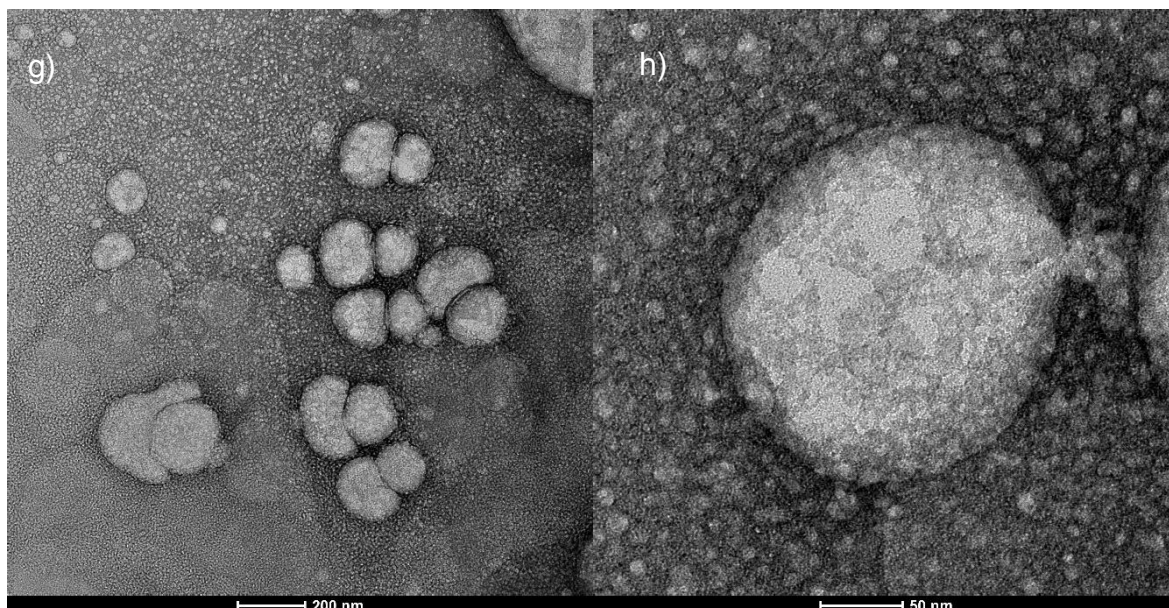


Figura 28. Imagens de MET, das nanosuspensões, a-b) nanoformulação NC25Ra (PLA 0,1%, sem óleo), c-d) nanoformulação NC26Rc (PCL 0,1%, sem óleo), e-f) nanoformulação NC13Ra (PLA 0,1%, com óleo), g-h) NC16Rc (PCL 0,1%, com óleo), nas magnitudes de 26500 x e 130000x.

Os diâmetros foram calculados com o auxílio do software ImageJ, utilizando 20 partículas para calcular a média de seus tamanhos. Os tamanhos médios das nanopartículas obtidos a partir das imagens de MET estão apresentados na Tabela 11 juntamente com os resultados obtidos por DLS, para comparação.

Tabela 9. Resultados das medidas de tamanho de partículas comparando as técnicas de medidas, ImageJ-MET e DLS.

Nanoformulações	Tamanho de partícula ImageJ (nm) (n=20)	Tamanho de partícula DLS (nm)
NC13Ra (0,1% PLA, com óleo)	172 ± 13	277 ± 3,2
NC16Rc (0,1% PCL, com óleo)	163 ± 14	265 ± 11
NC25Ra (0,1% PLA, sem óleo)	123 ± 14	148 ± 1,4
NC26Rc (0,1% PCL, sem óleo)	155 ± 30	179 ± 0,8

Os tamanhos médios das nanocápsulas obtidos a partir das imagens de MET foram de 163 ± 14 nm e 172 ± 13 nm para a amostra NC16Rc (0,1% PCL, com óleo) e NC13Ra (0,1% PLA, com óleo), respectivamente. Estes valores são menores aos obtidos pela técnica de DLS (Tabela 11, $277 \pm 3,2$ nm e $265 \pm 11,2$ nm, respectivamente). Essas diferenças são esperadas devido ao princípio de análises de cada técnica, análises por DLS, os resultando são expressos em raios hidrodinâmicos, enquanto que por MET, obtêm-se diâmetros do núcleo das partículas. Essas

diferenças são causadas devido a camada hidrodinâmica presentes nas partículas provavelmente ligadas aos surfactantes (Finsy et al., 1992; Hoffmann et al., 1997; Schaffazick et al., 2003).

5.3.2. Estabilidade das Suspensões Coloidais

Com o objetivo de analisar o comportamento das amostras ao longo do tempo de armazenamento, realizou-se o acompanhamento do pH das nanocápsulas em suspensão. Os testes foram feitos ao longo de 6 meses, tempo estimado para iniciar a degradação dos polímeros biodegradáveis (Schaffazick et al., 2003). Além de verificar quais as nanoformulações e processo de evaporação de solvente que demonstra maior estabilidade, identificando o método de conservação e armazenamento deste material.

Os critérios para a escolha das nanoformulações NC1La, NC4Lc, NC13Ra e NC16Rc, foram os ensaios de caracterização das suspensões coloidais. Os ensaios foram realizados com nanoformulações produzidas com 0,1% de polímero sendo duas de PLA (NC1La e NC13Ra) e as outras duas de PCL (NC4Lc e NC16Rc). Além da influência do tipo de evaporação de solvente (L liofilização e R rotaevaporação).

As suspensões que foram estocadas em diferentes temperaturas de armazenamento (-20, 4 e 20°C) foram avaliadas a estabilidade a partir das variações de pH, % EE, tamanho de partícula e índice de polidispersão, ao longo de 6 meses.

Para as amostras armazenadas a -20°C, após um mês de estocagem observou-se a formação de precipitados e por consequência separação de fases, com a presença de fase sólida ao fundo e o um líquido turvo sobrenadante, não retomando a condição de suspensão coloidal após o descongelamento. A formação destes precipitados é um indicativo de instabilidade física, provavelmente causada por forças gravitacionais superiores as forças brownianas (Abdelwahead et al., 2006, Schaffazick et al., 2003). Já as amostras armazenadas a temperatura ambiente (20°C) permaneceu estável, porém verificou-se a formação de microorganismos após 3 meses de estocagem.

Nas suspensões conservadas a 4°C, observou-se a presença de apenas uma fase, indicando uma maior estabilidade física e química das nanocápsulas em suspensão (Abdelwahead et al., 2006). Sugerindo que a refrigeração das suspensões

(4°C) a melhor alternativa para o armazenamento. Já que essas suspensões não apresentam tendência a separação de fases, pois partículas submicrométricas, apresentam sedimentação lenta, minimizada pelo movimento Browniano (Schaffazick et al., 2003).

Conforme discutido anteriormente, o pH é um dos principais parâmetros de controle da estabilidade das suspensões estudadas. Na Figura 32 são apresentados os valores desse parâmetro ao longo de seis meses de armazenamento das quatro suspensões de interesse. Observa-se pequena variação de pH para a maioria das amostras com leve tendência de queda. A única exceção foi observada para a amostra NC13Ra que apresentou aumento de pH (4,0 a 5,5).

Esse comportamento não é esperado, pois devido ao relaxamento das cadeias que expõem um maior número de grupos carboxílicos ou pela própria degradação dos polímeros, ocasionam a liberação de ácido lático (PLA) ou ácido 6-hidróxi capróico (PCL). Com estes ácidos dispersos nas suspensões, deveria ocorrer uma pequena diminuição do pH (~0,8) por serem ácidos fracos (Forim et al., 2013; Fontana et al., 2010; Calvo, Vila-Jato e Alonso, 1996; Schaffazick et al., 2003; Lemos, 2017).

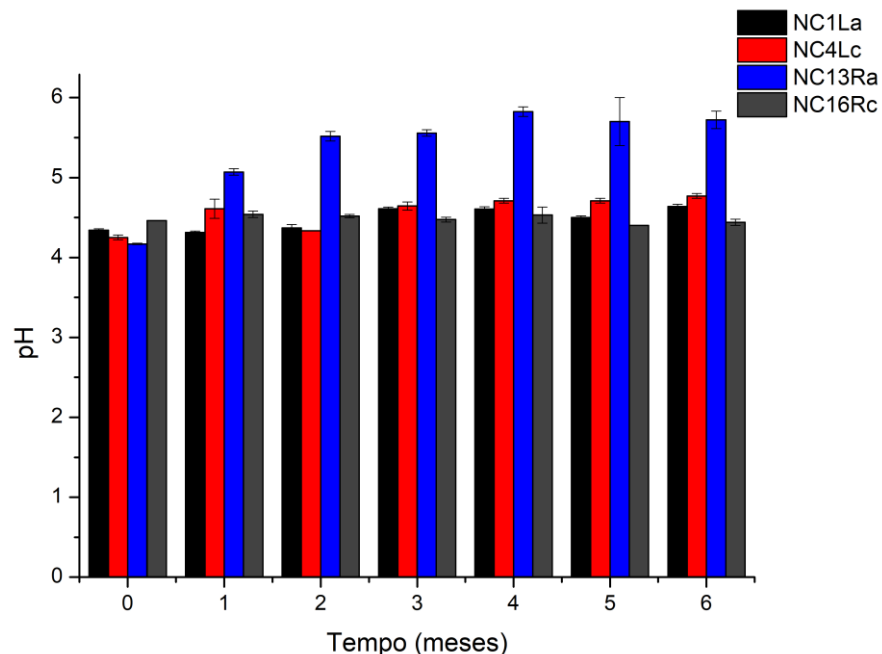
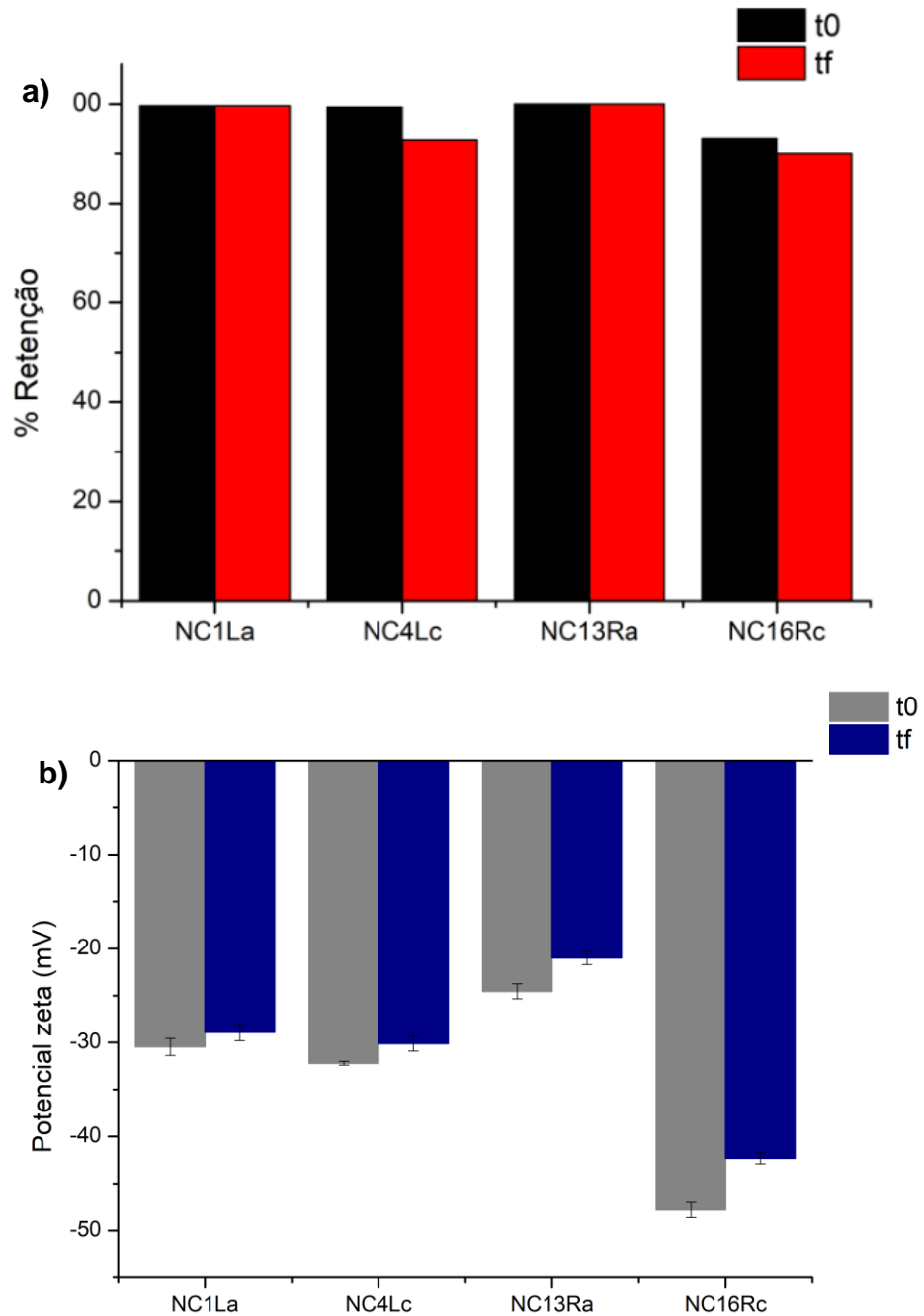


Figura 29. Variação do pH das suspensões de biopesticidas encapsulados por PLA ou PCL em função do tempo, na temperatura de 4°C.

Cabe destacar que a maior variação de pH para a amostra NC13Ra (0,1% PLA) não comprometeu a retenção do princípio ativo nessas nanocápsulas, conforme pode

ser visto na Figura 33a. Mesmo comportamento foi observado para outra suspensão utilizando o PLA (NC1La), enquanto as suspensões de PCL apresentaram diminuição na retenção (17%) após 6 meses de armazenamento.



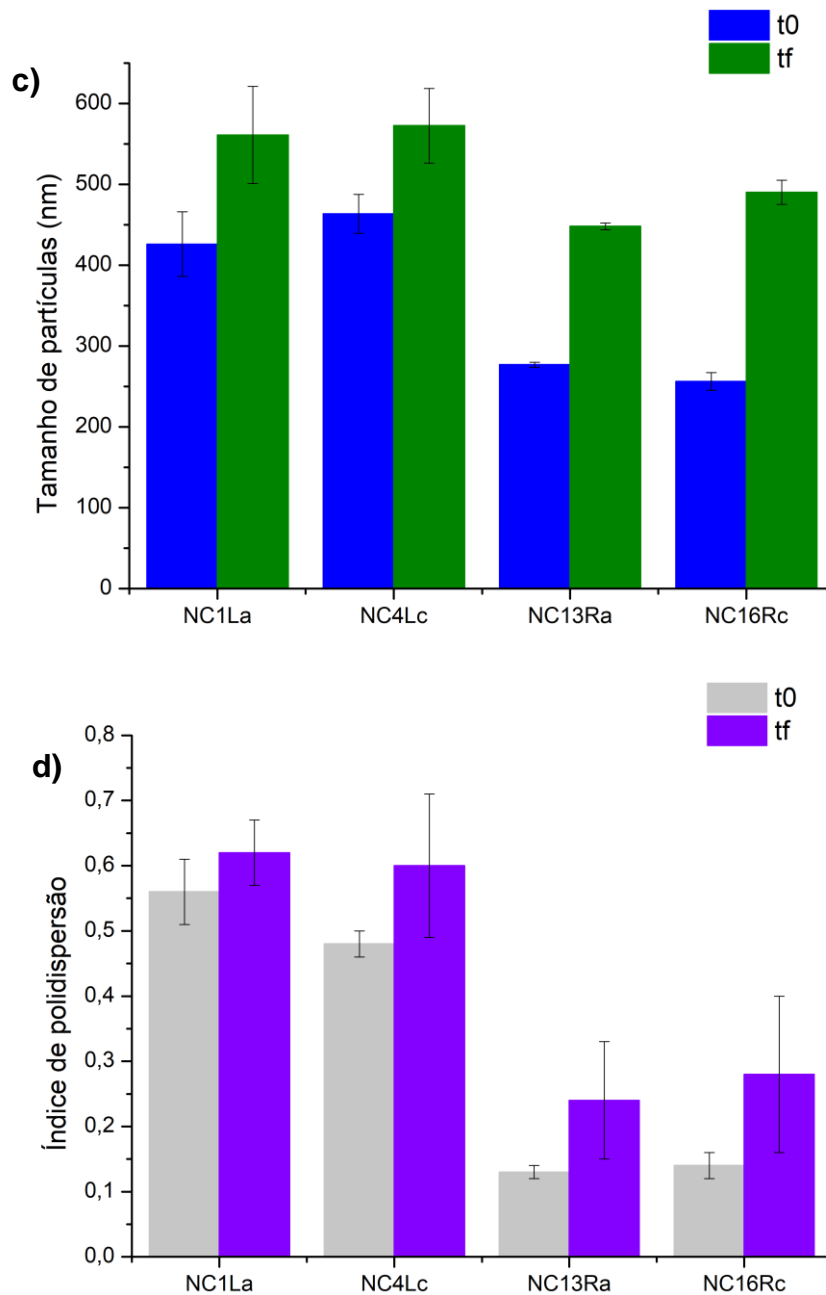


Figura 30. Variação dos parâmetros: a) % de Retenção, b) Potencial Zeta, c) Tamanho de Partícula, d) Índice de Polidispersão, das nanoformulações no início (t0) e após 6 meses (tf), armazenamento a 4°C.

Por outro lado, o potencial zeta (Figura 33b) apresentou uma diminuição do valor, em módulo para todas as amostras, o que pode favorecer a coalescência das nanocápsulas, especialmente para a nanoformulação NC13Ra (0,1% PLA) que apresentou valores, em módulo, inferiores a 30 mV. Calvo, Vila-Jato e Alonso (1996) reportaram o mesmo comportamento a esse parâmetro, porém com valores

superiores a -30 mV, segundo o autor este valor é importante para evitar a coalescência das nanocápsulas. Variações de valores do potencial zeta podem indicar maior probabilidade de aglomeração ou a degradação, e/ou erupção do polímero e consequente liberação do óleo que alterando a superfície das partículas (Losa et al., 1993; Schaffazick et al., 2003).

Tanto o tamanho de partícula (Figura 33c) quanto o índice de polidispersão (Figura 33d) aumentaram para todas as amostras. Esse comportamento está relacionado com a coalescências das partículas em suspensão e corrobora com os resultados do potencial zeta. Comportamento similar também foi descrito por Losa et al. (1993) e Calvo, Vila-Jato e Alonso (1996) ambos com encapsulamento de fármacos a partir de PCL.

Esse resultados indicam que no geral as suspensões de PLA apresentaram melhores estabilidades quando comparadas as produzidas com PCL. Já que nestas nanoformulações a aglomeração ocorreu mais rapidamente, podendo ser observada pela elevação dos resultados de tamanho de partícula e índice de polidispersão. Com a aglomeração das nanocápsulas ocasionaria a separação de fases e consequente sedimentação das partículas, já que diminuiria o movimento Browniano devido ao tamanho das partículas (Schaffazick et al., 2003).

5.3.3. Liberação Controlada, *in vitro*, de Azadiractina em Suspensão Coloidal

O perfil de liberação controlada do princípio ativo depende de diversos fatores, como: biodegradabilidade, peso molecular e concentração dos polímeros; concentração e características físico-químicas do princípio ativo presente no óleo e condições do meio de liberação (tempo de contato, temperatura e pH) (Mora-Huertas, Fessi e Elaissari, 2010).

Neste trabalho os ensaios de liberação controlada foram realizados com as nanoformulações NC13Ra (0,1% PLA) e NC16Rc (0,1% PCL), escolhidas a partir dos seus resultados na caracterização das nanoformulações. Os dois polímeros utilizados, PLA e PCL possuem a mesma nanoformulação e o objetivo foi avaliar a capacidade de liberação deste princípio ativo ao longo do tempo (Figura 34).

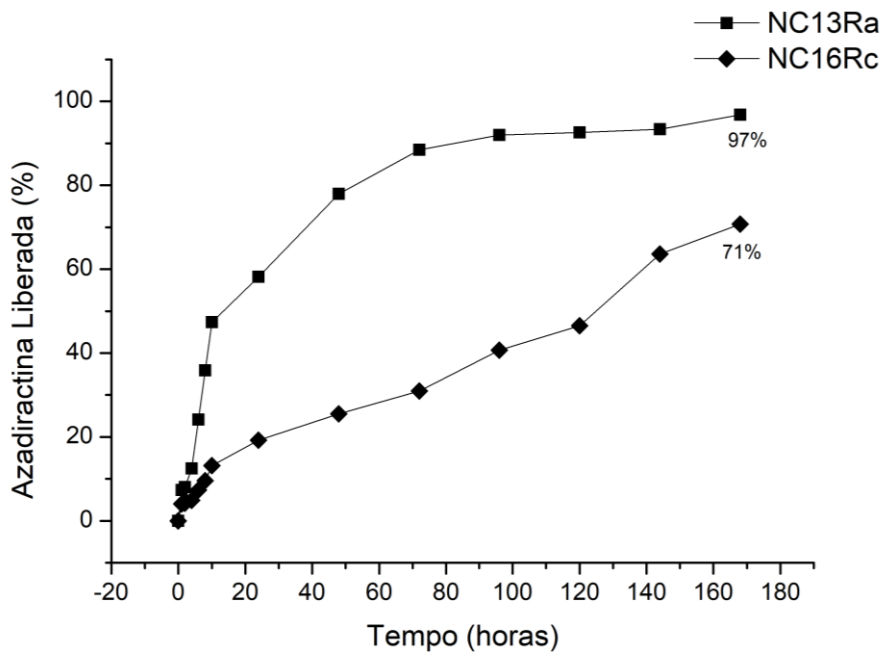


Figura 31. Perfil de liberação de Azadiractina das nanoformulações NC13Ra (0,1% PLA) e NC16Rc (0,1% PCL).

Os perfis de liberação da Azadiractina apresentaram diferentes comportamentos entre as nanoformulações testadas. A nanoformulação NC13Ra (0,1% PLA) apresentou maior e mais rápida liberação ao longo das 168 horas analisadas, atingindo 97 % da Azadiractina liberada no final do teste. Verificou-se a rápida liberação nas dez primeiras horas do ensaio (57 %), seguida de uma etapa lenta. Por outro lado, a nanoformulação NC16Rc (0,1% PCL) apresentou liberação mais lenta ao longo do ensaio e menor porcentagem de Azadiractina liberada (71%).

Forim e seus colaboradores (2013), nanoencapsularam o extrato e óleo de Nim utilizando o polímero PCL em suas formulações, obtiveram rápida liberação, 100% de Azadiractina em 10 horas de ensaio. Riyajan e Sakdapipanich (2009) sintetizou microcápsulas de alginato de sódio e álcool poli vinílico (PVA), encapsulando óleo de Nim e encontraram taxas de liberações entre 70 e 100% em 480 horas. Sittipummongkol e Pechyen (2018) utilizaram PVA, goma arábica (GA) e obteve taxas de liberação entre 50 e 65% de Azadiractina, em 72 horas.

Segundo a literatura as nanocápsulas obtidas por nanoprecipitação apresentam sistema de liberação bifásico. Este sistema consiste em fase rápida de liberação (*burst*), seguida por uma etapa lenta. A rápida liberação ocorre devido a degradação da fina membrana polimérica ou da adsorção do óleo a superfície da

estrutura. Na etapa lenta, corresponde a difusão do núcleo oleoso (Cauchetier et al., 2003).

Os resultados obtidos pelo modelo matemático de Korsmeyer e Peppas (1981) indicam que para ambas as nanoformulações o mecanismo de liberação é anômalo, ou seja, apresenta a combinação de difusão e erupção na liberação de Azadiractina. Os valores encontrados para n durante as 168 horas de ensaio de liberação foram de 0,5332 para a nanoformulação NC13Ra (0,1% PLA) e 0,5874 para a NC16Rc (0,1% PCL). Por este mesmo modelo matemático é possível ainda concluir que a liberação na amostra NC13Ra (0,1% PLA) até 4 horas, ocorre por difusão, enquanto que para a NC16RC (0,1% PCL), a liberação por difusão ocorre até 8 horas. Após esse período o mecanismo dominante de liberação é erupção, já que os valores até 0,43 correspondem a liberação por difusão e entre 0,43 e 0,85 ao transporte anômalo (difusão e erupção).

Forim e seus colaboradores (2013), observaram nos testes de liberação de nanocápsulas de PCL dois regimes cinéticos diferentes, de 1 a 4 horas e 4 a 12 horas, obtendo valores n de 1,613 e 4,957, respectivamente. Concluindo assim que a liberação ocorre por inchaço e relaxação, ou erupção do polímero.

Kumar et al. (2010), sintetizou nanocápsulas com Polietilenoglicol (PEG) e realizou sua liberação em água, a 30°C e obteve n para diferentes formulações entre 0,47 e 1,18, apresentando liberação rápida em 24 horas e, porém, também rápida da degradação da Azadiractina.

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que a liberação utilizando a nanoformulação com PLA, ocorre mais rapidamente do que com o PCL. Este é um dado importante, já que a degradação do princípio ativo Azadiractina pode ser mais rápida que a liberação da dosagem mínima necessária para combater as pragas-alvos. Por conseguinte, uma liberação lenta pode diminuir a eficácia da ação biopesticida das nanocápsulas.

5.4. Caracterização e Rendimento das Microcápsulas em Pó

A estabilidade das suspensões coloidais podem ser um limitante para sua aplicação na indústria devida a baixa estabilidade físico-química em meio aquoso e a problemas microbiológicos, devido ao armazenamento. Estes problemas podem ser

retardados ou evitados através do processo de secagem (Schaffazick et al., 2003; Pohlmann et al., 2002; Müller et al., 2000; Forim et al., 2013).

O processo de desidratação destas suspensões tem sido realizado através da sublimação (liofilização) e aspensão (“spray drying”). No entanto, após este processo é necessária a caracterização destes, a fim de avaliar suas novas características.

Após estabelecido as melhores nanoformulações (NC13Ra - 0,1% PLA e NC16Rc - 0,1% PCL) foram realizados ensaios de secagem por métodos de liofilização e aspensão. Foi necessária a utilização de um adjuvante, SiO₂, para auxiliar na secagem destas suspensões. Este produto foi escolhido por ser atóxico e biocompatível, além de tornar a agregação das partículas reversíveis (Forim et al., 2013, Pohlmann et al., 2002; Fessi et al., 1989; Tewa-Tagne et al., 2007; Müller et al., 2000). Os resultados de rendimento e doseamento de Azadiractina A estão apresentados na Tabela 12, após diferentes tipos de secagem.

Tabela 10. Resultados do rendimento e doseamento das suspensões coloidais.

Nanoformulações	Secagem	Razão Suspensão Coloidal/SiO ₂	Rendimento (%)	Doseamento Azadiractina (mg/kg)
NC13Ra (0,1% PLA)	Liofilização	1,0	49,6	465,2
	Spray Dryer	1,0	56,6	649,4
NC16Rc (0,1% PCL)	Liofilização	1,0	32,1	371,6
	Spray Dryer	1,0	29,9	375,2

A amostra NC13Ra (0,1% PLA) apresentou maiores rendimentos e doseamentos de Azadiractina A que a NC16Rc (0,1% PCL) para ambos os processos de secagem. Os melhores resultados de rendimento (56,6%) e doseamento (649,4 mg kg⁻¹) foram observados no processo de aspensão.

As amostras foram ressuspensas (em 2 mL água) após a secagem para as análises de caracterização por DLS e os resultados são apresentados na Tabela 13. Como esperado, as nanocápsulas durante a secagem apresentam tendência a se aglomerar, ocasionando um aumento no tamanho médio das partículas bem como maior dispersão na distribuição de tamanhos. Para todas as amostras, o tamanho médio ficou na faixa micrométrica, variando de 3229 a 5907 nm. Esses resultados estão de acordo com estudos disponíveis na literatura, o qual aplicaram as mesmas técnicas de secagem para nanocápsulas utilizando dióxido de silício como adjuvante de secagem (Forim et al., 2013, Fonseca, 2012; Chasteinger et al., 1996; Araújo, 2009;

Beck, Pohlmann e Guterres, 2004). De acordo com Forim et al. (2013), o tamanho das cápsulas obtido, após a secagem por spray drying, foi de 4000 nm, enquanto Beck, Pohlmann e Guterres (2004), encontraram tamanhos entre 20000 nm e 50000 nm. Pela técnica de liofilização, Chasteinger e seus colaboradores (1996), encontraram tamanhos de partículas entre 5000 e 15000 nm.

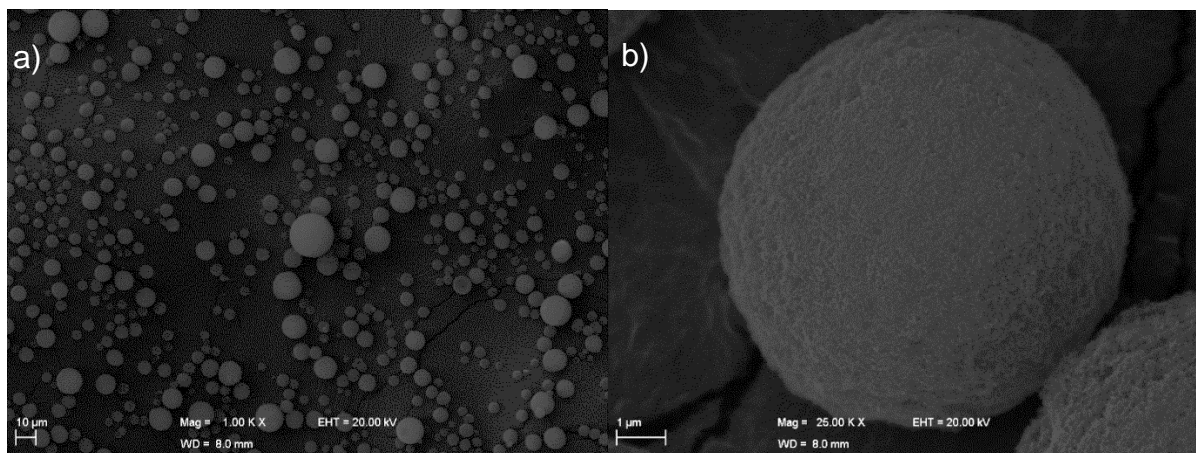
Para índice de polidispersão, verifica-se a ocorrência de aglomeração das partículas e que não há homogeneidade no tamanho, em ambas as técnicas de secagem. O potencial zeta, com o recobrimento de SiO₂ das nanocápsulas presentes nas suspensões também foram alterados, tanto para o PLA, como para o PCL. Isto ocorre porque a camada superficial não é mais constituída somente por surfactantes e polímeros e sim por óxido de silício.

Tabela 11. Resultados da análise por DLS das amostras secas por Spray dryer e liofilização.

Nanoformulações	Tamanho de partícula (nm)	Índice de polidispersão	Potencial Zeta (mV)
NC13RaS	3540± 99	0,98 ± 0,03	-15,07 ± 1,4
NC16RcS	3229± 49	0,94 ± 0,07	-29,43 ± 2,8
NC13RaL	5907 ± 67	1,00 ± 0,00	-19,57 ± 1,2
Nc16RcL	5889± 99	1,00 ± 0,00	-28,27 ± 3,9

S – Spray dryer e L- liofilizada

Os tamanhos de partículas apresentaram valores bem variados, após a resuspensão, ao compararmos as duas técnicas utilizadas neste trabalho. Essa diferença de tamanho de partícula pode ser verificado também através do MEV, Figura 35.



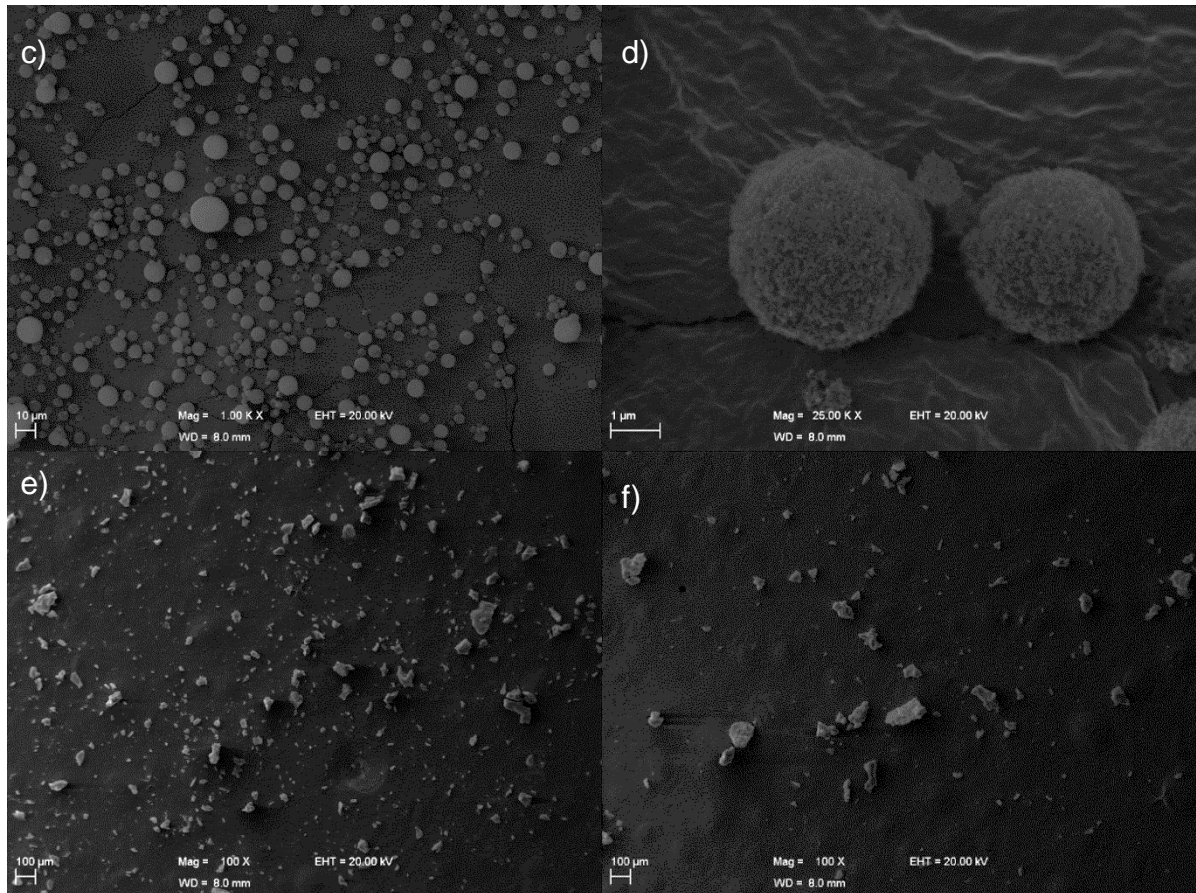


Figura 32. Imagens de MEV para as nanoformulações secas com SiO₂, por spray dryer e liofilização, a e b) NC13RaS, c e d) NC16RcS, e) NC13RaL e f) Nc16RcL.

Observa-se diferenças morfológicas entre as amostras secas por Liofilização e Spray Dryer. As amostras secas por spray dryer apresentam morfologia esférica, com partícula áspera e casca porosa que consiste em partículas de sílica (Tewa-Tagne et al., 2007). Já as amostras liofilizadas apresentam estruturas diferenciadas sem formas específicas, pois durante a cristalização da água elas podem ser quebradas (Choi et al., 2004; Araújo, 2009; Chasteinger et al., 1996).

5.5. Degradação Térmica

O estudo de degradação térmica foi dividido em 2 partes: análises termogravimétricas das matérias-primas que tem como objetivo entender o comportamento do PLA, PCL e Azamax quando expostos a altas temperaturas (TGA); e a degradação térmica da Azadiractina presente no óleo de Nim e nas nanocápsulas em suspensão coloidal, expostos a temperatura de 60°C, por 48 horas (em estufa).

As curvas de TGA (Figura 36) indicam para os três produtos analisados uma única etapa de perda de massa e porcentagem residual muito baixa ($\sim 0\%$), ou seja, tanto os polímeros como o Azamax foram totalmente degradados/volatilizados durante o aquecimento. Observa-se também que o PLA e o PCL apresentam estabilidades térmicas muito parecidas ao comparar as temperaturas de início de degradação ($T_{5\%}$), 279 e 274°C, respectivamente (Tabela 14), porém as temperaturas do picos de degradação o PCL ($\sim 390^\circ\text{C}$) são maiores comparada ao PLA ($\sim 368^\circ\text{C}$). Esses resultados são similares aos reportados na literatura (Fukushima, Tabuani e Camino, 2009; Yang et al., 2008).

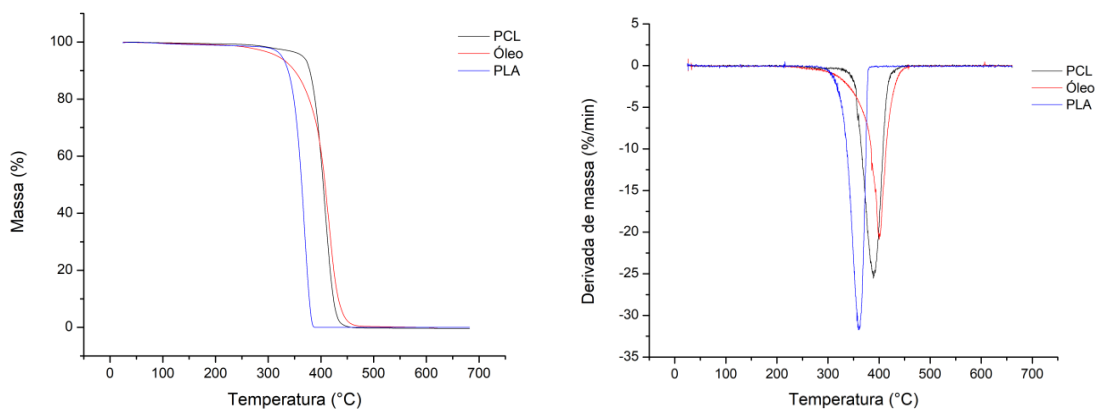


Figura 33. Curvas de Análises Termogravimétricas, TGA e DTG, dos componentes PLA, PCL e óleo de Nim.

Tabela 12. Resultados da análise térmica dos componentes PLA, PCL e óleo de Nim, por TGA.

Amostras	T 5% (°C)	T 50% (°C)	Resíduo (%)	Derivada do Pico (°C)
Azamax	252	358	0	419
PCL	274	349	0	390
PLA	279	339	0	368

O Azamax apresentou uma elevada temperatura de degradação, 252°C , ocorrendo em uma única etapa e o pico da derivada de 419°C (Tabela 14). Benicio, Neto e Sousa (2010) obtiveram o início da degradação em torno de 200°C .

Os ensaios de degradação térmica foram realizados com as amostras que apresentaram as melhores características, com pequenos tamanhos de partícula e índice de polidispersão e diferentes concentrações de polímero encapsulante. Em ambos os testes a degradação o óleo de Nim bruto e encapsulado nanosuspensões coloidais (NC1La, NC2La, NC4Lc, NC13Ra, NC14Ra e NC16Rc), foram avaliados

pela variação da concentração do princípio ativo, Azadiractina A, por um intervalo de 48 horas.

Nos testes de degradação térmica, as amostras foram expostas a uma temperatura de 60°C, por um período de 48 horas. Na Figura 37 estão apresentados os resultados obtidos nesses testes e pode-se observar que a recuperação da Azadiractina A, após o tempo total do experimento (48 h), variou entre 28 e 64% (m/m). O óleo de Nim bruto apresentou recuperação de 46% (m/m) em 24 h e de 28% (m/m) em 48 h. Costa (2014) realizou ensaios de degradação térmica a temperatura de 60°C por 24 horas, com extrato bruto de Nim, observando degradação ~37% (m/m).

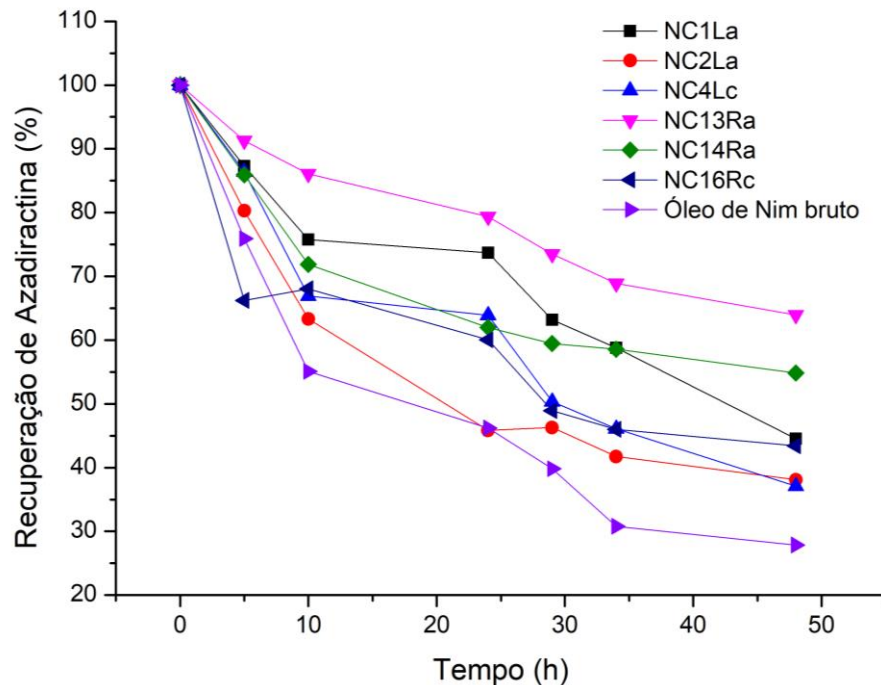


Figura 34. Curvas de degradação térmica por temperatura de Azadiractina presente no óleo de Nim e das nanosuspensões.

A maior proteção foi verificada para a nanoformulação com 0,1% de PLA produzida por rota evaporação (NC13Ra) (recuperação de 64% em 48h). Uma maior quantidade de PLA na nanoformulação (0,2% PLA, NC14Ra) não implica melhora na proteção térmica de Azadiractina A (recuperação de 55%). As nanoformulações produzidas com PCL apresentaram menor proteção a degradação térmica quando comparadas com as nanoformulações similares de PLA. A partir destes resultados pode-se constatar que o encapsulamento protege a Azadiractina A da degradação térmica, com melhor desempenho do PLA em comparação ao PCL.

Barrek e seus colaboradores (2004), realizaram estudos de degradação variando o pH em função da temperatura. As temperaturas utilizadas foram 40, 50 e 70°C, e pHs 2, 4, 6 e 8; os melhores resultados encontrados foram nas temperaturas 40 e 50°C, com o pH 4 e 8. No pH 4,0, próximo aos obtidos neste trabalho, apresentaram tempo de meia vida para a temperatura de 50°C, 11552 minutos (aproximadamente 481 horas ou 20 dias).

Para avaliar o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$), tempo necessário para a concentração do composto Azadiractina cair à metade da concentração inicial, foram construídas curvas cinéticas utilizando o modelo de pseudo-primeira ordem:

$$C = C_0 - kt \quad (5.2)$$

Onde C_0 é a concentração inicial e C é a concentração no tempo t , k a constante da pseudo-primeira ordem (Anexo 2).

A partir do cálculo da constante foi possível obter o tempo de meia-vida para os resultados de termodegradação nas 48 horas do ensaio, pela relação:

$$t_{1/2} = \ln 2/k \quad (5.3)$$

Os resultados dos tempos de meia-vida para as amostras expostas a temperatura de 60°C, durante 48 horas, estão expressas na Tabela 15.

Tabela 13. Resultados de tempo de meia vida das amostras para os ensaios de termodegradação.

Nanoformulações	Termodegradação Tempo de meia vida (dias)
NC1La	1,91
NC2La	1,45
NC4Lc	1,46
NC13Ra	3,17
NC14Ra	2,39
NC16Rc	1,88
Azamax	1,11

A partir dos resultados de tempo de meia vida, Tabela 15, observou-se que o óleo de Nim quando exposto a temperatura de 60°C, apresentou tempo de meia vida com valor de 1,11 dias, enquanto que o mesmo encapsulado apresentou melhor proteção térmica. As nanoformulações NC13Ra (0,1% PLA) e NC14Ra (0,2% PLA), se destacaram com valores de tempo de meia vida de 3,17 e 2,39 dias, respectivamente.

5.6. Fotodegradação

O processo de nanoencapsulamento ou microencapsulamento visam proteger os derivados de Nim, especialmente a Azadiractina, da fotodegradação (Costa, 2014; Forim et al., 2013; Riyajan e Sakdapipanich, 2009).

Neste trabalho foi proposto, através da metodologia utilizada por Costa (2014), avaliar a fotodegradação do óleo de Nim, através de seu principal composto, com o objetivo de avaliar se os polímeros empregados no encapsulamento, PLA ou PCL, poderiam fotoprotger o óleo de radiações UV e Visível.

Para estes testes foram utilizadas as nanoformulações NC1La, NC4Lc, NC13Ra e NC16Rc (os critérios de escolha foram os mesmos citados para aos ensaios de termodegradação) expostas a dois tipos de radiações durante 120 horas, com temperatura controlada (25°C). As lâmpadas utilizadas foram UVC (15 W) e Dulux L (36W), as Figuras 38 e 39, ilustram a fotodegradação da Azadiractina em função do tempo para as nanoformulações estudadas e o óleo de Nim bruto.

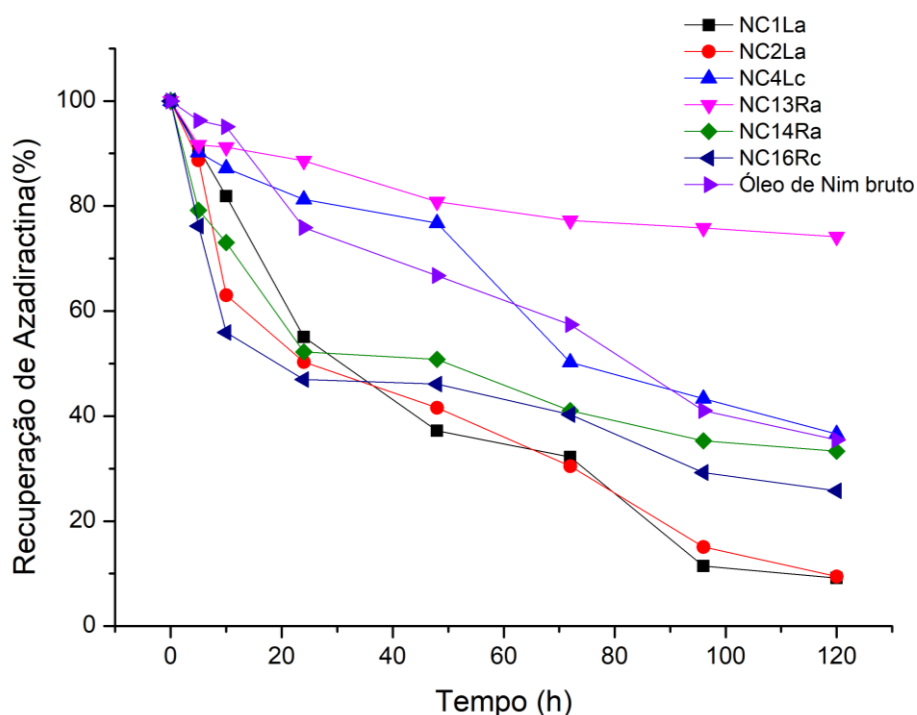


Figura 35. Curvas de porcentagem de recuperação de Azadiractina presente no óleo de Nim e nanosuspensões poliméricas, utilizando lâmpada UVC.

Nos testes onde as amostras foram expostas à radiação UVC (Lâmpada UVC) foram observadas grandes variações em termos de recuperação da Azadiractina (9 a 74%) entre as amostras avaliadas aos longo dos 5 dias

Entre as amostras nanoencapsuladas em suspensão, a NC13Ra (0,1% PLA) foi a que obteve melhor resultado em relação a recuperação (74%). Isso pode indicar que em uma amostra estável, o polímero PLA, está desempenhando a fotoproteção do princípio ativo analisado neste experimento.

Já as amostras NC1La, NC2La, NC4Lc, NC14Ra e Nc16Rc apresentaram valores de degradação igual ou superiores ao óleo (53%). Este comportamento pode estar relacionado a baixa estabilidade da Azadiractina nessas nanoformulações e não só devido a ação de fotodegradação, mas também ao baixo pH da nanoformulação.

Na figura 39 são mostrados os resultados de recuperação de Azadiractina nos testes com a lâmpada Dulux que simula a radiação solar.

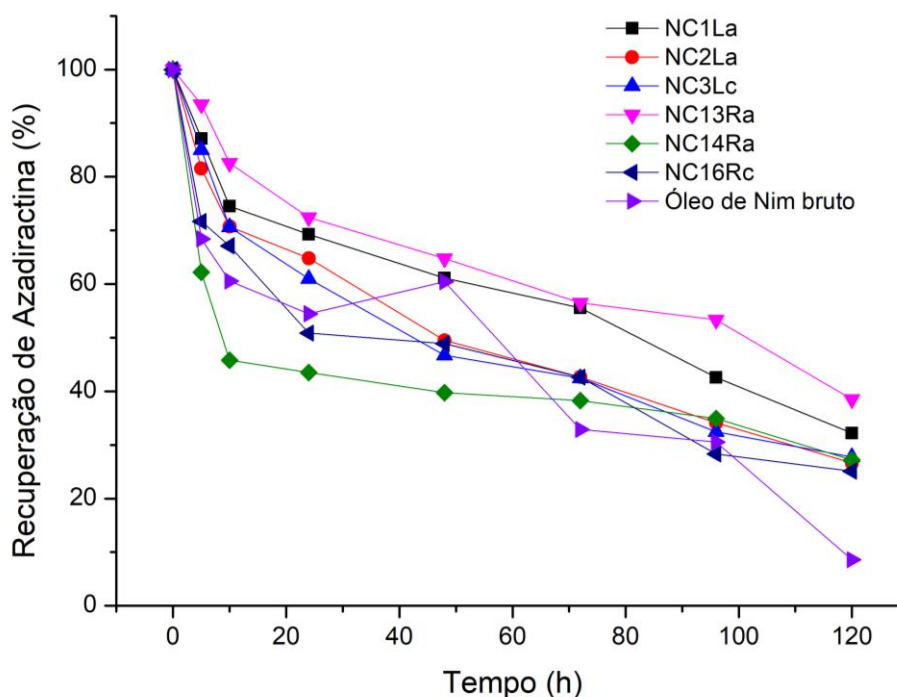


Figura 36. Curvas de porcentagem de recuperação de Azadiractina presente no óleo de Nim bruto e nas nanosuspensões poliméricas, utilizando lâmpada Dulux.

Nos ensaios de degradação fotoquímica foram também utilizados lâmpadas que simulam a radiação solar e as amostras foram expostas por um período de 120 horas. Verificou-se variações significativas na recuperação de Azadiractina A com valores entre 9 e 69% (Figura 39). As nanoformulações NC1La e NC13Ra, ambas

sintetizadas com o polímero PLA e com diferentes processos de evaporação de solvente, apresentaram as maiores porcentagens de recuperação, aproximadamente 32 e 38%, respectivamente. Esses valores são significativamente maiores que a recuperação do óleo de Nim exposto a radiação (9%).

Segundo Martinez (2002) a atividade da Azadiractina, presente no óleo de Nim, pode ser reduzida até 60%, quando exposta a 4 horas a radiação solar. Johnson e Dureja (2006), realizaram o experimento durante 72 dias e constataram que em 15 dias o composto Azadiractina A, presente no óleo de Nim, havia degradado completamente por exposição à radiação UV de lâmpada germicida. Forim et al., 2013, realizou o experimento com lâmpadas de actínio (UVA), por 15 dias, constatou que após 7 dias não haviam mais presença de Azadiractina A, no óleo e no extrato de Nim.

Em ambos ensaios, com as diferentes lâmpadas utilizadas, o melhor resultado para a proteção contra a fotodegradação, foi a amostra NC13Ra (0,1% PLA), apresentando porcentagem de recuperação de 74%, lâmpada UVC e 39%, lâmpada Dulux. Observa-se também que a lâmpada Dulux apresenta menor recuperação também para o óleo de Nim bruto, 53 e 8%, respectivamente. Cabe destacar que o nanopesticida será exposto a radiação solar na qual apresentam comprimentos de onda superiores a 290 nm e estas radiações estão representadas pela lâmpada Dulux.

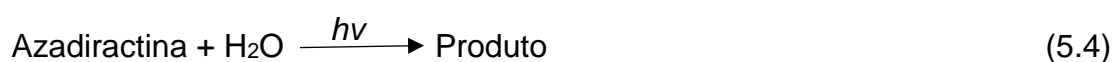
Na Tabela 16 foram apresentados os tempos de meia-vida para cada nanoformulação e o óleo de Nim, expostos as duas lâmpadas com diferentes radiações e potência, conforme as equações de pseudo-primera ordem 5.2. e 5.3, apresentando boas correlações, em acordo com o encontrado por outros autores (Forim et al., 2013; Johnson e Dureja, 2006; Barrek et al., 2004). (Anexo 3, Figura 1 e 2). Os tempos de meia-vida significativamente menores para os testes com a lâmpada UVC podem em parte estarem relacionadas a menor potência dessa lâmpada (15W) quando compara a lâmpada Dulux (36W).

Na Tabela 16 são apresentados os tempos de meia-vida para azadiractina presente no óleo de Nim bruto ou encapsulado em diferentes nanoformulações. A nanoformulação que apresentou melhores resultados para os dois testes foi a nanoformulação NC13Ra, ou seja, a que utiliza PLA 0,1% em sua nanoformulação.

Tabela 14. Resultados de tempo de meia vida das amostras para os ensaios de fotodegradação.

Nanoformulações	Lâmpada UVC	Lâmpada Dulux
	Tempo de meia vida (dias)	Tempo de meia vida (dias)
NC1La	1,44	3,57
NC2La	1,59	2,92
NC4Lc	3,48	2,92
NC13Ra	12,67	4,18
NC14Ra	3,47	3,94
NC16Rc	3,08	2,91
Azamax	3,31	1,70

As nanocápsulas em meio aquoso e de baixa estabilidade, expostas a radiações UV podem ocorrer o inchaço do polímero e consequente liberação do óleo ao meio, o princípio ativo disperso na suspensão, poderia sofrer a degradação a partir da radiação UV ou pelo pH baixo da suspensão (Forim et al., 2013).



Forim (2014), realizou ensaios com óleo e extrato de nim nanoencapsulado com PCL, nanoformulações com e sem Span 60. As nanoformulações e óleo foram expostos a radiação UVC, 15 W, durante 15 dias, os tempos de meia-vida encontrados foram 1,39 dias para o óleo, 7,05 dias para a nanoformulação sem Span 60 e 7,79 com Span 60. Os resultados obtidos nesse estudo foram maiores que os reportados por Forim (2014).

Barrek e seus colaboradores (2004) realizaram seu trabalho utilizando azadiractina, extraída do óleo de neem e metanol para realizar testes com variações de pH (2, 4, 6 e 8) e diferentes fontes irradiações (luz solar, escuridão e lâmpada com vapor de mercúrio de 150 W). Observou-se que a degradação do composto azadiractina foi maior com a lâmpada do que com a luz solar e no pH 4,0, próximo aos obtidos neste trabalho, apresentaram tempo de meia-vida para radiação ultravioleta de 0,9 dias.

5.7. Ensaios Biológico com Ácaros *T. urticae*

Os ensaios biológicos realizados com o ácaro *T. urticae* inicialmente foram realizados com o óleo de Nim, visando se certificar da sua atividade acaricida, bem como qual a concentração mais efetiva. Na sequência foram realizados ensaios de

tratamento com a Azadiractina encapsulada com os polímeros 0,1% de PLA (NC13Ra) e 0,1% de PCL (NC16Rc), além do tratamento testemunha (NC25Ra – 01% PLA e NC26Rc – 0,1% PCL, respectivamente).

As concentrações do teor de Azadiractina testadas foram: 32, 64, 128 e 256 mg L⁻¹, conforme já utilizadas nos testes de Martínez-Villar et al. (2005). As arenas foram acompanhadas durante sete dias nas fases de ovos e adultos.

Os resultados referentes as arenas pulverizadas com diferentes concentrações de Azadiractina e suas nanoformulações estão apresentados nas Figuras 40 e 41. Ao final do período de 7 dias para todas as concentrações de Azadiractina avaliadas obteve-se 100% mortalidade corrigida. A concentração de 256 mg L⁻¹ alcançou a mortalidade mais acentuada após o terceiro dia de ensaio, enquanto que as concentrações de 64 mg L⁻¹ e 128 mg L⁻¹, alcançaram 100% da mortalidade após 5 dias de avaliação (Figura 40).

Segundo Menezes (2005), os inseticidas são classificados em quatro categorias conforme o grau do dano que eles causam as pragas-alvo: S até 20%, seletivo; B entre 21 e 40%, baixa toxicidade; M entre 41 e 60%, média toxicidade e A entre 61 e 100%, alta toxicidade. Portanto as concentrações que podem ser consideradas de alta toxicidade são as superiores a 64 mg L⁻¹. Seus valores a partir do quarto dia de avaliação apresentaram índices superiores a 77% de mortalidade corrigida para esta peste-alvo.

Martínez-Villar et al. (2005) em seu estudo com o *T. urticae* e Azadiractina, considerou que as concentrações de 64 e 128 mg L⁻¹ diminuiriam consideravelmente a longevidade dos ácaros em estudo, em 4 dias de acompanhamento. Valor este muito próximo ao encontrado neste trabalho.

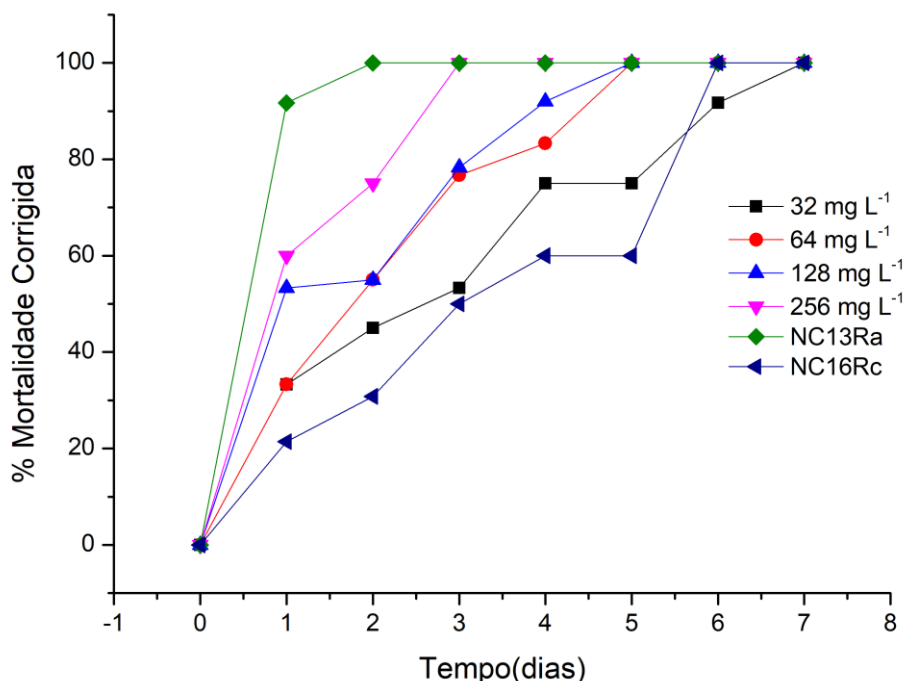


Figura 37. Resultados da % da mortalidade corrigida de ácaros pelo tempo (dias) em diferentes concentrações de Azadiractina no óleo e em nanoformulações.

As nanoformulações utilizadas para estes ensaios foram calculadas para obterem concentrações de aproximadamente 256 mg L⁻¹ de Azadiractina em sua composição. Esta diferença foi adotada devido a liberação lenta do princípio ativo, a fim de garantir uma concentração próxima a 128 mg L⁻¹. Forim et al. (2013), em seu trabalho aplicou as suas suspensões coloidais em *P. xylostella* e utilizou nos ensaios com o óleo concentração de 4000 mg kg⁻¹ e nas nanoformulações 5000 mg kg⁻¹, valores muito mais elevados que os utilizados nesse estudo.

A partir da Figura 40 é possível verificar que para a amostra NC13Ra (0,1% PLA) foi alcançada 100% de mortalidade corrigida já a partir do segundo dia, enquanto que para a amostra NC16Rc (0,1% PCL) a mesma mortalidade é alcançada somente a partir do sexto dia.

Esta diferença pode estar relacionada com a maior liberação Azadiractina pela amostra NC13Ra (0,1% PLA) verificada nos testes de liberação controlada. De acordo com os resultados apresentados a nanoformulação também demonstra maior efetividade na mortalidade quando comparados ao óleo de Nim não encapsulado, em todas as concentrações testadas. Esses resultados devem estar relacionados a proteção fotoquímica fornecida a Azadiractina pela matriz polimérica, visto que nesses testes há exposição à radiação solar durante 16 horas por dia.

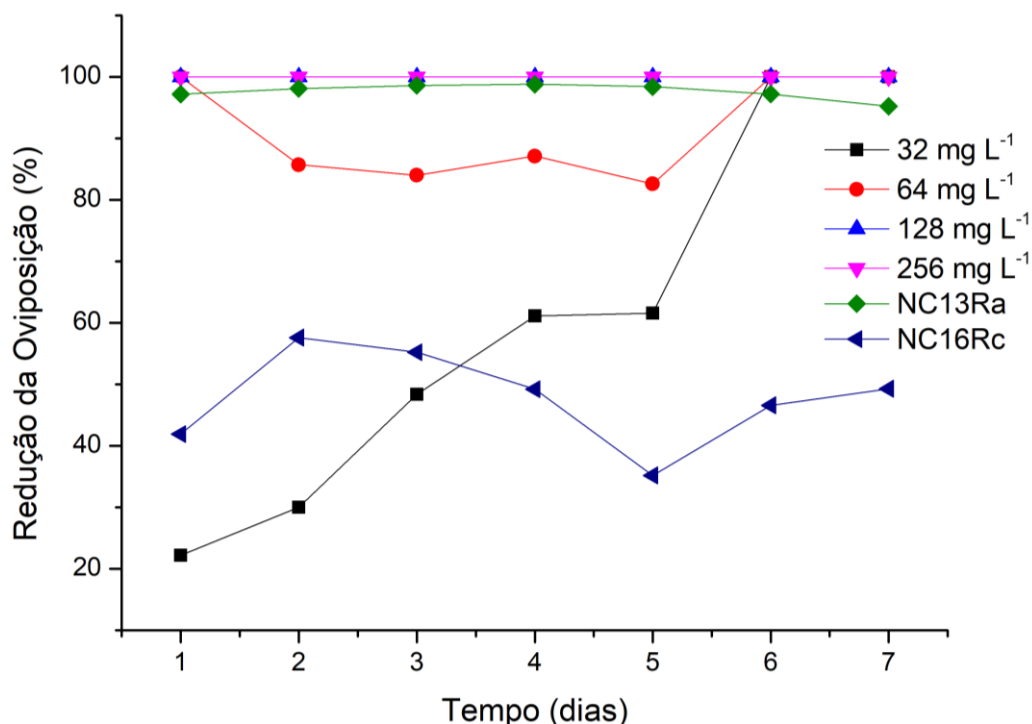


Figura 38. Resultados da % da redução da oviposição de ácaros pelo tempo (dias) em diferentes concentrações de Azadiractina.

Os ovos postos pelas fêmeas diminuíram significativamente a partir da concentração de 64 mg L⁻¹, enquanto em 128 e 256 mg L⁻¹ não ocorreu oviposição durante o período de avaliação. Martínez-Villar et al. (2005), já havia reportado a diminuição da oviposição para o ácaro *T. urticae*, quando exposto ao composto Azadiractina, porém sob decréscimo significativo a partir de 32 mg L⁻¹.

Novamente pode ser observado que a suspensão coloidal que apresentou melhor resultado foi a NC13Ra (0,1% PLA), apresentando redução na oviposição, com valores próximos a concentração de 256 mg L⁻¹.

A partir dos resultados obtidos com os ácaros é possível provar que o óleo de Nim, além de ser eficiente na mortalidade corrigida, também reduz a oviposição para o *T. urticae*. Cabe destacar que as suspensões coloidais apresentaram a mesma eficiência e ainda a proteção fotoquímica ao longo de 7 dias de exposição à radiação luminosa.

Os resultados obtidos são promissores e possibilitam utilizar o PLA como polímero encapsulante do óleo de Nim, proporcionando proteção térmica e

fotoquímica, evitando assim a sua rápida degradação. Cabe destacar a sua eficiência na liberação controlada, permitindo o combate a peste-alvo, *T. urticae*.

6. CONCLUSÕES

Por meio das técnicas de caracterização empregadas para o óleo de Nim, é possível verificar que o óleo apresenta em sua composição os compostos Azadiractina A e Azadiractina B, ambos pertencentes ao óleo de Nim, sendo a Azadiractina A em maior concentração, 12,803 g L⁻¹. Além disso, o óleo apresenta somente produtos naturais em sua composição.

Os resultados de caracterização das nanoformulações obtidos, utilizando a evaporação de solvente por rotaevaporação, apresentaram excelente capacidade de encapsulamento do óleo de Nim (superior a 93%), pH, tamanhos de partículas (215 a 289 nm), índice de polidispersão (0,13 a 0,25), potencial zeta (-18,9 a -49,1 mV) e partículas no formato esférico, compatíveis com a técnica de nanoprecipitação, tanto para o polímero PCL como para o PLA.

As nanoformulações apresentaram estabilidade na temperatura de 4°C, ao longo de 6 meses de acompanhamento, a estocagem em temperatura ambiente não se mostrou adequada implicando na necessidade de conservação das amostras sob refrigeração. Por conseguinte, o encapsulamento polimérico proporciona a Azadiractina proteção térmica e fotoquímica, a amostra NC13Ra (0,1% PLA) apresentou valores de recuperação de 55% quando exposta a temperatura de 60°C e recuperações de 74% e 39%, quando expostas a lâmpada UVC e Dulux, respectivamente. A liberação controlada foi eficiente ao longo de 168 horas, com porcentagem de liberação de Azadiractina em torno de 97 % para a amostra NC13RA (0,1% PLA) e 71%, para a NC16Rc (0,1% PCL).

As microcápsulas secas por aspersão apresentaram maiores rendimentos, doseamentos, menores tamanhos de partículas (~3000 nm) e formato esférico. A nanoformulação que apresentou melhores resultados de rendimento (56,6%) e doseamento de Azadiractina (649, mg kg⁻¹) foi a NC13RaS (0,1% PLA).

Os estudos da ação acaricida demonstraram que tanto para o óleo como as suspensões avaliadas apresentaram excelentes resultados tanto em relação a mortalidade quanto na redução de oviposição do ácaro *T. urticae*. A nanosuspensão NC13Ra (0,1% PLA) apresentou os melhores resultados como acaricida atingindo 100% mortalidade corrigida após o segundo dia de aplicação, além de não ocorrer oviposição. Esses resultados sugerem a possibilidade do uso do PLA como matriz

polimérica alternativa e competitiva ao PCL para o nanoencapsulamento do óleo de Nim visando seu uso como biopesticida.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, Riverside, v. 18, p. 265-267, 1925.

ABDELHAMID, M. S., Kondratenko, E. I., Lomteva, N. A. GC-MS analysis of phitocompounds in the ethanolic extracts of *Nelumbo nucifera* seeds from Russia. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**. Vol. 5, p. 115-118, 2015.

ABDELWAHED, W. et al. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, v. 58, p. 1688-1713, 2006.

ABREU, S. L. **Caracterização e dispersão em meio aquoso da α -Alumina com tamanho de partícula submicrométrico e nanométrico**. Ouro Preto, 2011. 80 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais). Universidade Federal de Ouro Preto, Brasil.

AHLIN, P. et al. Investigation of polymeric nanoparticles as carriers of enalaprilat for oral administration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 239, p. 113-120, 2002.

ALI, M. A. et al. Nanotechnology: A new frontier in Agriculture. **Advancements in Life Sciences**. Vol. 1, nº.3, p. 129-138, 2014.

ALI, A. et al. Antibacterial bi-layered polyvinyl alcohol (PVA)-chitosan blend nanofibrous mat loaded with *Azadirachta indica* (*neem*) extract. **International Journal of Biological Macromolecules**. Vol. 138, p. 13-20, 2019.

ALMOUAZEN, E et al. Nano-encapsulation of Vitamin D3 Active Metabolites for Application in Chemotherapy: Formulation Study and in Vitro Evaluation. **Pharmaceutical Research**. Vol. 30, p. 1137-1146, 2013.

ALVES, P. D. **Avaliação cromatográfica e atividade antimicrobiana de produtos preparados com Nim (*Azadiracthta indica*, A. Juss. Meliceae)**. Belo Horizonte, 2007. 75 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Minas Gerais.

AMBRÓSIO, M. M. Q. **Sobrevivência de *Macrophomina phaseolina* em solo incorporado com brócolos seguido de solarização**. Botucatu, 2003. 58 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

ANJALI, C. H. et al. Neem oil (*Azadirachta indica*) nanoemulsion-a potente larvicidal agente against *Culex quinquefasciatus*. **Pest Management Science**. Vol. 68, nº. 2, p. 158-163, 2012.

ANTONOW, M. B. **Desenvolvimento Tecnológico e avaliação dos perfis de liberação in vitro de suspensões contendo nanocápsulas de desonida com diferentes polímeros**. Santa Maria, 2012. 100 p. Dissertação (Mestrado em Nanociências). Centro Universitário Franciscano, Brasil.

AKPUACA, A. et al. Biological Activities of Characterized Isolates of n-Hexane Extract of *Azadirachta Indica* A. Juss (Neem) Leaves. **New York Science Journal**. Vol. 6, p. 119-124, 2013.

ARAÚJO, R. S. **Desenvolvimento, caracterização e liofilização de nanopartículas e encapsulamento de antibiótico de uso veterinário**. Ouro Preto, 2009. 131 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Ouro Preto, Brasil.

BALAURE, P. C.; Gudovan, D.; Gudovan, I. Nanopesticides: A new paradigm in crop proection. In: **New pesticides and soil sensors**. Cap 4, p. 129 – 192, 2017.

BANCO MUNDIAL. World Development Indicators Database. Total GDP 2017. World Bank, 2017. Disponível em: <<https://data.worldbank.org/indicator/SP.POP.TOTL>> Acesso em: 26 agosto 2018.

BARREK, S. et al. Analysis of neem oils by LC–MS and degradation kinetics of azadirachtin-A in a controlled environment. Characterization of degradation products by HPLC–MS–MS. **Anal Bioanal Chem.** Vol. 378, p. 753–763, 2004.

BEBASHRI, M., Tamal, M. A Review on efficacy of *Azadirachta indica* A. Juss based biopesticides: An Indian perspective. **Research Journal of Recent Sciences.** Vol. 1, nº.3, p. 94-99, 2012.

BECK, R.C., Pohlmann, A. R., Guterres, S. S. Nanoparticle-coated microparticles: preparation and characterization. **Journal of Microencapsulation.** Vol. 21, p. 499-512, 2004.

BENICIO, D. A., NETO, V. Q., SOUSA, J. G. Avaliação das propriedades físico-químicas e da composição química parcial do óleo de semente de nim indiano (*Azadirachta indica* A. juss) cultivado no município de Patos – Paraíba. **BioFar Revista de Biologia e Farmácia.** Vol. 4, p. 22-33, 2010.

BICUDO, R. C. S. **Nanopartículas de Ácido Hialurônico produzidas por nanoprecipitação e reticulação química: processos e caracterização.** São Paulo, 2011. 172 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas, Brasil.

BOEHM, A. L. et al. Nanoprecipitation technique for the encapsulation of agrochemical active ingredients. **Journal Microencapsulamento.** Vol. 20, nº. 4, p. 433-441, 2003.

BRASIL, Decreto N° 06.323 de 27 de dezembro de 2007. <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/organicos>, acesso 25/02/2019.

BRITO, G. F. et al. Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**. Vol. 6.2, p. 127-139, 2011.

BRITO, O. S. **Efeitos do óleo de Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) sobre a reprodução e perfil metabólico de machos ovinos**. Viçosa. 2013. 74 p. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Federal de Viçosa, Brasil.

CALVO, P., Vila-Jato, J. L., Alonso, M. J. Comparative *in Vitro* Evaluation of Several Colloidal Systems, Nanoparticles, Nanocapsules, and Nanoemulsions, as Ocular Drug Carriers. **Journal Pharmaceutics Sciences**. Vol 85, p. 530-536, 1996.

CARVALHO, P. R. S. **Extratos Vegetais: Potencial Elicitor de Fitoalexinas e Atividade Antifúngica em Antracnose do Cajueiro**. Joboticabal. 2010. 51 p. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias e Veterinárias). Unesp, Brasil.

CARVALHO, S. S. et al. Efeito inseticida sistêmico de nanoformulações à base de Nim sobre *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) biótipo B em tomateiro. **Brangatia**. Vol. 71, nº.3, p. 298-306, 2015.

CASTRO, A. et al. Effect of pyroligneous extract of *Acacia mearnsii* on *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) (Acari, Tetranychidae) and *Neoseiulus californicus* (McGregor, 1954) (Acari, Phytoseiidae). **Biotemas**. Vol. 28, p. 99-103, 2015.

CAUCHETIER, E. et al. Atovaquone-loaded nanocapsules: influence of the nature of the polymer on their in vitro characteristics. **International Journal of Pharmaceutics**. Vol. 250, p. 273-281, 2003.

CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Biodegradable Polymers. **Progress in Polymer Science**. Vol. 23, p. 1273-1335, 1998.

CHASTEINGER, S. et al. Comparative study of the association of Triconazole with colloidal drug carriers. **Drug Development Research**. Vol. 32, p. 125-133, 1996.

CHHIPA, H. Nanofertilizers and nanopesticides for agriculture. **Environmental Chemistry Letters**. Vol. 15, p. 15-22, 2017.

CHOI, M. J. et al. Effect of Freeze-Drying Process Conditions on the Stability of Nanoparticles. **Drying Technology**. Vol. 22, p. 335-346, 2004.

COSTA, E. S. **Nano-microencapsulados de extrato de *Azadirachta Indica* usando ligninas de bagaço de cana-de-açúcar: estabilidade e eficácia contra insetos pragas**. São Paulo. 2014. 140 p. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal de São Carlos, Brasil.

COSTA, J. T. et al. Effects of different formulations of neem oil-based products on control *Zabrotes subfasciatus* (Boheman, 1833) (Coleoptera: Bruchidae) on beans. **Journal of Stored Products Research**. Vol. XXX, p. 1-5, 2013.

CRUZ, L. **Estudo físico-químico comparativos de sistemas nanoestruturados contend Indometacina ou Éster Etilico e avaliação in vivo da atividade Antiedematogênica**. Porto Alegre. 2005. 108 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade do Rio Grande do Sul, Brasil.

CZAJA, K. et al. Biopesticides – towards increased consumer safety in the EU. **Pest Management Science**. Vol. 71, p. 3-6, 2014.

DABROWSKI, Z. T.; Seredyńska, U. Characterisation of the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch, Acari: Tetranychidae) response to aqueous extracts from selected plant species. **Journal Plant Protection Research**. Vol. 47, p. 113-124, 2007.

DELGADO, J. M. F. **Preparação e caracterização de nanotransportadores (nanocápsulas, nanoesferas, lipossomas e transportadores lipídicos nanoestruturados) sem substância ativa**. Bragança. 2013. 117 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Biomédica). Instituto Politécnico de Bragança, Portugal.

DOMINGUES, G. S. **Caracterização físico-química e avaliação dos perfis de liberação in vitro de micropartículas revestidas com nanocápsulas poliméricas.** Porto Alegre. 2006. 161 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

DORRI, H. R. et al. The Effect of Copper Nano-capsules on the Control of Two Spotted Spider Mite (*Tetranychus urticae*). **Journal Nanostructures**. Vol. 8, p. 316-324, 2018.

EL-WAKEIL, N. E. Botanical Pesticides and Their Mode of Action. **Gesunde Pflanzen**. Vol. 65, nº. 4, p. 125-149, 2013.

EZHILARASI, P. N. et al. Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components: A Review. **Food Bioprocess Technology**. Vol. 6, p. 628-647, 2013.

FENG, P. H., Peng, L. E. Synthesis and Characterization of carboxymethyl chitosan carrying ricinoleic functions as an emulsion for azadirachtin. **Carbohydrate Polymer**. Vol. 88, p. 576-582, 2012.

FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**. Vol. 55, p. R1-R4, 1989.

FESSI, H. Paris, França. **Procédé de préparation de sstemes coll"i"daux sispersibles d'une substance, sous forme de nanocapsules.** In CI4: Bo1J 13/02; A61k 9/50. Dep. FR87402998-6. 28 dez. 1987. 20 jul.1988. Centre National de la Recherche Scientifique. França.

FINSY, R. et al. Particle Sizing by Photon Correlation Spectroscopy. Part III: Mono and Bimodal Distributions and Data Analysis. **Particle and Particle Systems Characterization**. Vol. 9, p. 125-137, 1992.

FLECHTMANN, C. H. W. **Ácaros de Importância Agrícola.** São Paulo. Editora Nobel, 1972. 150 p.

FONSECA, L. B. **Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas contendo Praziquantel para o tratamento da Equistossomose**. Rio de Janeiro. 2012. 233p. Tese (doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio de Janeiro.

FONTANA, M. C. et al. Nanocapsules Prepared from Amorphous Polyesters: Effect on the Physicochemical Characteristics, Drug Release, and Photostability. **Nanoscience And Nanotechnology**. Vol. 10, p. 3091-3099, 2010.

FORIM, M. R. **Estudo fitoquímico do enxerto de *Azadirachta indica* sobre *Melia Azedarach*: Quantificação de substâncias inseticidas**. São Paulo. 2006. 320p. Tese (Doutorado em Química Orgânica). Universidade Federal de São Carlos, Brasil.

FORIM, M. R. et al. Simultaneous quantification of azadirachtin and 3-tigloylazadirachtol in Brazilian seeds and oil of *Azadirachta indica*: application to quality control and marketing. **Analytical Methods**. Vol. 2, p. 860-869, 2010.

FORIM, M. R. **Processo de obtenção de nanopartículas biopoliméricas contendo óleo e extratos de *azadirachta indica* A. juss (neem), nanopartículas biopoliméricas e micropartículas em pó**. In: BR2014/000044. 23 jan. 2014. 31 jul. 2014a.

FORIM, M. R. et al. Synthesis of Nanopesticides by Encapsulating Pesticide Nanoparticles Using Functionalized Carbon Nanotubes and Application of New Nanocomposite for Plant Disease Treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Vol. 62, p. 4833-4838, 2014b.

FORIM, M. R. et al. Development of a New Method to Prepare Nano-/microparticles Loaded with Extracts of *Azadirachta indica*, Their Characterization and Use in Controlling *Plutella xylostella*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Vol. 61, p. 9131-9139, 2013.

FUKUSHIMA, K., Tabuani, D., Camino, G. Nanocomposites of PLA and PCL based on montmorillonite and sepiolite. **Materials Science and Engineering C**. Vol. 29, p. 1433-1441, 2009.

GAHUKAR, R. T. Factors affecting content and bioefficacy of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) phytochemicals used in agricultural pest control: A review. **Crop Protection**. Vol. 62, p. 93-99, 2014.

GHODAKE, V. N. et al. Nanoengineered systems for biopesticides. In: **Handbook of nanomaterials for industrial applicatin**. Capitulo 14, 2018, v. 4, p. 243-259.

GHORMADE, V.; Deshpande, M. V.; Pakinikar, K. M. Perspectives for nano-biotechnology enabled protection and nutrition of plants. **Biotechnology Advances**. Vol. 29, p. 792-803, 2011.

GIONGO, A. M. M.; Vendramim, J. D.; Forim, M. R. Evaluatoin of neem-based nanoformulations as alternative to control fall armyworm. **Ciência e Agrotecnologia**. Vol. 40, nº. 1, p. 26-36, 2015.

GRILLO, R. et al. Nanoparticulas polimericas como sistemas de liberaçãõ para herbicidas. In: **Nanotecnologia: ciência e engenharia**. Cap. 3, p. 83-124, 2012.

GUTERRES, S. S. et al. Poly (DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. **International Journal Pharmaceutics**. Vol. 113, p. 57-63, 1995.

GUINEBRETIERE, S. et al. Nanocapsules of biodegradable polymers: preparation and characterization by direct high resolution electron microscopy. **Materials Science and Engineering C**. Vol. 21, p. 137-142, 2002.

HANIFAH, L. et. al. Acaricidal activity of *Cymbopogon citratus* and *Azadirachta indica* against house dust mites. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. P. 365-369, 2011.

HAYLES, J. et al. Nanopesticides: A Review of current research a perspective. In: **New pesticides and soil sensors**. Cap 5, p. 193–225, 2017.

HEMA, R. KUMARAVEL, S. ALAGUSUNDARAM, K. GC/MS Determination of Bioactive Components of *Murraya koenigii*. **Journal American Science**. Vol. 7, p. 80-83, 2011.

HOFFMANN, F. et al. Preparation, characterization and cytotoxicity of methymethacrylate copolymer nanoparticles with a permanent positive surface charge. **International Journal of Pharmaceutics**. Vol. 157, p. 189-198, 1997.

HORN, D., Rieger, J. Organic Nanoparticles in the Aqueous Phase—Theory, Experiment, and Use. **Angewandte Chemie International**. Vol. 40, p. 4330-4361, 2001.

HOSSAIN, M. A. et al. Identification and characterization of chemical compounds in different crude extracts from leaves of Omani neem. **Journal of Taibah University for Science**. Vol. 7, p. 181-188, 2013.

HUMMEL, H. E.; Hein, D. F.; Schmutterer, H. The coming of age of azadirachtins and related tetranortriterpenoids. **Journal Biopesticides**. Vol. 5, p. 82-87, 2012.

JAMPÍLEK, J. Král'ová, K. Nanopesticides: Preparation, targeting, and controlled release. In: **New pesticides and soil sensors**. Cap 3, p. 81 – 127, 2017.

JEROBIN, J. et al. Biodegradable polymer-based encapsulation of neem oil nanoemulsion for controlled release of Aza-A. **Carbohydrate Polymers**. Vol. 90, p. 1750-1756, 2012.

JOHNSON, S., Dureja, P. Effect of Surfactants on Persistence of Azadirachtin-A (Neem Based Pesticide). **Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**. Vol. B37(1), p.75–80, 2006.

KAH, M., Hofmann, T. Nanopesticide research: Current trends and future priorities. **Environment International**. Vol. 63, p. 224-235, 2014.

KAH, M. et al. Analysing the fate of nanopesticides in soil and the applicability of regulatory protocols using a polymer-based nanoformulation of atrazine. **Environmental Science and Pollution Research**. Vol. 21, p. 11699-11707, 2014.

KAMARAJ, C., et al. Novel and environmental friendly approach; Impact of Neem (*Azadirachta indica*) gum nano formulation (NGNF) on *Helicoverpa armigera* (Hub.) and *Spodoptera litura* (Fab.). **International Journal of Biological Macromolecules**. Vol. 107, Part A, p. 59-69, 2018.

KAUSHIK, P. et al. Development of controlled release formulations of thiram employing amphiphilic polymers and their bioefficacy evaluation in seed quality enhancement studies. **Journal Environmental Science and Health, Part B**. Vol. 48, p. 677-685, 2013.

KHOEE, S., Yaghoobian, M. An investigation into the role of surfactants in controlling particle size of polymeric nanocapsules containing penicillion-G in double emulsion. **European Journal of Medicinal Chemistry**. Vol. 44, p. 2392-2399, 2009.

KISSEL, T. et al. Microencapsulation techniques for parental depot systems and their application in the pharmaceutical industry. In: **Microencapsulation methods and industrial applications**. Cap: 14, p. 98-122, 2006.

KNAPP, M.; Kashenge, S. S. Effects of Different Neem Formulations on the Twospotted Spider Mite, *Tetranychus urticae* Koch, on Tomato (*Lycopersicon Esculentium mill.*). **Insect Science and its Application**. Vol. 23, p. 1-7, 2003.

KORSMEYER, R. W., Peppas, N. A. Effect of the morphology of hydrophilic polymeric matrices on the diffusion and release of water soluble drugs. **Journal of Membranes Science**. Vol 9, p. 211-227, 1981.

KUMAR J. et al. Development of controlled release formulations of azadirachtin-A employing poly (ethylene glycol) based amphiphilic copolymers. **Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**. Vol. 45, p. 310-314, 2010.

KUMAR, J. Singh, A. Biopesticides: Present Status and the Future Prospects. **Journal of Fertilizers & Pesticides**. Vol. 6, n° 2, p. 1-2, 2015.

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

LEMOS, A. L. **Avaliação da degradação abiótica e biótica de biocompósitos produzidos a partir de bioblendas de PCL/PLA com fibras vegetais – madeira de pinus, cana-de-açúcar e babaçu**. Porto Alegre, 2017. 148 p. Tese (Doutorado em Engenharia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

LEY, S. V.; Denholm, A.A.; Wood, A. The Chemistry of Azadirachtin. **Natural Products Reports**. Vol. 10, n°. 2, p. 109–157, 1993.

LOSA, C. et al. Design of new formulation for topical ocular administration: Polymeric nanocapsules containing Metipranolol. **Pharmaceutical Research**. Vol. 10, p. 80-87, 1993.

MARTÍN, L. et al. Supercritical methodologies applied to the production of biopesticides: a review. **Phytochem Reviews**. Vol. 11, p. 413-431, 2012.

MARTÍNEZ-VILLAR, E. et al. Effects of azadirachtin on the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). **Experimental na Applied Acarology**. Vol. 35, p. 215-222, 2005.

MARTINEZ, S. S. O Nim – Azadiracta indica: natureza, usos múltiplos, produção. **Instituto Agrônômico do Paraná**. P. 142, 2002.

MENEZES, E. L. A. Inseticidas Botânicos: seus Princípios Ativos, Modo de Ação e Uso Agrícola. Documento 205. Embrapa. Seropédica-RJ, 2005.

MOGUL, M. G. et al. Controlled release of biologically active agents for purposes of agricultural crop management. **Resources, conservation and recycling**. Vol. 16, p. 289-320, 1996.

MOINARD-CHECOT, D. et al. Nanoparticles for drug delivery: Review of the formulation and process difficulties illustrated by the emulsion-diffusion process. **Journal Nanoscience and Nanotechnology**. Vol. 6, p. 2664-2681, 2006.

MORAES, G.J.; FLECHTMANN, C.H.W. **Manual de acarologia: acarologia básica e ácaros de plantas cultivadas no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2008. 308 p.

MORAIS, G. G. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais acrescidas de xantina para tratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite)**. Ribeirão Preto. 2006. 181 p. Mestrado (Mestre em Ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo, Brasil.

MORA-HUERTAS, C.E., Fessi, H., Elaissari, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**. Vol. 385, p. 113-142, 2010.

MORGAN, E. D. Azadirachtin, a scientific gold mine. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. VOL. 17, p. 4096–4105, 2009.

MOREIRA, M. D. et al. Uso de inseticidas botânicos no controle de pragas. In: **Controle alternativo de pragas e doenças**. Viçosa: EPAMIG/CTZM, p.89-120, 2005.

MOSQUEIRA, V. C. F. et al. Poly (D, L-Lactide) Nanocapsules Prepared by a Solvent Displacement Process: Influence of the Composition on Physicochemical and Structural Properties. **Journal of Pharmaceutical Science**. Vol. 89, p. 614-626, 2005.

MOSSINI, S. A. G.; Kimmelmeier, C. A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): Múltiplos Usos. **Acta Farmacéutica Bonaerense**. Vol. 24, nº 1, p. 139-148, 2005.

MÜLLER, C. R., et al. Preparation and Characterization of Spray Dried Polymeric Nanocapsules. **Drug Development and Industrial Pharmacy**. Vol 26, p. 343-347, 2000.

NAIR, L. M. et al. Determination of polysorbate 80 in parenteral formulations by high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection. **Journal Chromatography A**, Vol. 1012, p. 81-86, 2003.

NEVES, E.J.; Carpanezi, A. A. O cultivo do Nim para a produção de frutos no Brasil. **Embrapa – Circular Técnica 162**. P. 1-8, 2008.

NURUZZAMAN, M. et al. Nanoencapsulation, Nano-Guard for Pesticides: A New Window for Safe Application. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Vol. 64, nº. 7, p. 1447-1483, 2016.

OBENG-OFORI, D. Plant oils as grain protectants against infestations of *Cryptolestes pusillus* and *Rhyzopertha dominica* in stored grain. **Entomologia Experimentals et Applicata**. Vol, 77, p. 133-139, 1995.

OLIVEIRA, J. L. et al. Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: Prospects and promises. **Biotechnology Advances**. Vol. xxx, p. 1-12, 2014.

OLIVEIRA S. S. M. **Nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo tamoxifeno: preparação, caracterização e avaliação *in vitro* e *in vivo***. Ribeirão Preto. 2014. 117 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo, Brasil.

OSHIOBUGIE, M. J.; Olaniyi, A. M.; Raphael, A. O. AAS and GC-MS Analysis of Phytocomponents in the Leaf, Stem and Root of *Azadiractha indica* A. juss (Dongoyaro). **British Journal of Pharmaceutical Research**. Vol. 15, p. 1-12, 2017.

PACHECO, L. F., Alves, T. H.S. **Manejo Integrado do Ácaro *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) em Cultura de Pimentão *Capsicum annuum* L.** Lins.

2017. 61 p. Trabalho de conclusão de curso (Engenharia Agrônômica). Centro Universitário Católico Salesiano *Auxilium*, São Paulo.

PARISI, C., Vigani, M., Rodríguez-Cerezo, E. Agricultural Nanotechnologies: What are the current possibilities? **Nano Today**. Vol. 10, p. 124-127, 2015.

PASCOLI, M. et al. Neem oil based nanopesticide as an environmentally-friendly formulation for applications in sustainable agriculture: An ecotoxicological perspective. **Science of Total Environmental**. Vol, 667, p. 57-67, 2019.

PASQUOTO-STIGLIANI, T. **Carreadores nanoestruturados para o biocida azadiractina (óleo de Neem) visando aplicações no controle de pragas**. Sorocaba. 2016. 97 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental). Universidade Federal de São Carlos.

PASQUOTO-STIGLIANI, T. et al. Nanocapsules Containing Neem (*Azadirachta Indica*) Oil: Development, Characterization, and Toxicity Evaluation. **Scientific Reports** 7, p. 1-12, 2017.

PAUL, M. et al. Pentamidine-loaded poly (D, L-lactide) nanoparticles: physicochemical properties and stability work. **International Journal Pharmaceutics**. Vol. 159, p. 223-232, 1997.

PÉREZ-DE-LUQUE, A., Herмосín, M. C. Nanotechnology and its Use in Agriculture. In: **Bio-technology a revolution in food, biomedicina, and health sciences**. Cap. 20, p. 383-398, 2013.

PERLATTI, B. et al. Polymeric Nanoparticle-Based Insecticides: A controlled release purpose for agrochemical. In: **Insecticides – Development of safer and more effective technologies**. Cap. 20, p. 523-550, 2013.

POHLMANN, A. R. et al. Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability evaluation and nanostructure models. **European Journal Pharmaceutics Sciences**. Vol. 16, p. 305-312, 2002.

POHLMANN, A. R. et al. Poly (ϵ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. **Expert Opin Drug Delivery (Review)**. Vol. 10, p. 1-16, 2013.

PRISTA, L. N.; Alves, A. C.; Morgado, R. M. R. **Tecnologia farmacêutica e Farmácia Galênica**, vol. I. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1990.

RAFFIN, R. P. et al. Nanocápsulas Poliméricas Secas Contendo Indometacina: Estudo de Formulação e de Tolerância Gastrointestinal em Ratos. **Acta Farmacêutica Boraerense**. Vol. 22, p. 163-172, 2003.

RAGAEI, M., Sabry, A. H. Nanotechnology for insect pest control. **International Journal of Science, Environment**. Vol. 3, nº. 2, p. 528-545, 2014.

RAQUEZ, J. et al. Polylactide (PLA)-based nanocomposites. **Process in Polymer Science**. Vol. 38, p.1504– 1542, 2013.

RASAL, R. M., Janorkar, A. V., Hirt, D. E. Poly (lactic acid) modifications. **Progress in Polymer Science**. Vol. 35. P. 338-356, 2010.

RASHIDZADEH, A. et al. On the Encapsulation of Natural Pesticide Using Polyvinyl Alcohol/Alginate–Montmorillonite Nanocomposite for Controlled Release Application. **Polymer Engineering and Science**. Vol. 54, p. 2707-2714, 2013.

RATHER, M. A. et al. Synthesis and characterization of *Azadirachta indica* constructed silver nanoparticles and their immunomodulatory activity in fish. **Aquaculture Research**. P. 1-13, 2016.

RAWAT, K. et al. Effectiveness of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) oil against decay. **Science and Technology Journal**. Vol. 5, p. 48-51, 2017.

RIBAS, D. A. **Desenvolvimento de nanocápsulas contendo cetoprofeno e avaliação *in vitro* da citotoxicidade**. Santa Maria. 2013. 67 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Santa Maria.

RIYAJAN, S., Sakdapipanich, J. T. Encapsulated neem extract containing Azadiractin-A within hydrolyzed poly (vinyl acetate) for controlling its release photodegradation stability. **Chemical Engineering Journal**. Vol. 152, p. 591-597, 2009.

RIYAJAN, S., Sakdapipanich, J. T. Characterization of biodegradable semi-interpenetrating polymer based on poly (vinyl alcohol) and sodium alginate containing natural neem (*Azadirachta indica*) for controlled release application. **Polymer International**. Vol. 59, p. 1130-1140, 2010.

ROY, A. et al. Controlled pesticide release from biodegradable polymers. **Central European Journal of Chemistry**. Vol. 12, n°. 4, p. 453-469, 2014.

ROY, P. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using *Azadirachta indica* leaf extract and its antimicrobial study. **Applied Nanoscience**. Vol. 7, p. 843-850, 2017.

SARWAR, M.; Salman, M. Success Stories of Eco-friendly Organically Acceptable Insecticides as Natural Products Discovery. **International Journal of Materials Chemistry and Physics** Vol. 1, n°. 3, p. 388-394, 2015.

SCHAAF, O. et al. Rapid and sensitive analysis of azadirachtin and related triterpenoids from Neem (*Azadirachta indica*) by high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal Chromatography A**. Vol. 886, p. 89-97, 2000.

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

SCHLESENER, D. C. H. et al. Efeitos do Nim sobre *Tetranychus urticae* Koch (ACARI: Tetranychidae) e os predadores *Phytoseiulus macropilis* (Banks) e *Neoseiulus californicus* (MCGregor) (ACARI: Phytoseiidae). **Revista Brasileira Fruticultura**. Vol, 35, p. 59-66, 2013.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; Stangarlin, J.R.; Cruz, M. E. S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta**, n.30, p.129-137, 2000.

SEIFI, R.; Moharramipour, S.; Ayyari, M. Acaricidal activity of different fractions of *Moringa peregrina* on two spotted spider mite *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). **Industrial Crops & Products**. Vol. 125, p. 616-621, 2018.

SHAKIL, N. A. et al. Development of Poly (ethylene glycol) based amphiphilic copolymer for controlled release delivery of carbocyanine. **Journal of Macromolecular Science. Part A: Pure and Applied Chemistry**. Vol. 47, p. 241-247, 2010.

SHARMA, V. et al. Azadirachtin-A and tetrahydroazadirachtin-A concentrates: preparation, LC-MS characterization and insect antifeedant/IGR activity against *Helicoverpa armigera* (Hübner). **Pest Management Science**. Vol. 62, p. 965-975, 2006.

SHENNAN, C. et al. Organic and Conventional Agriculture: A useful framing? **Annual Review of Environmental and Resources**. P. 19.1-19.30, 2017.

SIEPMANN, J. Peppas, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Review**. Vol. 48, p. 139-157, 2001.

SILVA, M. A. **Avaliação do potencial inseticida de *Azadirachta indica* (Meliaceae) visando o controle de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae)**. Piracicaba. 2010. 159p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo, Brasil.

SINHA, V. R. et al. Poly-ε-Caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**. Vol. 278. P. 1-23, 2004.

SITTIPUMMONGKOL, K., Pechyen, C. Production, characterization and controlled release studies of biodegradable polymer microcapsules incorporating neem seed oil by spray drying. **Food Packaging and Shelf Life**. Vol. 18, p. 131-139, 2018.

SOTO, A. et al. Alternative Control of *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard (Acari: Tetranychidae) on Tomato Plants Grown in Greenhouses. **Neotropical Entomology**. Vol. 39, p. 638-744, 2010.

STANGARLIN, J. R. et al. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 2, n. 11, p. 19-21, 1999.

STUMPF, N.; NAUEN, R. Cross-resistance, inheritance, and biochemistry of mitochondrial electron transport inhibitor-acaricide resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). **Journal of Economic Entomology**. v.94, p.1577-1583, 2001.

SUNDARAM, K. M. S. et. al. Uptake, translocation, persistence and fate of azadirachtin in aspen plants (*Populus tremuloides* Michx.) and its effect on pestiferous two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). **Crop Protection**. Vol. 14, p. 415-421, 1995.

SUNDARAM, K. M. S., Sundaram A. Azadirachtin biopesticide: A review of studies conducted on its analytical chemistry, environmental behaviour and biological effects. **Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**. Vol. 31, n°. 4, p. 913-948, 1996.

TEWA-TAGNE, P. et al. Spray-drying Nanocapsules in Presence of Colloidal Silica as Drying Auxiliary Agent: Formulation and Process Variables Optimization Using Experimental Designs. **Pharmaceutical Research**. Vol. 24, p. 650-661, 2007.

THAKUR, B. K.; KUMAR, A.; KUMAR, D. Green synthesis of titanium dioxide nanoparticles using *Azadirachta indica* leaf extract and evaluation of their antibacterial activity. **South African Journal of Botany**. Vol. 124, p. 223-227, 2019.

TILMAN, D. et al. Agricultural sustainability and intensive production practices. **Nature**, v. 418, n. 6898, p. 671-677, 2002.

TRIERWEILER, L. F. **Nanopartículas: Como produzi-las em escala industrial.** Porto Alegre, 2009. 214p. Tese (DOutorado em Engenharia Química). Universidade do Rio Grande do Sul, Brasil.

US Environmental Protection Agency. What are Biopesticides? Disponível em <<https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/what-are-biopesticides>>. Acesso em: abril de 2017.

VERONEZ, B.; Sato, M. E.; Nicastro, R. L. Toxicidade de compostos sintéticos e naturais sobre o *Tetranychus urticae* e predador *Phytoseiulus macropilis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Vol. 47, p. 511-518, 2012.

XU J. et al. The preparation of neem oil microemulsion (*Azadirachta indica*) and the comparison of acaricidal time between neem oil microemulsion and other formulations in vitro. **Veterinary Parasitology**. Vol. 169, p. 399-403, 2010.

YAMASAKI, R. B. et al. Isolation and purification of Azadirachtin from Neem (*Azadirachta indica*) seeds using flash chromatography and High-performance Liquid Chromatography. **Journal Chromatography**. Vol. 356, p. 220-226, 1986.

YANG, S. et al. Thermal and mechanical properties of chemical crosslinked poly lactide (PLA). **Polymer Testing**. Vol. 27, p. 957-963, 2008.

ZANIN, S. et al. Determinação do Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL) de Óleos de Origem Vegetal. **Visão Acadêmica**. Vol. 3, p. 13-18, 2002.

ANEXOS

Anexo 1 (SisGen)



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A26AB90

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

Número do cadastro: **A26AB90**
 Usuário: **UBEA**
 CPF/CNPJ: **88.630.413/0001-09**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

Espécie

Macrophomina phaseolina
Fusarium oxysporum
Azadiractina indica
Fusarium sp

Título da Atividade: **Desenvolvimento de nanocapsulas de polímeros biodegradáveis contendo produtos a base de Nim para a aplicação como biopesticida**

Equipe

Marçal Jose Rodrigues Pires	UBEA
Simone Stülp	Universidade do Vale do Taquari – Univates
Martha Beatriz Horn	PUCRS/UBEA
Marlise Araujo dos Santos	PUCRS/UBEA

Parceiras Nacionais

04.008.342/0001-09 / FUNDAÇÃO VALE DO TAQUARI DE EDUCAÇÃO E DESENVOLVIMENTO SOCIAL - FUVATES

Resultados Obtidos**Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação**

Identificação do meio onde foi divulgado: **Horn; M.B.; Stülp, S.; Sandos, M. A.; Pires, M.J.**

Data do Cadastro: **22/10/2018 15:47:48**

Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **15:48** de **22/10/2018**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A959D66

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

Número do cadastro: **A959D66**
 Usuário: **Universidade do Vale do Taquari-Univates**
 CPF/CNPJ: **04.008.342/0001-09**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

Espécie

Tetranychus urticae

Título da Atividade: **Ação de nim sobre Tetranychus urticae**

Equipe

Noeli Juarez Ferla	Universidade do Vale do Taquari-Univates
Martha Beatriz Horn	Universidade do Vale do Taquari - Univates
Marçal José Rodrigues Pires	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Simone Stülp	Universidade do Vale do Taquari - Univates
Guilherme André Spohr	Universidade do Vale do Taquari

Parceiras Nacionais

88.630.413/0001-09 / Pontifícia Universidade Católica Do Rio Grande Do Sul - PUCRS

Data do Cadastro: **07/08/2019 14:10:54**

Situação do Cadastro: **Concluído**

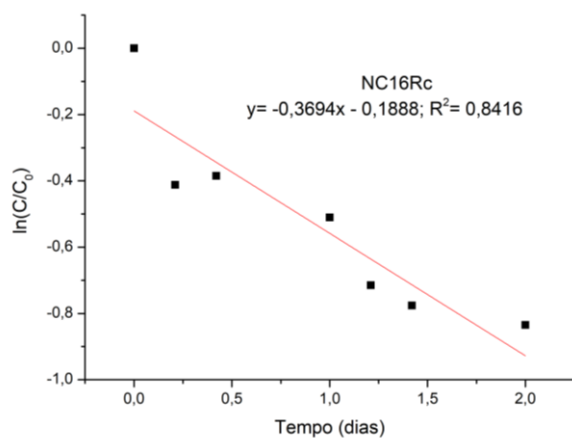
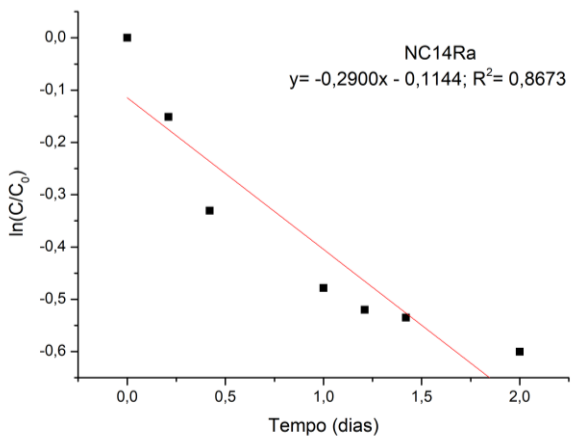
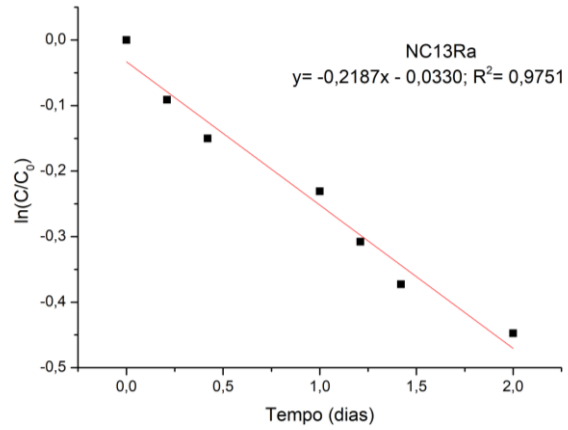
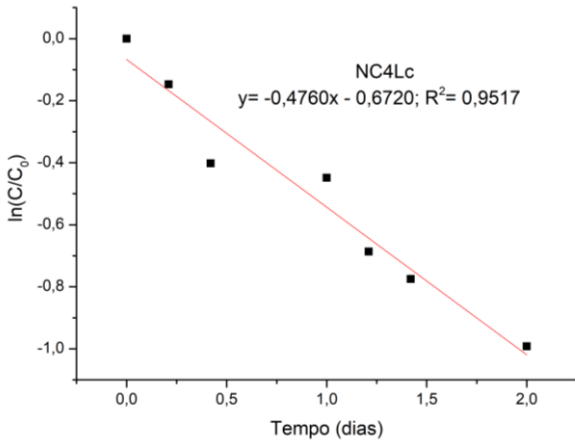
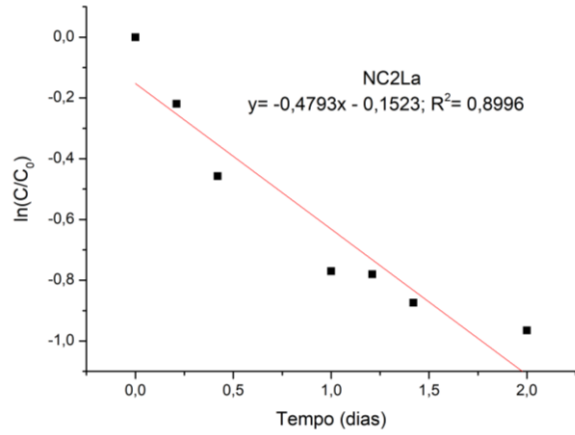
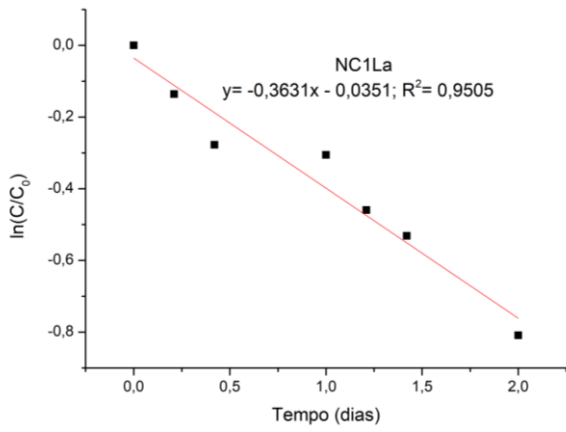


Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **14:43** de **15/08/2019**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**

Anexo 2 (Cinética de pseudo-primeira ordem, dados teste de termodegradação Azadiractina A).



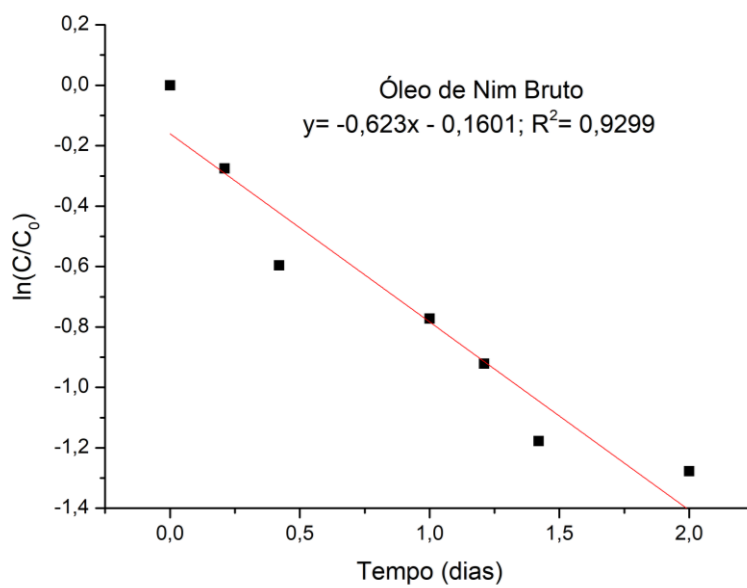
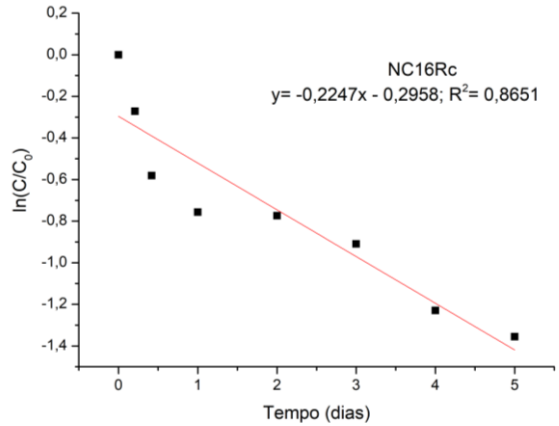
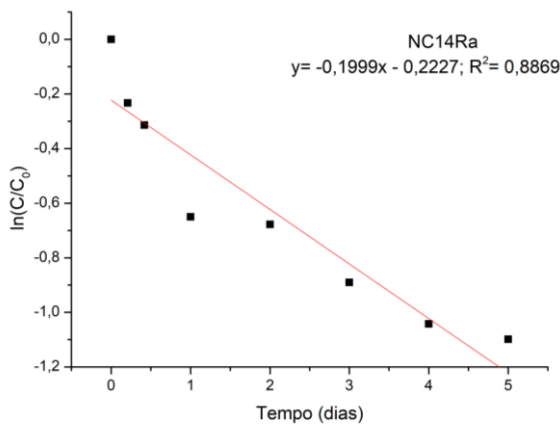
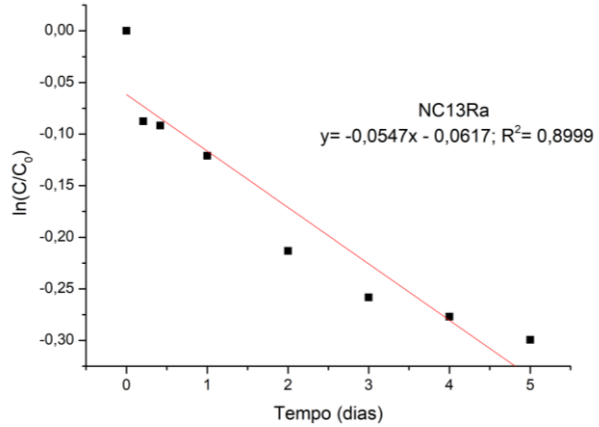
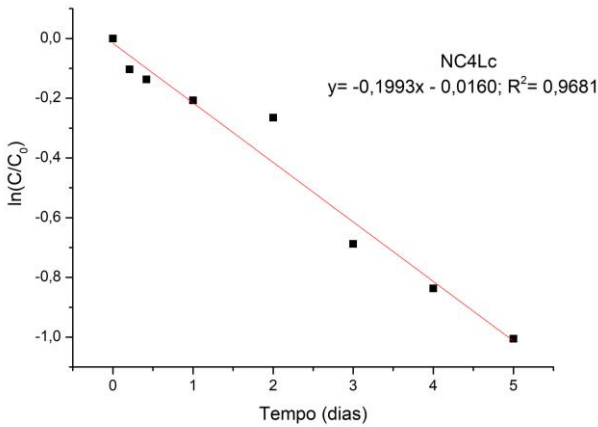
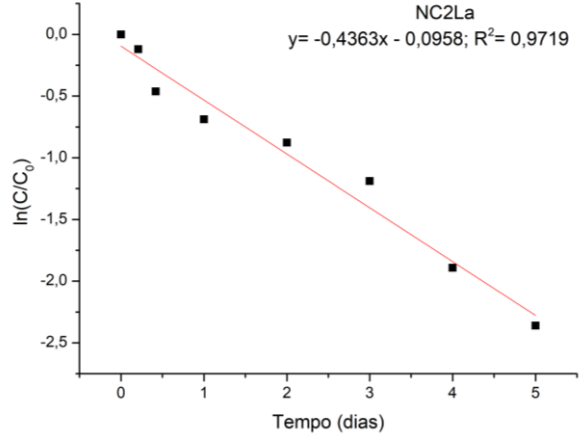
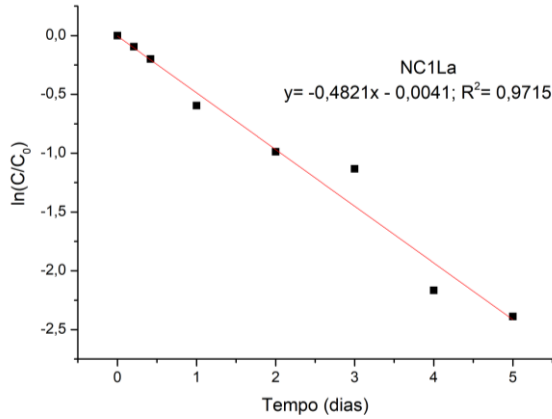


Figura 1. Ajustes cinéticos de pseudo-primeira ordem para $\ln(C/C_0)$ versus tempo de aquecimento, referente as nanoformulações nanoencapsuladas e ao óleo de Nim.

Anexo 3 (Cinética de pseudo-primeira ordem, dados teste de fotodegradação Azadiractina A, lâmpada UVC e lâmpada DULUX).

Lâmpada UVC:



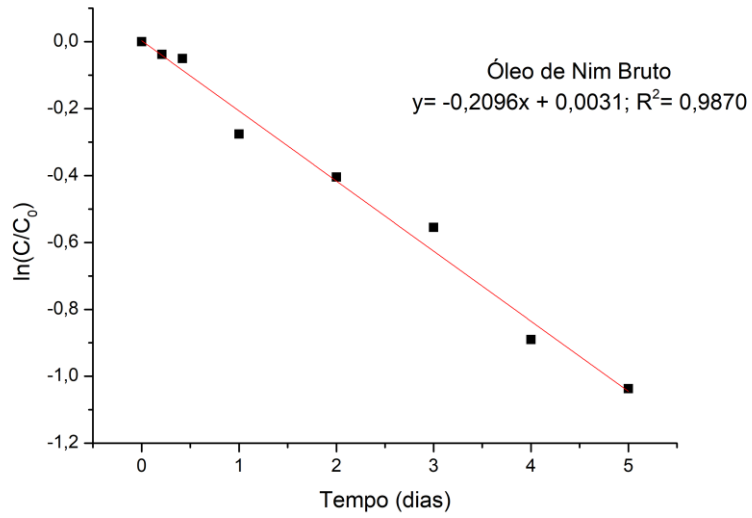
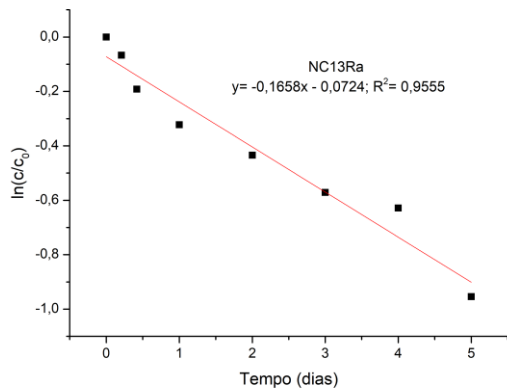
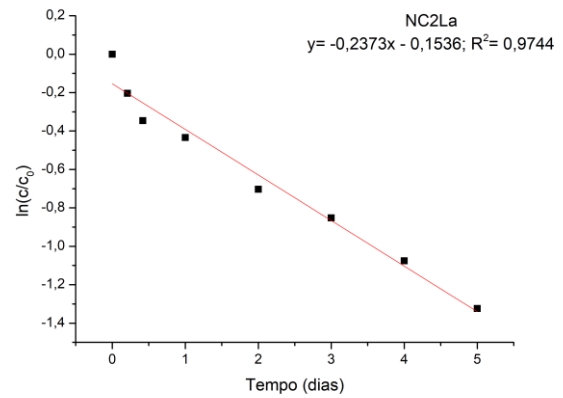
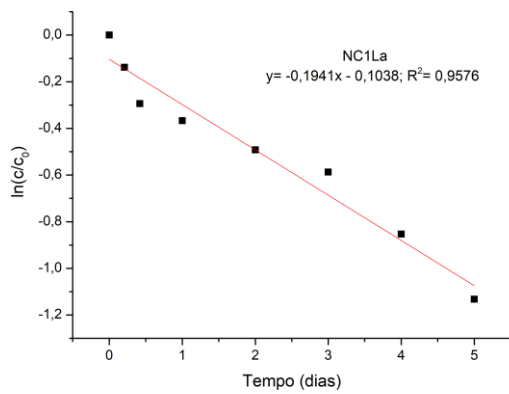


Figura 1. Ajustes cinéticos de pseudo-primeira ordem para $\ln(C/C_0)$ versus tempo de radiação UVC, referente as nanoformulações nanoencapsuladas e ao óleo de Nim.

Lâmpada DULUX:



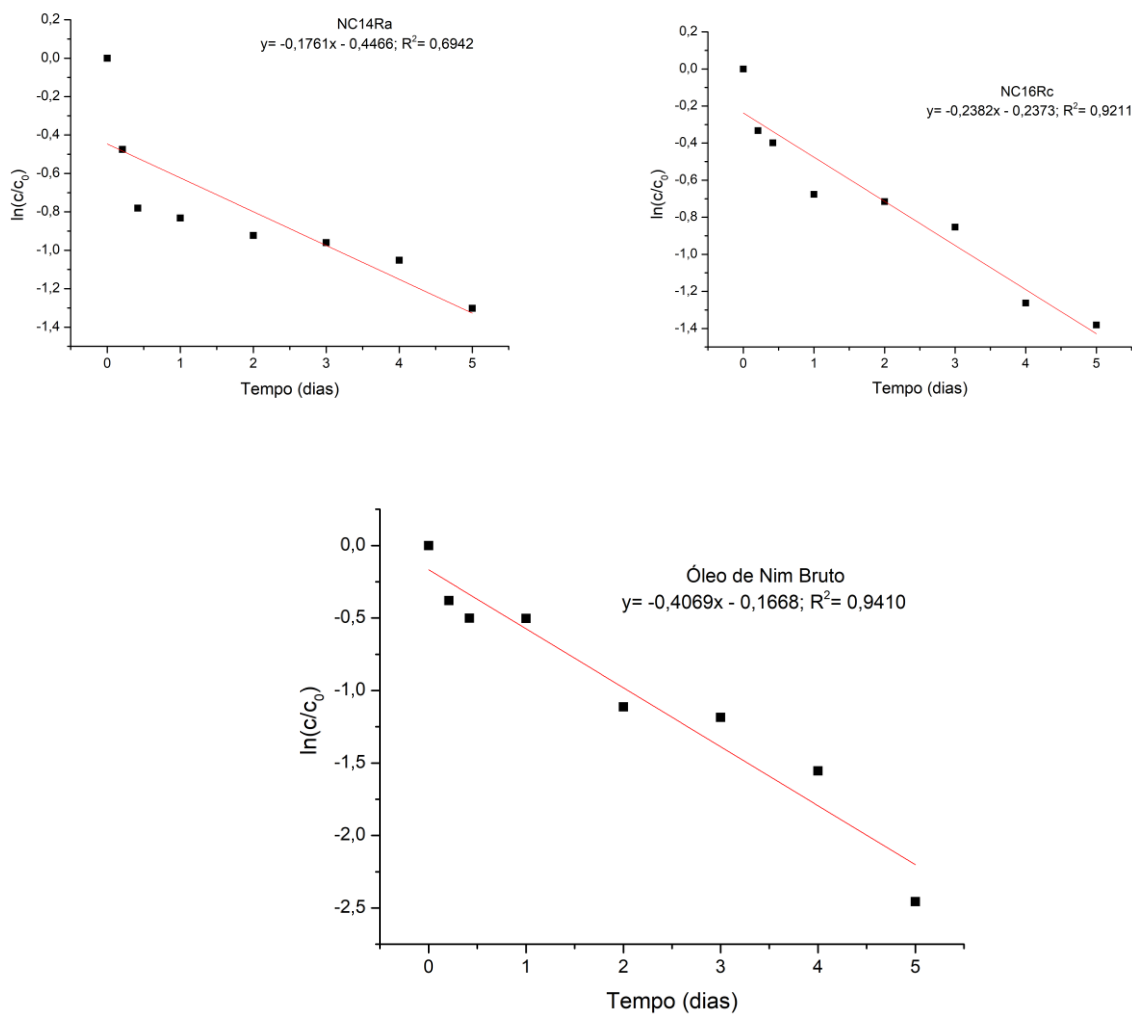


Figura 2. Ajustes cinéticos de pseudo-primeira ordem para $\ln(C/C_0)$ versus tempo de radiação UVA, referente as formulações nanoencapsuladas e ao óleo de Nim.