

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

JULIANA PELISOLI HOLZ

**MICROESFERAS DE PCL COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO  
CONTROLADA DE HERBICIDA GLIFOSATO**

Porto Alegre  
2017

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**MICROESFERAS DE PCL COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO  
CONTROLADA DE HERBICIDA GLIFOSATO**

**JULIANA PELISOLI HOLZ**

ENGENHEIRA QUÍMICA

MESTRE EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

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

**Porto Alegre**

**Outubro, 2017**



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

## **MICROESFERAS DE PCL COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE HERBICIDA GLIFOSATO**

**JULIANA PELISOLI HOLZ**

ENGENHEIRA QUÍMICA

MESTRE EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

ORIENTADOR: PROF(a). DR(a). ROSANE ANGÉLICA LIGABUE

CO-ORIENTADOR: Prof(a). Dr(a). SANDRA MARA OLIVEIRA EINLOFT

Tese realizada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

**Porto Alegre**

**Outubro, 2017**

## Ficha Catalográfica

H762m Holz, Juliana Pelisoli

Microesferas de PCL como Sistema de Liberação Controlada de  
Herbicida Glifosato / Juliana Pelisoli Holz . – 2017.

115.

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

Orientadora: Profa. Dra. Rosane Angélica Ligabue.

Co-orientadora: Profa. Dra. Sandra Mara Oliveira Einloft.

1. Bioensaio. 2. Cinética de Liberação. 3. Glifosato. 4.  
Microesferas. 5. PCL. I. Ligabue, Rosane Angélica. II. Einloft,  
Sandra Mara Oliveira.

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



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

## MICROESFERAS DE PCL COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE HERBICIDA GLIFOSATO

**CANDIDATA: JULIANA PELISOLI HOLZ**

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.

**DRA. ROSANE ANGÉLICA LIGABUE - ORIENTADORA**

**DRA. SANDRA MARA OLIVEIRA EINLOFT - CO-ORIENTADORA**

### BANCA EXAMINADORA

**DRA. VANUSCA DALOSTO JAHNO - DO PÓS GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE  
MATERIAIS - UNIVERSIDADE FEEVALE**

**DR. VINÍCIUS DEMÉTRIO DA SILVA - DO INSTITUTO DE QUÍMICA - UFRGS**

**DR. MARCUS SEFERIN - DO PGETEMA/FENG - PUCRS**

**PUCRS**

Campus Central

Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 30 - Sala 103 - CEP: 90619-900

Telefone: (51) 3353.4059 - Fax: (51) 3320.3625

E-mail: [engenharia.pg.materiais@pucrs.br](mailto:engenharia.pg.materiais@pucrs.br)

[www.pucrs.br/feng](http://www.pucrs.br/feng)

*“Se eu vi mais longe, foi por  
estar sobre ombros de  
gigantes”.*

*(Isaac Newton)*

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais, Norberto e Isabel, ao meu irmão, Marcelo e ao meu Marido Marcelo, que vêm me ajudando na conquista da realização de meus sonhos, com apoio, incentivo, atenção, compreensão e, sobretudo, pelo amor e carinho que me dedicam estando sempre presentes em minha vida. E aos familiares e amigos que sempre estiveram ao meu lado.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço em especial a minha orientadora Dr<sup>a</sup> Rosane Ligabue pelo incentivo, conhecimento, e oportunidade que me foram oferecidos, no mais, gostaria de agradecê-la de coração pelo convívio, pelas discussões, pelos momentos descontraídos que tivemos ao longo da nossa caminhada e fazer com que saiba que foi um prazer e uma honra ser sua aluna.

Ainda agradeço a professora Dr<sup>a</sup> Sandra Einloft pelo apoio e co-orientação, aos professores Vanusca Dalosto Jahno, Marcus Seferin e Vinícius Demétrio, pela participação nesta banca.

Aos professores Carlos, Morisso, Vanusca e Viviane do Laboratório de Materiais da Universidade Feevale pela colaboração durante a realização do trabalho. Ao incentivo do Diretor da Faculdade Dom Bosco de Porto Alegre Padre Marcos Sandrini e a Coordenadora do curso de Engenharia Ambiental e Sanitária Luciane Salvi para realização deste trabalho.

Aos professores e aos funcionários das Faculdades de Engenharia e de Química da PUCRS pelo conhecimento adquirido e auxílio na realização desse trabalho. Aos professores do Programa de Pós-Graduação pelos novos conhecimentos adquiridos durante a realização desse doutorado. A CAPES pela bolsa concedida. Aos funcionários e colegas do PGTEMA.

A professora Jeane, e amigos do LOR pelos ensinamentos e coleguismo. Em especial agradeço a Cristiane, Emanuelli, a Fabiana, a Gabriela, ao Leonardo, ao Marcelo, ao Mauricio, ao Vinicius e ao Wesley pela amizade e ajuda em todas as horas. A professora Deborah Dick e a Janaina do laboratório de físico-química da UFRGS, e ao professor Rogério Lourega do IPR/PUCRS. E a todos que de alguma forma contribuíram para construção desse trabalho.

As empresas que doaram os materiais utilizados nesta pesquisa: Monsanto do Brasil LTDA (Roundup WG, glifosato granulado 72% de pureza), FAD sementes

(sementes de arroz convencional (IRGA 424) e geneticamente modificada (GURI INTA CL) e a Fundação IRGA (Instituto Rio Grandense do Arroz) (Papel Germitest, substrato utilizado no bioensaio de germinação de sementes de arroz).

O presente trabalho foi alcançado em cooperação com a Hewlett-Packard Brasil Ltda. e com recursos provenientes da Lei de Informática (Lei nº 8.248, de 1991).

Muito obrigada a todos!

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA</b> .....	<b>6</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>7</b>
<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>9</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>11</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>13</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	<b>14</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>16</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>17</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
2.1. Objetivos Específicos .....	20
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>21</b>
3.1. Herbicidas .....	21
3.1.1. Glifosato.....	24
3.2. Liberação controlada de herbicidas .....	27
3.2.1. Micropartículas.....	29
3.2.2. Métodos de nano e microencapsulação .....	31
3.2.3. Poli( $\epsilon$ -caprolactona) .....	33
3.3. Avaliação da eficiência de incorporação .....	35
3.4. Avaliação da liberação do agente ativo (cinética de liberação) .....	37
3.5. Bioensaios com sementes .....	42
3.5.1. Arroz .....	47
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>51</b>
4.1. Materiais.....	51
4.2. Testes Preliminares para Preparação das Microesferas .....	52
4.3. Síntese das Microesferas de PCL com Glifosato .....	52
4.4. Técnicas de Caracterização .....	54
4.4.1. Espectroscopia Vibracional no Infravermelho (FTIR) .....	54

4.4.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	54
4.4.3. Difração de Raios-X (DRX).....	55
4.4.4. Análise Termogravimétrica (TGA).....	55
4.4.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	55
4.4.6. Determinação Espectrofotométrica do Glifosato .....	56
4.4.7. Análise Elementar.....	60
<b>4.5. Cinética de Liberação de Glifosato em Meio aquoso .....</b>	<b>60</b>
<b>4.6. Eficiência Agronômica.....</b>	<b>61</b>
<b>4.7. Tratamento Estatístico.....</b>	<b>67</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>70</b>
<b>5.1. Testes Preliminares para Preparação das Microesferas .....</b>	<b>70</b>
<b>5.2. Morfologia e tamanho de partícula das microesferas PCL/glifosato .....</b>	<b>71</b>
<b>5.3. Estrutura química das microesferas PCL/glifosato .....</b>	<b>74</b>
<b>5.4. Eficiência de Incorporação do Glifosato nas Microesferas .....</b>	<b>76</b>
5.4.1. Determinação espectrofotométrica do glifosato e avaliação da eficiência de incorporação .....	77
5.4.2. Análises termogravimétrica e elementar das microesferas e avaliação da eficiência de incorporação.....	79
<b>5.5. Propriedades Térmicas das Microesferas de PCL/Glifosato .....</b>	<b>81</b>
<b>5.6. Cinética de liberação do glifosato das microesferas em meio aquoso .....</b>	<b>84</b>
<b>5.7. Eficiência agronômica das microesferas em semestres de arroz.....</b>	<b>88</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>94</b>
<b>7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>96</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>97</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>109</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>111</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Estrutura química do Glifosato. ....	24
Figura 3.2. Representação esquemática de um sistema convencional para aplicação de herbicidas e representação de um sistema de liberação controlada.	28
Figura 3.3. Representação esquemática em 3 D: a) microcápsulas e b) microesferas.....	30
Figura 3.4. Cadeia Principal da Poli( $\epsilon$ -caprolactona). ....	34
Figura 3.5. As curvas de perda de massa de partículas compósitos (a) e polímero puro (b).....	37
Figura 3.6. Liberação cumulativa da BZC (%) em solução e em suspensão de nanocápsulas de PLA .....	39
Figura 3.7. Gráfico de $\ln M_t / M^\infty$ em função do $\ln t$ , de acordo com o modelo de Korsmeyer-Peppas.....	40
Figura 3.9. Plântulas de soja, cultivar OC 14 (não GM), comparadas à cultivar CD 213 RR (GM) na presença do herbicida glifosato. ....	45
Figura 3.10. Plântula normal formada a partir da germinação da semente de arroz.	48
Figura 4.1. Reação de ninidrina com glifosato na presença de molibdato de sódio.	56
Figura 4.2. Curva de calibração da absorvância em função da concentração de glifosato, obtido pelo método da ninidrina, determinado por análise espectrofométrica em 570 nm. Regressão linear obtida a partir de diferentes concentrações do herbicida (n=4). ....	58
Figura 4.3. Amostras com diferentes concentrações do herbicida para construção de curva analítica. ....	58
Figura 4.4. Fluxograma das etapas do Bioensaio. ....	63
Figura 4.5. Procedimento experimental de germinação de sementes de arroz. a) preparo do substrato umedecido; b) contagem das sementes; c) distribuição das sementes; d) preparo dos rolos de germinação; e) identificação dos rolos; f) estufa improvisada; g) rolos após 14 dias de bioensaio; h) análise das plântulas obtidas.....	64

Figura 4.6. Verificação do tamanho das estruturas essenciais a uma plântula normal (raiz principal, raízes seminais e caule) com régua milimetrada. ....	65
Figura 4.7. Fluxograma do processo por emulsão múltipla e evaporação do solvente para obtenção das microesferas de PCL/Glifosato, caracterizações, análises e ensaios realizados. ....	69
Figure 5.1. Micrografias das Microesferas com aumento de 4000X: a) durante a segunda emulsificação adicionou-se a fase aquosa na emulsão primária; b) quantidade de surfactante maior que a necessária; c) evaporação do solvente com bomba de vácuo; d) menor velocidade de agitação na segunda emulsificação.....	71
Figura 5.2. Micrografias das Microesferas com aumento de 4000X: a) ME; b) ME1; c) ME2 e d) ME3. ....	72
Figura 5.3. Espectros de FTIR das microesferas de PCL puro (ME), das microesferas de PCL/Glifosato (ME3) e do Glifosato puro no modo transmissão.....	74
Figura 5.4. Termogramas do PCL puro e das ME3. ....	81
Figura 5.5. DRX do PCL puro e das ME2. ....	84
Figura 5.6. Liberação cumulativa de glifosato das microesferas de PCL (n=3). ....	85
Figura 5.7. Gráfico de $\ln M_t/M_{inf}$ em função de $\ln t$ (Modelo de Korsmeyer-Peppas).87	87

## LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Reagentes e solventes utilizados na preparação das microesferas .....	51
Tabela 4.2. Características óticas do glifosato na presença de ninidrina como reagente cromogênico e molibdato de sódio como catalisador .....	60
Tabela 5.1. Tamanho de partícula das microesferas obtidas .....	72
Tabela 5.2. Principais bandas do PCL puro e das microesferas de PCL com Glifosato incorporado. ....	75
Tabela 5.3. Determinação da eficiência de incorporação pelo método da ninidrina.	77
Tabela 5.4. Propriedades térmicas e grau de cristalinidade .....	83
Tabela 5.5. Características de uma plântula normal para as cultivares IRGA e GURI90	

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALS	Acetolacto Sintetase
A/O	água/óleo
A/O/A	água/óleo/água
BZC	Benzocaína
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de Cálcio
CHN	Análise Elementar
CL	Clearfield
CV	Coefficiente de Variação
DP	Desvio Padrão
DRX	Difração de Raios-X
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial (do inglês, <i>Diferencial Scanning Calorimetry</i> )
EI	Eficiência de Incorporação
EPSPs	5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase
FDA	do inglês, Food and Drug Administration of USA
FTIR	Espectroscopia Vibracional no Infravermelho com Transformada de Fourier (do inglês, <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> )
GM	Geneticamente Modificadas
IAA	Ácido indolilacético
IV	Infravermelho
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
PCL	Poli ( $\epsilon$ -caprolactona)
PGA	Poli (ácido glicólico)
PHBV	Poli (hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)
PLA	Poli (ácido láctico)
PLGA	Poli (ácido láctico-co-glicólico)
RAS	Regras para Análises de Sementes
T <sub>c</sub>	Temperatura de Cristalização (°C)
T <sub>m</sub>	Temperatura de Fusão (°C) (do inglês, <i>Melting Temperature</i> )
T <sub>g</sub>	Temperatura de Transição Vítreia (°C) (do inglês, <i>Glass Transition Temperature</i> )

TGA	Análise Termogravimétrica (do inglês, <i>Thermogravimetric Analysis</i> )
UATR	Refletância Total Atenuada Universal (do inglês, <i>Universal Attenuated Total Reflectance</i> )
UV-vis	Espectroscopia na região do Ultravioleta e Visível
$X_c$	Grau de Cristalinidade
$\Delta H_m$	Entalpia de Fusão
v/v	Fração em volume
ZnO	Oxido de Zinco

## RESUMO

HOLZ, Juliana Pelisoli. **Microesferas de PCL como Sistema de Liberação Controlada de Herbicida Glifosato**. Porto Alegre. 2017. Tese. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

O glifosato é o herbicida mais utilizado no mundo, devido ao seu amplo espectro de ação. Porém existe a necessidade de medidas de redução na sua aplicação, devido aos riscos associados à contaminação da água e do meio ambiente. O desenvolvimento de sistemas de liberação controlada surge como uma alternativa para minimizar a aplicação deste herbicida. Este trabalho teve como objetivo a preparação de microesferas de Poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) contendo glifosato. Estas foram caracterizadas quanto a sua morfologia, estrutura, propriedades físico-químicas, e ainda, realizou-se um bioensaio para a avaliação do seu uso na cultura do arroz, a fim de criar uma possível alternativa para o uso destes herbicidas em plantações. As microesferas de PCL/glifosato produzidas através da técnica de emulsão múltipla e evaporação do solvente apresentaram a forma de esferas sólidas com tamanhos médios de  $3 \mu\text{m} \pm 0,6 \mu\text{m}$ . Foi possível incorporar 9,3% de glifosato em relação à massa de polímero nas partículas formadas, revelando uma eficiência de incorporação (EI) de 30,9%. A partir das técnicas utilizadas para quantificação do glifosato incorporado (UVvis, TGA e CHN), pode-se afirmar que com o aumento da concentração de glifosato na formulação existe um aumento de sua EI. Por outro lado este aumento acarreta na diminuição no tamanho médio das microesferas. A liberação do herbicida das microesferas foi evidenciada através de bioensaios, e na avaliação do perfil de liberação do glifosato das microesferas, pode-se constatar que aproximadamente 17% do herbicida foi liberado para o meio, solução de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M em temperatura ambiente, após transcorridos 360 minutos de ensaio. Este estudo permitiu afirmar que o modelo teórico descrito por Korsmeyer-Peppas é adequado para caracterizar o fenômeno de transporte de liberação do glifosato das microesferas, revelando um transporte anômalo não governado pela difusão de Fick.

Palavras-Chaves: Bioensaio, Cinética de liberação, Glifosato, Microesferas, PCL.

## ABSTRACT

HOLZ, Juliana Pelisoli. **PCL Microspheres as Controlled Release System of Glyphosate Herbicide**. Porto Alegre. 2017. PhD Thesis. Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

Glyphosate is the most widely used herbicide in the world, due to its broad spectrum of action. But there is a need for reduction measures in its application, due to the risks associated with contamination of water and the environment. The development of controlled release systems appears as an alternative to minimize the application of this herbicide. This work aimed at the preparation of glyphosate-containing Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) microspheres. These were characterized as to their morphology, structure, physicochemical properties, and a bioassay was carried out to evaluate their use in rice cultivation, in order to create a possible alternative for the use of these herbicides in plantations. The PCL / glyphosate microspheres produced by the multiple emulsion technique and solvent evaporation were in the form of solid beads with mean sizes of  $3 \mu\text{m} \pm 0.6 \mu\text{m}$ . It was possible to incorporate 9.3% glyphosate in relation to the polymer mass in the formed particles, revealing an efficiency of incorporation IE of 30.9%. From the techniques used to quantify the incorporated glyphosate (UVvis, TGA and CHN), it can be stated that with the increase of glyphosate concentration in the formulation there is an increase in its IE. On the other hand, this increase leads to a decrease in the average size of the microspheres. The release of the herbicide from the microspheres was evidenced by bioassays, and in the assessment of the glyphosate release profile of the microspheres, it can be seen that approximately 17% of the herbicide was released into the medium, 0.01 M  $\text{CaCl}_2$  solution at room temperature, after 360 minutes of testing. This study allowed to affirm that the theoretical model described by Korsmeyer-Peppas is adequate to characterize the phenomenon of transport of glyphosate release from the microspheres, revealing an anomalous transport not governed by Fick diffusion.

Key-words: Bioassay, Release kinetics, Glyphosate, Microspheres, PCL.

## 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento em ritmo acelerado da agricultura tem aumentado a necessidade do uso de agrotóxicos. Nas últimas décadas, várias alternativas foram criadas no sentido de reduzir esta necessidade, uma vez que existem evidências de que muitos estão causando a resistência de algumas espécies de ervas daninhas, que se adaptam após o uso excessivo e prolongado destes herbicidas (Amarante Jr et al., 2002a; Moraes, Rossi, 2010).

O glifosato N-(fosfonometil)glicina,  $C_3H_8NO_5P$ , é o princípio ativo do herbicida comercializado, desde 1974, como Roundup®. Este herbicida, passou a ser o mais vendido no mundo a partir de 2003 (Machado, 2016). Este é o dado oficial mais específico sobre o glifosato, apresentado no relatório estatístico da União Europeia, que apresenta o glifosato como o herbicida mais consumido, porém não divulga quantidades, pois considera as informações como confidenciais. É o mais utilizado e estudado no mundo, devido principalmente ao seu amplo espectro de ação e pelo fato de apresentar elevada eficácia no controle de ervas daninhas. De acordo com sua classificação toxicológica o herbicida é citado como pouco tóxico, já em relação ao potencial de periculosidade ambiental, é considerado um produto perigoso, devido aos riscos associados à contaminação da água e do meio ambiente (Amarante Jr et al., 2002a; Silva et al., 2011). Dessa forma, existe a necessidade de medidas de redução na aplicação do glifosato, e o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada surgem como uma alternativa que podem ser implementadas na agricultura (Grillo et al., 2012; Grillo, Rosa, Fraceto, 2013; Souza et al., 2012).

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

campo nunca encontram seu objetivo principal, que é justamente, produzir a resposta biológica desejada no momento exato e nas quantidades específicas requeridas. Estes problemas ocorrem devido à baixa especificidade destes compostos com a planta e também pela baixa estabilidade química destas moléculas. Nos últimos anos, a tecnologia de liberação controlada emergiu como uma importante alternativa aos problemas que acompanham a eficiência, a minimização de impactos ambientais e a garantia do desenvolvimento sustentável (Grillo, 2011; Grillo et al., 2012; Grillo, Rosa, Fraceto, 2013; Jiang et al., 2012; Liu et al., 2012; Faria, 2016).

Neste trabalho, utilizou-se essa tecnologia de sistemas de liberação controlada, através da preparação de microesferas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) contendo glifosato utilizando a técnica de emulsão/evaporação do solvente. No caso de herbicidas estes sistemas podem ser responsáveis pela redução na quantidade de princípio química necessária para o controle de pragas, diminuição no risco de poluição ambiental e redução na quantidade de energia empregada. Uma vez que se reduz o número de aplicações necessárias comparadas às formulações convencionais e aumento na segurança das pessoas responsáveis pela aplicação do produto no campo (Grillo et al., 2012; Grillo, Rosa, Fraceto, 2013). A matriz que carrega glifosato é degradada com o tempo por ser constituída de um polímero biodegradável, liberando assim o herbicida aos poucos, sendo mais eficiente e menos tóxica, uma vez que podemos usar uma quantidade menor para conseguir o mesmo efeito, pois o herbicida ficará protegido de intempéries (Souza et al., 2012). Dentro deste contexto, o presente estudo teve como objetivo a preparação de microesferas de PCL contendo glifosato e sua caracterização quanto as suas características morfológicas, estruturais e físico-químicas. Também foi avaliada a eficiência de incorporação do glifosato, a cinética de liberação do herbicida, e ainda, quanto a eficiência agrônômica através de bioensaio de germinação de sementes de arroz.

O ineditismo da tese destaca-se pela incorporação do glifosato em matriz de policaprolactona e seu estudo de liberação controlada na cultura do arroz, a fim de criar uma possível alternativa para o uso deste herbicida em plantações variadas, de forma a minimizar os impactos ambientais e os riscos para a saúde humana.

## **2. OBJETIVOS**

Este trabalho tem como objetivo geral desenvolver sistemas de liberação controlada para o herbicida glifosato, através da preparação de microesferas de Poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) com glifosato, e a avaliação do seu uso no cultivo do arroz.

### **2.1. Objetivos Específicos**

Os objetivos específicos deste trabalho são descritos a seguir:

- Preparar microesferas de PCL com diferentes quantidades de glifosato;
- Avaliar as características morfológica, estrutural e as propriedades físico-químicas das microesferas produzidas;
- Avaliar diferentes técnicas analíticas de quantificação do herbicida glifosato;
- Avaliar a cinética de liberação do herbicida;
- Propor um mecanismo de liberação para o herbicida incorporado nas microesferas de PCL;
- Avaliar o efeito das microesferas de PCL/glifosato em um bioensaio de germinação de sementes de arroz.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta revisão trata sobre o estado da arte de partículas poliméricas usadas para incorporar herbicidas, bem como, do herbicida em estudo, quanto suas propriedades e aplicações.

#### 3.1. Herbicidas

Os termos “agroquímico” e “agrotóxico”, assim como outros termos referentes aos produtos químicos utilizados nos cultivos agrícolas com a finalidade de eliminar as consideradas “pragas” ou “ervas daninhas” estão, respectivamente, ligados a posições valorativas diferentes com relação ao apoio ou não de sua utilização. A indústria química prefere o termo “agroquímico” ou “defensivo agrícola”, ou “produto fitossanitário”, termos que dão uma conotação positiva aos produtos. Grupos ligados aos movimentos ambientalistas preferem o termo “agrotóxico” ou “veneno”, que são termos que dão uma conotação negativa destes mesmos produtos. Internacionalmente o termo mais utilizado é *pesticide* (pesticida, em português), porém no Brasil “pesticida” refere-se mais adequadamente ao produto que combate os insetos na agricultura. Portanto, em função da lei brasileira que trata das regras nacionais para utilização de produtos químicos na produção rural, Lei 7.802/1989 (BRASIL, 1989), se referir ao produto como “agrotóxico”, este termo será utilizado nesta tese quando tratarmos de forma geral sobre o conjunto das substâncias utilizadas para combater as “pragas” e “ervas daninhas” na agricultura. O termo herbicida será também utilizado quando nos referirmos aos produtos utilizados especificamente para o combate a plantas “indesejadas” nos cultivos agrícolas.

O mercado brasileiro de agrotóxicos expandiu rapidamente na última década (190%), num ritmo de crescimento maior que o dobro do apresentado pelo mercado global (93%), o que coloca o Brasil em primeiro lugar no ranking mundial, desde 2008. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), na safra 2010/2011, o consumo foi de 936 mil toneladas, movimentando US\$ 8,5 bilhões entre dez empresas que controlam 75% deste mercado no país. A liberação do cultivo a partir de sementes transgênicas e sua difusão nas áreas agricultáveis estão associadas ao aumento do consumo, tendo em vista o uso intenso de herbicidas, responsáveis por 45% do volume consumido, seguidos pelos fungicidas (14%) e inseticidas (12%) (Rigotto, Vasconcelos, Rocha, 2014).

Seguindo as previsões divulgadas em dezembro de 2014, os dados do SINDIVEG (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal) confirmam uma queda nas vendas de defensivos agrícolas no ano de 2015. O balanço oficial de 2015 do setor registrou redução de 21,56% em relação a 2014, totalizando US\$ 9,6 bilhões. A queda do setor no Brasil contribuiu muito para a redução do mercado global, que registrou queda de 9,8%, totalizando US\$ 54,6 bilhões. É o primeiro ano em que o mercado global cai nesta década e põe fim a um período de crescimento de cinco anos (SINDIVEG, 2016). Em 2016, o setor de defensivos agrícolas apresentou recuo de 1% nas vendas, atingindo US\$ 9,56 bilhões, contra US\$ 9,6 bilhões em 2015 (SINDIVEG, 2017).

É difícil encontrar dados confiáveis sobre o consumo de agrotóxicos, mais especificamente de glifosato, no Brasil. Os dados passaram a ser compilados por órgãos públicos na sua grande maioria a partir de 2005. O SINDIVEG, que representa as indústrias produtoras de agrotóxicos, não fornece dados de produtos específicos (Machado, 2016).

Os herbicidas são substâncias químicas utilizadas na agricultura para o controle de ervas classificadas como daninhas e possui como vantagem a rapidez de ação, custo reduzido, efeito residual e não revolvimento do solo. A presença de ervas daninhas no cultivo pode causar diversos problemas para a produção agrícola, como por exemplo, impedir ou alterar a disponibilidade de nutriente, água e luz das plantas cultivadas, liberar substâncias através das raízes e folhas, que são tóxicas para as culturas. Uma vez que inibem ou dificultam a germinação, crescimento ou desenvolvimento das plantas nas proximidades, criar um habitat favorável para a proliferação de outras pragas, agindo como um hospedeiro, impedir o processo normal de colheita podendo contaminar a produção obtida. E ainda, dados estatísticos mostram que cerca de 20-30% do custo de produção de uma lavoura se deve aos gastos no controle das plantas daninhas. Com isso, as perdas agrícolas podem ter um profundo efeito sobre a economia mundial em termos de redução da produtividade, elevação do custo de produção e a baixa qualidade, justificando assim a necessidade do uso, ainda que, controlado destes produtos (Grillo, 2011; Grillo et al., 2012; Grillo, Rosa, Fraceto, 2013).

Os herbicidas podem ser aplicados ao solo em três momentos distintos, antes do plantio da cultura (pré-plantio), antes da emergência (pré-emergência) e após a emergência (pós-emergência) e podem ser classificados quanto: ao seu mecanismo de ação (inibidores da fotossíntese, inibidores da divisão celular, inibidores de lipídeos, inibidores de carotenóides, etc.), quanto a sua estrutura química (triazínicos, piridínicos, amônio quaternário, tiocarbamatos, etc.), seletividade, entre outros. Os herbicidas seletivos são utilizados para matar apenas ervas daninhas, sem prejudicar a cultura de um modo geral, já os herbicidas não seletivos têm o propósito de matar toda a vegetação, deixando assim, o campo pronto para um novo plantio. Embora existam diversas classificações nenhuma delas é completamente adequada, porém é necessário diferenciá-los com o objetivo de minimizar custos no plantio, prevenir o aparecimento de plantas daninhas

resistentes aos herbicidas e a preocupação quanto ao destino destas moléculas no solo e no ambiente. (Grillo, 2011; Grillo et al., 2012; Grillo, Rosa, Fraceto, 2013).

Dentre as classes de herbicidas utilizados na agricultura, os triazínicos são os responsáveis por 30% da produção mundial e conseqüentemente são um dos compostos mais encontrados nas águas superficiais e subterrâneas, sendo alvo de vários estudos (Grillo, 2011; Grillo et al., 2012; Grillo, Rosa, Fraceto, 2013). Tendo em vista a importância do tema relacionado ao cultivo de espécies resistentes ao glifosato (Oliveira Jr et al., 2011; Liu et al., 2012), surgem novos estudos voltados para este herbicida.

### 3.1.1. Glifosato

O ROUNDUP WG granulado dispersível, com 72% do equivalente ácido de N-(fosfometil)glicina (Glifosato),  $C_3H_8NO_5P$ , comercializado pela empresa Monsanto do Brasil LTDA, é um herbicida não seletivo de ação sistêmica do grupo químico glicina substituída, cuja estrutura é mostrada na Figura 3.1. Devido à limitada solubilidade do ácido na água (12.000 ppm a 25 °C), os sais mais solúveis do ácido são preferidos para as formulações. O termo glifosato é geralmente utilizado para indicar tanto o ácido como seus sais, pois é reconhecido que eles são biologicamente equivalentes (Yamada, Castro, 2007).

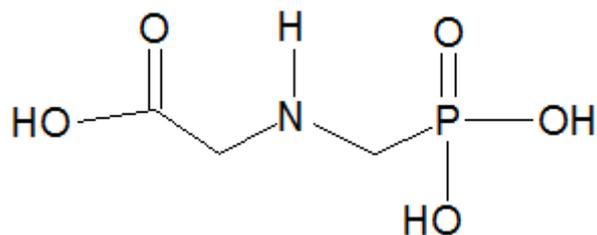


Figura 3.1. Estrutura química do Glifosato.

Fonte: do Autor, 2017.

Segundo a ficha técnica do ROUNDUP WG é recomendado para dessecação e controle em pós-emergência de plantas infestantes nas seguintes culturas: algodão, ameixa, arroz, banana, cacau, café, cana-de-açúcar, citros, maçã, milho, nectarina, pastagens, pêra, pêssego, soja, trigo e uva. E ainda, para aplicação em área total em pré-plantio<sup>1</sup>, sistema de plantio direto para as culturas de algodão, arroz, cana-de-açúcar, milho, pastagens, soja e trigo e, em área de pousio<sup>2</sup> antecedendo o plantio de algodão, arroz, cana-de-açúcar, milho, pastagens, soja e trigo. Sendo que, o herbicida é seletivo somente quando aplicado sobre as variedades geneticamente modificadas, tolerante ao glifosato (ROUNDUP WG, 2014).

O intervalo de segurança para a cultura da soja não é determinado quando o agrotóxico for aplicado em pós-emergência das plantas infestantes e pré-emergência da cultura. O intervalo de segurança para a cultura da soja geneticamente modificada, que expressa resistência ao glifosato é de 56 dias, quando o agrotóxico for aplicado em pós-emergência das plantas infestantes e da cultura. No caso da cultura de arroz o intervalo de segurança não é determinado devido à modalidade de emprego (ROUNDUP WG, 2014).

O glifosato atua em pós-emergência, considerado sem atividade em pré-emergência devido à intensa sorção ao solo. Uma vez que é fortemente sorvido, torna-se não disponível para absorção pelas plantas, sendo a degradação microbiana a principal rota de decomposição do glifosato no solo (Oliveira Jr et al., 2011). É considerado um potente herbicida sistêmico, não seletivo em função do

---

<sup>1</sup> pré-plantio da cultura e pós-emergência das plantas infestantes (ROUNDUP WG, 2014).

<sup>2</sup> nome que se dá ao descanso ou repouso proporcionado às terras cultiváveis (ROUNDUP WG, 2014).

amplo espectro (Jiang et al., 2012; Liu et al., 2012; Oliveira Jr et al., 2011), capaz de controlar efetivamente 76 das 78 plantas invasoras mais agressivas (Yamada, Castro, 2007), através da inibição da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs), embora atualmente possa ser considerado seletivo para as culturas geneticamente modificadas (GM) (Oliveira Jr et al., 2011).

Com o advento das plantas transgênicas, o glifosato passou a ser uma opção para o controle seletivo de plantas daninhas para espécies geneticamente modificadas para tolerância ao glifosato, primeiramente com a soja *Roundup Ready*, posteriormente as culturas de milho e algodão no Brasil, e no Rio Grande do Sul também na cultura de arroz. O mecanismo de ação do glifosato ocorre através da inibição da enzima EPSPs (5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfatosintase), necessária para síntese de aminoácidos aromáticos, o local de aplicação ideal deste herbicida são as folhas e partes aéreas das plantas. Os sintomas aparecem de 5 a 10 dias após a aplicação, que deve ser realizada na planta em condições de transporte (Oliveira Jr et al., 2011). No solo o glifosato pode ser adsorvido, dessorvido e degradado, apresentando um tempo de meia vida de dissipação entre 14,5 e 25,8 dias e meia-vida de mineralização entre 252,6 e 282,1 dias (Yamada, Castro, 2007).

Estudos observaram que a germinação de sementes de trigo, milho e soja plantadas em areia é pouco afetada pela dose de glifosato, o oposto ocorrendo com o crescimento, que ficou bastante reduzido. Na prática, é difícil que estes efeitos possam se repetir, principalmente em solos com textura média ou argilosa e com altos teores de matéria orgânica. Contudo, isto poderia ocorrer nos solos mais arenosos, com a semeadura feita logo após a dessecação da cobertura com o glifosato, acarretando em uma série de efeitos no metabolismo secundário das plantas, tais como: na síntese do ácido indolilacético (IAA), na síntese do etileno, na síntese de compostos fenólicos, na síntese de aminoácidos e de proteínas, na ultraestrutura celular, na permeabilidade de membranas, na síntese de clorofila, na fotossíntese, respiração e transpiração, na germinação de sementes e desenvolvimento das plantas, entre outras mais. (Yamada, Castro, 2007).

De acordo com sua classificação toxicológica o herbicida é citado como pouco tóxico, já em relação ao potencial de periculosidade ambiental, é considerado um produto perigoso, devido aos riscos associados à contaminação da água e do meio ambiente (Amarante Jr et al., 2002a; Silva et al., 2011). Existe a necessidade de medidas de redução na aplicação do glifosato, e o desenvolvimento de fórmulas de liberação controlada surgem como uma alternativa para minimizar a aplicação deste herbicida, que devem ser desenvolvidas e podem ser implementadas na agricultura (Grillo et al., 2012; Grillo, Rosa, Fraceto, 2013; Souza et al., 2012; Jiang et al., 2012; Liu et al., 2012).

### **3.2. Liberação controlada de herbicidas**

Estudos têm mostrado que embora a utilização dos herbicidas na agricultura ainda seja bastante alta, sabe-se que dependendo do método de aplicação e das condições climáticas, cerca de 90% dos herbicidas convencionalmente aplicados no campo nunca encontram seu objetivo principal, que é justamente, produzir a resposta biológica desejada no momento exato e nas quantidades específicas requeridas. Estes problemas ocorrem devido à baixa especificidade destes compostos com a planta e também pela baixa estabilidade química que estas moléculas possuem. Nos últimos anos, a tecnologia de liberação controlada (ou modificada) emergiu como uma importante alternativa aos problemas que acompanham a eficiência, a minimização de impactos ambientais e a garantia do desenvolvimento sustentável (Grillo, 2011; Grillo et al., 2012; Grillo, Rosa, Fraceto, 2013; Jiang et al., 2012; Liu et al., 2012).

O termo liberação controlada é utilizado para sistemas que possuem a capacidade de liberar de forma contínua e prolongada uma determinada substância. Este sistema tem sido extensivamente aplicado na indústria farmacêutica, alimentícia, mas também já existem relatos de utilização visando aplicações

agrícolas (Grillo, 2011; Grillo et al., 2012; Grillo, Rosa, Fraceto, 2013; Jiang et al., 2012; Liu et al., 2012).

A Figura 3.2 apresenta as diferenças entre o sistema convencional e de liberação controlada para os herbicidas. No sistema convencional as várias aplicações do herbicida podem fazer com que se ultrapasse a concentração máxima segura do composto, enquanto para a formulação de liberação controlada, isto pode não ser observado. Além deste fator citado acima, os sistemas de liberação controlada podem levar a diversas vantagens como: redução na quantidade de substância química necessária para o controle de pragas; diminuição no risco de contaminação ambiental; redução na quantidade de energia necessária, uma vez que se reduz o número de aplicações necessárias comparadas as formulações convencionais; aumento na segurança das pessoas responsáveis pela aplicação do produto no campo (Grillo, 2011).

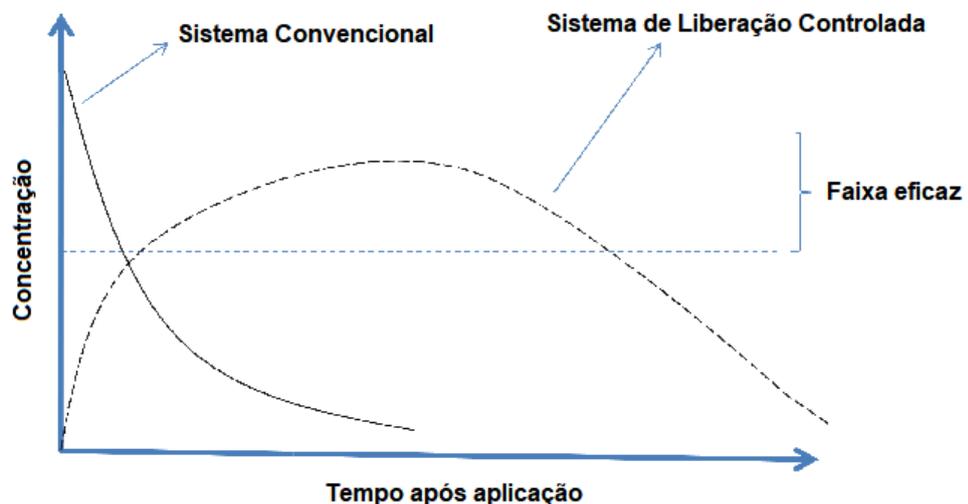


Figura 3.2. Representação esquemática de um sistema convencional para aplicação de herbicidas e representação de um sistema de liberação controlada.

Fonte: Adaptado de Grillo, 2011.

Considerando alguns trabalhos que produziram sistemas de liberação controlada (Grillo, 2011, Grillo et al., 2012; Grillo, Rosa, Fraceto, 2013; Souza et al., 2012) e na utilização em larga escala de herbicidas no mundo, o seu uso na

agricultura na forma de microesferas para liberação controlada pode ser interessante e bastante promissor, tanto do ponto de vista ecológico, como econômico.

### **3.2.1. Micropartículas**

Na tecnologia associada à modificação da liberação de princípios ativos, como fármacos, agrotóxicos, corantes, aromatizantes, os sistemas matriciais poliméricos são amplamente aplicados na forma de micropartículas. Dentre os sistemas carreadores de substâncias ativas, as micropartículas preparadas a partir de polímeros biodegradáveis ocupam posição de destaque. A obtenção desses sistemas, com diâmetro de partícula em escala micrométrica, constitui-se em uma estratégia interessante na área de formulação farmacêutica, bem como, nas indústrias de alimentos, cosméticos, pigmentos, adesivos, controle de poluição para tecnologia ambiental, entre outras (Suave et al., 2006; Durán et al., 2006; Rao, Geckler, 2011; Pohlmann et al., 2015). As vantagens da utilização de micropartículas incluem a liberação controlada e/ou prolongada da substância nelas incorporadas, a redução de efeitos adversos associados à substância, a proteção de compostos antes de atingirem o local de ação, entre outros (Santos, Fialho, 2007; Grillo, Rosa, Fraceto, 2013).

De acordo com o seu tamanho, as partículas poliméricas são classificadas sendo considerada micropartícula as partículas que possuem diâmetro entre 2 e 50  $\mu\text{m}$  e podem ter uma substância encapsulada ou ligada em sua matriz (Cunha, 2012). Sendo este termo geral, que abrange as microcápsulas e as microesferas, esses dois sistemas diferem entre si segundo a composição, pela presença ou ausência de óleo em suas formulações, e organização estrutural (Melo et al., 2010; Oliveira, 2009; Santos, Fialho, 2007; Durán et al., 2006; Schaffazick et al., 2003; Rao, Geckeler, 2011).

Microesferas (Figura 3.3a) são partículas constituídas de uma matriz polimérica densa, cuja massa interna é sólida e possibilita a adsorção de moléculas na sua superfície ou encapsuladas em seu interior. Em geral, estas partículas são esféricas, mas há ocorrência na literatura de partículas descritas com forma não esférica (Rao, Geckeler, 2011). As microcápsulas são sistemas vesiculares que agem como um reservatório, em que substâncias bioativas são armazenadas no seu interior líquido (água ou óleo) ficando rodeadas por um material sólido (Grillo, 2011; Grillo et al., 2012; Grillo, Rosa, Fraceto, 2013). Nas microcápsulas (Figura 3.3b) os agentes ativos estarão distribuídos no núcleo, ou seja, encapsulados em sua cavidade, ou adsorvidos na parede polimérica enquanto que nas microesferas os agentes ativos podem encontrar-se retidos ou molecularmente dispersos na matriz (Schaffazick et al., 2003; Cunha, 2012; Pohlmann et al., 2015).

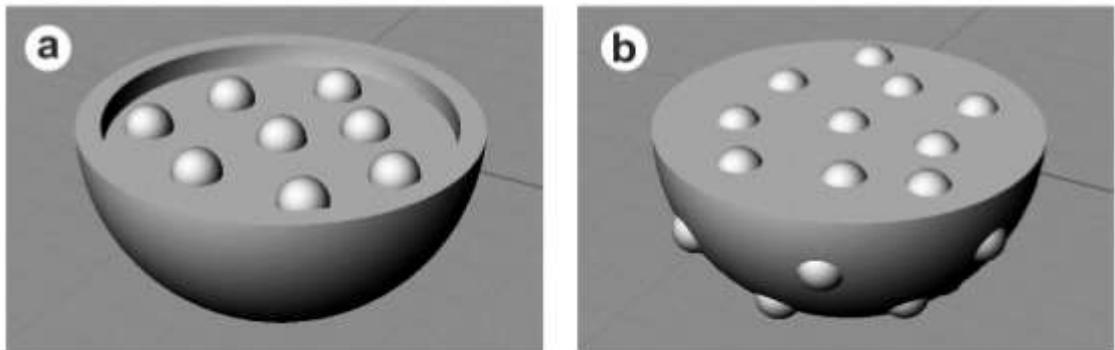


Figura 3.3. Representação esquemática em 3 D: a) microcápsulas e b) microesferas.

Fonte: Adaptado de Pohlmann et al., 2015.

As micropartículas poliméricas podem ser preparadas a partir de polímeros pré-formados ou pela polimerização *in situ* de monômeros. A escolha do método de preparo é feita com base em vários fatores, compreendendo o tipo de polímero usado, local da utilização das partículas, tamanho desejado, entre outros (Rao, Geckeler, 2011).

### 3.2.2. Métodos de nano e microencapsulação

Muitas das tecnologias desenvolvidas atualmente envolvem a micro e nanobiotecnologia, dentre elas, os sistemas carreadores micro e nanoestruturados poliméricos. Estes sistemas agem como compartimentos transportadores de substâncias bioativas, que apresentam a capacidade de alterar as propriedades físico-químicas dos compostos a eles incorporados (Grillo et al., 2012; Grillo, Rosa, Fraceto, 2013).

Existem estudos que apontam que as mesmas propriedades que tornam os nanomateriais tão atrativos, como tamanho nanométrico, forma variada e alta área superficial, podem também ser responsáveis por desequilíbrios ambientais e efeitos nocivos aos organismos vivos e ao homem. Os nanomateriais depois de produzidos são descartados sem um prévio conhecimento dos seus possíveis efeitos tóxicos. O amplo desenvolvimento e aplicações de diferentes sistemas nanoparticulados têm provocado uma grande discussão acerca dos riscos potenciais desses compostos à saúde humana e ao ambiente. Apesar dos grandes esforços no estudo da interação de nanopartículas com sistemas biológicos, ainda se sabe pouco sobre a biodisponibilidade, biodegradabilidade e toxicidade dos nanomateriais nos diferentes sistemas. Como ainda não há padronização internacional quanto à toxicidade das nanopartículas em relação ao tamanho, os estudos de nanotoxicologia ainda são muito controversos na literatura e variam de acordo com o tipo celular estudado (em testes *in vitro*), o tipo de revestimento da nanopartícula e, principalmente, com o tamanho (Foldbjerg et al., 2011; Oberdörster et al., 2005; Nogueira et al., 2013).

Diferentes métodos são encontrados para o preparo de micropartículas poliméricas, os quais permitem a modulação da sua estrutura, da sua composição e das suas propriedades fisiológicas. A escolha do método de preparo depende do polímero e da solubilidade do agente ativo a ser encapsulado. Estes métodos podem ser classificados em duas categorias principais, sendo elas a polimerização de monômeros e a utilização de polímeros pré- formados (Santos, Fialho, 2007).

Para avaliar criticamente as opções, cada método deve ser considerado em termos de quão fácil ele pode ser para a produção, para o impacto na qualidade do princípio ativo, para a biodisponibilidade e para a toxicidade (Santos, Fialho, 2007). O método ideal de microencapsulação deve ser simples, reproduzível, rápido e fácil de transpor à escala industrial (Kissel et al., 2006).

O método de polimerização *in situ* envolve a formação do polímero no momento da preparação das micropartículas e podem ser obtidos por polimerização em emulsão ou polimerização interfacial. As limitações desses métodos envolvem a exigência de solventes orgânicos tóxicos para o preparo e a dificuldade de purificação, levando a presença de moléculas residuais tóxicas (monômeros) decorrentes da polimerização deficiente. Devido a estas limitações, foi proposto o uso de polímeros pré-formados para o preparo das partículas, sendo estes os mais utilizados atualmente. Os métodos baseados em polímeros pré-formados mais utilizados são: nanoprecipitação, deposição interfacial de polímero pré-formado, emulsificação/difusão do solvente, emulsificação/evaporação do solvente e dupla emulsificação ou múltipla emulsificação (Silva et al., 2010b; Schaffazick et al., 2003).

Holz (2012) preparou micro e nanoesferas de poli(lático-co-glicólico) (PLGA) contendo mentol a partir da técnica de emulsificação seguida de evaporação do solvente, que tem sido frequentemente empregada, tendo em vista a simplicidade dos procedimentos envolvidos na obtenção das partículas (Gonnet et al., 2010).

As microesferas de PCL podem ser preparadas por técnicas mais simples por meio de emulsificação de soluções ou por técnicas mais complexas como a diálise. Os parâmetros de cada técnica precisam ser controlados para se obter esferas estáveis, com carga elétrica e solubilidade adequadas e com a menor dispersão de diâmetro. Esses fatores são importantes, pois irão determinar o direcionamento da droga no organismo, o tipo de interação celular e a sua taxa de liberação (Dash,

Konkimalla, 2012). As técnicas de emulsão envolvem o uso de um surfactante como estabilizador das esferas e solventes para a dissolução do polímero e do princípio ativo. Pode ser utilizada para preparar nanoesferas ou microesferas. Na emulsão simples, o princípio ativo e o polímero são dissolvidos em solvente orgânico e a solução resultante é despejada sobre o surfactante aquoso, sob forte agitação constante para a formação de emulsão água/óleo (A/O). Na emulsão complexa, o princípio ativo é dissolvido em meio aquoso e adicionado à solução de polímero dissolvido sob agitação. A emulsão resultante dessa etapa é então adicionada à solução aquosa do surfactante também sob agitação, gerando emulsão, água/óleo/água (A/O/A). Em ambas as soluções a agitação permanece constante até a evaporação total do solvente. As esferas produzidas por essas técnicas podem apresentar diâmetro nanométrico em torno de 100 – 300 nm ou micrométrico em torno 3 – 300  $\mu\text{m}$  com morfologia esférica e superfície lisa. A capacidade de incorporação varia de 2 a 96 %. O tamanho pode ser controlado pela agitação, concentração do solvente e do surfactante. As emulsões A/O são adequadas apenas para a incorporação de drogas lipofílicas, enquanto que as emulsões A/O/A são adequadas para incorporação de drogas lipofílicas ou hidrofílicas. A desvantagem desse método é o resíduo de solvente que pode permanecer após o processamento das esferas (Dash, Konkimalla, 2012; Cunha, 2012).

Através da técnica de emulsão complexa (dupla emulsificação ou emulsão múltipla), Cunha (2012) obteve microesferas biorreabsorvíveis de PCL com estrutura estrelada com uma faixa de diâmetro 1,9 a 47,4  $\mu\text{m}$ , que apresentaram formato esférico, sendo que tanto a morfologia quanto o diâmetro aproximado foram obtidos pelas micrografias no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).

### **3.2.3. Poli( $\epsilon$ -caprolactona)**

Estudos relatam que dentre os polímeros biodegradáveis mais utilizados para liberação de ativos, como o poli(lático-co-glicólico) (PLGA), poliglicólico (PGA),

poli(lactídeo) (PLA) e seus copolímeros, o PCL é o que possui a capacidade de agrupar mais funções químicas em sua estrutura, por isto que é empregado extensivamente em sistemas de liberação controlada. Grillo (2011) relata que os perfis de liberação foram integrados e os valores de eficiência de liberação das formulações de nanocápsulas com os herbicidas triazinicos: atrazina, ametrina e simazina, foram calculados e observou-se valores de 56,5%, 47,2% e 18,7%, respectivamente, quando associados ao PCL.

O PCL é um poliéster alifático linear biodegradável (Figura 3.4) que apresenta um caráter semicristalino, tenaz e flexível, (Campos, Marconato, Franchetti, 2010; Roa et al., 2010), sendo um dos polímeros sintéticos mais estudados no mundo uma vez que é aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA). Polímeros biodegradáveis sintéticos como o PCL vem sendo estudados e utilizados para novas aplicações em diversos materiais devido as suas propriedades de resistência a água, onde uma de suas principais aplicações é o desenvolvimento de sistemas de encapsulamento e liberação controlada de fármacos (Mohamed, Gordon, Biresaw, 2007). A degradação do PCL é muito lenta, dependendo de sua massa molar, podendo chegar aos 3 anos, devido à sua cristalinidade e hidrofobicidade, e por isso é indicada também para implantes de longa duração (Tavares, 2011). Acredita-se que, no solo, enzimas extracelulares sejam as responsáveis por quebrar as extensas cadeias de PCL antes que os microorganismos tenham a capacidade de assimilar o polímero (Rosa, Penteado, Calil, 2000).

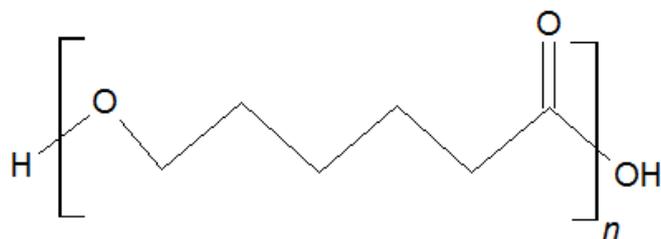


Figura 3.4. Cadeia Principal da Poli( $\epsilon$ -caprolactona).

Fonte: do Autor, 2017.

Do ponto de vista das suas características físico-químicas o PCL tem uma baixa temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) em torno de  $-60\text{ }^\circ\text{C}$  e uma temperatura de fusão ( $T_m$ ) de  $55\text{ }^\circ\text{C}$ , apresentando boas propriedades mecânicas e grande potencial para uso como biomaterial. Uma vez que sua biocompatibilidade permite aplicações nos campos biomédico e farmacêutico, por exemplo, sua alta permeabilidade a drogas tem permitido testes em sistemas de liberação controlada de fármacos. Estas propriedades devem-se ao fato de possuir cadeias de carbono muito extensas e de pouca mobilidade (Cunha, 2012; Tavares, 2011; Campos, Marconato, Franchetti, 2010; Roa et al., 2010).

### **3.3. Avaliação da eficiência de incorporação**

A determinação quantitativa do glifosato pode ser feita por vários métodos, dentre eles destacam-se a Cromatografia Gasosa (CG), a eletroforese, titulações oscilopolarográficas, mas a técnica mais frequente é Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) (Silva, Pezza, Pezza, 2012; Amarante Jr et al., 2002b). São muitas as dificuldades de se determinar o herbicida glifosato por essa técnica, devido ao seu caráter anfótero, baixa massa e falta de grupos químicos que possam facilitar a sua detecção, contudo a maioria dos métodos desenvolvidos até agora empregaram a derivatização em pré-coluna ou pós-coluna para formar fluorescentes derivados e/ou para reduzir o caráter polar do analito, facilitando sua retenção cromatográfica (Botero-Coy et al., 2013). A dificuldade de quantificar o glifosato em tempo adequado, associado ao laborioso método de análise, e considerado situações de análise com soluções contendo somente glifosato, levou à método de análise quantitativa via espectrofotométrica. Este método, faz uso da solução de ninidrina, como agente revelador de cor (púrpura), e possui como vantagem o fato de ser direto e simples, e ainda, pode ser considerado um procedimento mais limpo, uma vez, que utiliza poucos reagentes. Trata-se de uma técnica aplicada à determinação de aminoácidos, que foi adaptado para o glifosato (Bhaskara, Nagaraja, 2006; Mattos, 2008; Silva et al., 2011; Silva, 2012).

O interessante é que não existem muitos trabalhos que utilizaram essa técnica, principalmente para avaliação de tal herbicida em estudos de liberação controlada e incorporação do glifosato em microesferas. E ainda, existem poucos trabalhos que preparam microesferas de glifosato (Liu et al., 2012), provavelmente devido as dificuldades comentadas anteriormente. Contudo, existem muitos trabalhos com micro e nanopartículas de herbicidas triazínicos, com técnicas de detecção renomadas (Grillo, 2011, Grillo et al., 2012; Grillo, Rosa, Fraceto, 2013; Souza et al., 2012).

Grillo e colaboradores (2011, 2012, 2013) introduziram uma nova abordagem tecnológica de sistemas de liberação controlada para herbicidas triazínicos, preparando e caracterizando nanocápsulas obtidas do polímero biodegradável PCL. Os herbicidas triazínicos escolhidos foram ametrina, atrazina e simazina devido a sua ampla utilização em plantações de cana-de-açúcar e milho no Brasil. As nanocápsulas foram preparadas pelo método deposição interfacial de polímero e a eficiência de encapsulação dos herbicidas nas nanocápsulas de PCL apresentou valores compreendidos entre 64% e 98% (m/m).

Farago e colaboradores (2008), obtiveram microesferas de polímero (PHBV) de  $10,21 \pm 1,8$   $\mu\text{m}$  de diâmetro a partir da técnica de dupla emulsificação seguida de evaporação do solvente, com valores de eficiência de encapsulamento que variaram de 0,85% a 9,76%, sendo que estes valores foram considerados apropriados, para o encapsulamento de pequenos fármacos solúveis em água. Cruz e colaboradores (2009) produziram microesferas biorreabsorvíveis de PCL com estrutura estrelada de  $11,7 \pm 2$   $\mu\text{m}$  de diâmetro, com cargas de fármaco em torno de 16%, e obtiveram eficiência de encapsulação mais elevada em torno de 85%.

Segundo trabalho de Tang, Cheng, Ma (2006) a eficiência do processo de encapsulamento em partículas, pode ser calculada através de análise termogravimétrica (TGA). A eficiência do processo de encapsulamento foi determinada através da perda de massa das nanopartículas de compósito com

óxido de zinco (ZnO), comparada a do polímero puro quando aquecidas a 700 °C. Estes autores calcularam a eficiência de encapsulamento através da análise das curvas de TGA (Figura 3.5) que apresentou a perda de massa das partículas por decomposição térmica (Figura 3.5a) e do polímero puro (Figura 3.5b), onde a diferença (aproximadamente 30%) foi de ZnO foi encapsulado na partícula.

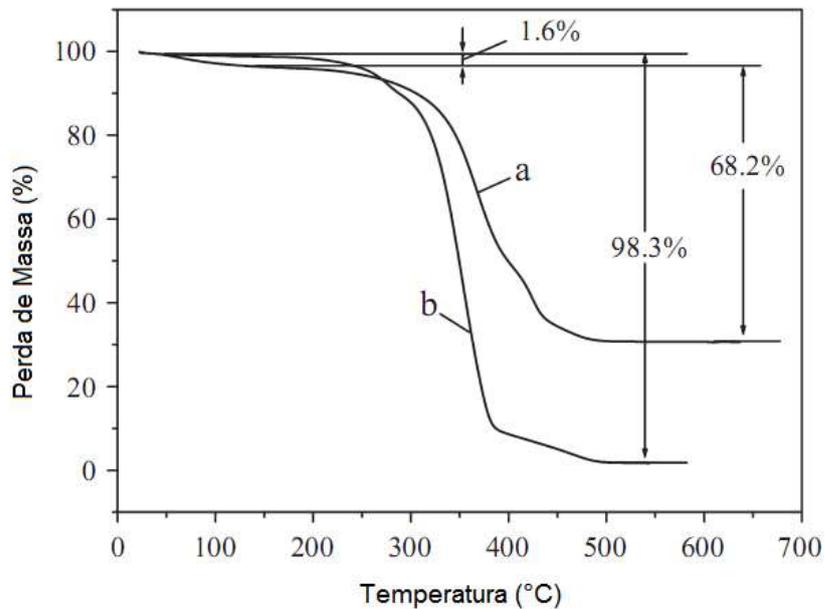


Figura 3.5. As curvas de perda de massa de partículas compostas (a) e polímero puro (b).

Fonte: Tang, Cheng, Ma, 2006.

### 3.4. Avaliação da liberação do agente ativo (cinética de liberação)

A liberação do agente ativo pode ocorrer pela erosão da matriz devido ao processo de biodegradação, porém como o PCL degrada lentamente é mais comum ocorrer a liberação do agente através de sua matriz polimérica por difusão. Geralmente a cinética de liberação é formada pelo pico inicial (*burst*) devido a presença do agente ativo na superfície do sistema carreador. Em seguida a liberação prossegue a uma taxa constante por um determinado período, que irá variar de acordo com a massa molecular do polímero ou com a capacidade de incorporação das esferas, que pode ser controlada pelo método de preparação e

pela concentração do polímero, do solvente e do surfactante (Dash, Konkimalla, 2012).

A avaliação da liberação de agentes ativos pode ser feita por modelagem teórica. Por exemplo, a benzocaína, um anestésico, foi encapsulada com poli (ácido láctico) (PLA), onde o modelo teórico descrito por Korsmeyer-Peppas para liberação de fármacos de sistemas poliméricos foi utilizado para modelar este sistema (Melo et al., 2010). O modelo leva em consideração que o mecanismo de liberação do fármaco não segue a lei de Fick e segue um comportamento anômalo descrito pela Equação (3.1):

$$\left( \frac{M_t}{M_\infty} \right) = kt^n \quad (3.1)$$

Onde:

$M_t$  é quantidade de fármaco liberada em um determinado tempo  $t$ ;

$M_\infty$  é a quantidade de fármaco liberada em um tempo infinito;

$k$  é a constante cinética de liberação;

$n$  é o expoente de liberação.

O valor de  $n$  é relacionado com a forma geométrica (esféricos ou não esféricos) do sistema de liberação e determina o mecanismo de liberação. Então,  $n = 0,45$  está relacionado com processos controlados por difusão de Fick, ou seja, o fluxo de massa de um componente é proporcional ao gradiente de concentração (Pitts, Sissom, 1981);  $0,45 < n < 1,0$  indicam um transporte anômalo não Fickniano, pois o mecanismo para a liberação de fármacos de nanopartículas (como as nanocápsulas) é determinado por diferentes fenômenos físico-químicos. Sistemas de liberação porosos podem apresentar valores de  $n < 0,45$ , devido à combinação de

processos de difusão através da matriz polimérica e difusão parcial através de poros preenchidos com água no interior da matriz polimérica (Melo et al., 2010).

Segundo Ávila e colaboradores (2009), para sistemas esféricos,  $n=0,43$ , indica que o mecanismo de liberação é dependente da difusão do ativo, seguindo a segunda Lei de Fick<sup>3</sup>. Se  $n=0,85$ , a liberação da substância é controlada pela ação do solvente na matriz, seguindo o modelo de cinética de ordem zero. Para valores intermediários de “n”, a difusão é dita anômala, e o mecanismo de liberação corresponde à difusão do ativo através da matriz.

A análise do perfil de liberação da benzocaína (BZC) livre e associada às nanocápsulas está apresentada na Figura 3.6 e pode-se observar que 85% da BZC livre foi liberada em 330 min, e apenas 45% da BZC associada as nanocápsulas foi liberada no mesmo período (Melo et al., 2010).

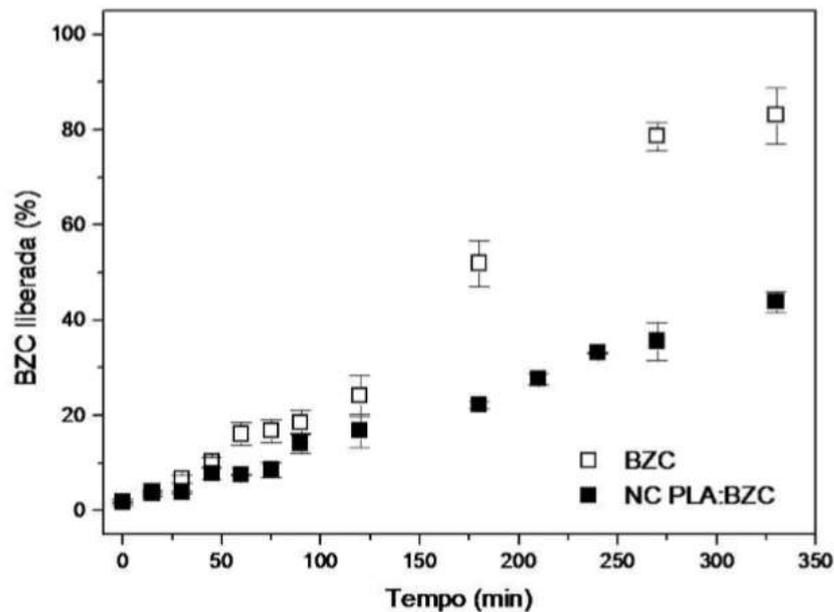


Figura 3.6. Liberação cumulativa da BZC (%) em solução e em suspensão de nanocápsulas de PLA

Fonte: Melo et al., 2010.

<sup>3</sup> Leis de Fick correspondem as equações de transporte de massa por difusão.

Através da linearização da Equação (3.1) do modelo de Korsmeyer-Peppas, obtêm-se a Equação (3.2):

$$\ln\left(\frac{M_t}{M_\infty}\right) = \ln k + n \ln t \quad (3.2)$$

E da construção do gráfico de  $\ln M_t/M_\infty$  em função de  $\ln t$  (Figura 3.7), que fornece o expoente de liberação ( $n$ ) e a constante de liberação ( $k$ ). Sendo que  $n$  é o coeficiente angular da reta e  $\ln k$  o coeficiente linear, obteve-se um  $R^2 = 0,989$ ,  $k = 0,0016 \text{ min}^{-n}$  (constante da taxa de liberação),  $n = 0,95$  (expoente de liberação), logo a BZC é liberada pelo transporte anômalo não governado pela difusão de Fick. A liberação da benzocaína associada as nanocápsulas pode ser bem representada pela Equação (3.3) (Melo et al., 2010):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 0,0016 t^{0,95} \quad (3.3)$$

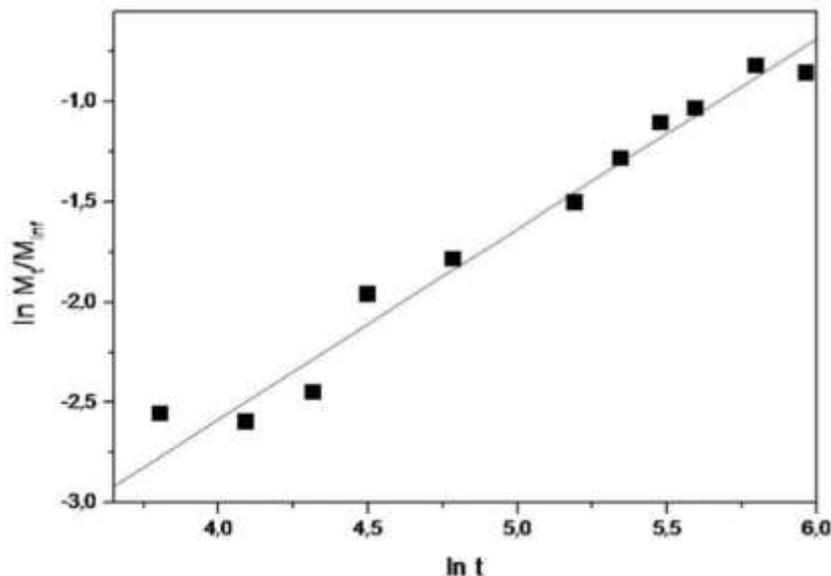


Figura 3.7. Gráfico de  $\ln M_t / M_\infty$  em função do  $\ln t$ , de acordo com o modelo de Korsmeyer-Peppas

Fonte: Melo et al., 2010.

Portanto, a avaliação da liberação da benzocaína pode ser representada pela equação descrita por Korsmeyer-Peppas para liberação de fármacos de sistemas poliméricos. A equação utilizada para modelar a liberação da BZC considera que o fenômeno ocorre pelo transporte anômalo, não governado pela difusão de Fick (Melo et al., 2010).

Em estudos realizados com herbicidas, o perfil de cinética de liberação do herbicida livre, também, mostrou-se mais rápido, quando comparado com o herbicida associado às nanocápsulas preparadas de herbicidas triazínicos. As suspensões coloidais de nanocápsulas apresentaram tamanho médio entre 200-300 nm e as análises microscópicas revelaram uma morfologia esférica, densa e sem agregados. Os espectros de infravermelho das nanocápsulas de PCL contendo herbicidas triazínicos, não apresentaram bandas relacionadas aos herbicidas, evidenciando uma interação entre o composto bioativo e a nanopartícula (Grillo, 2011, Grilo et al., 2012; Grilo et al., 2013; Souza et al., 2012).

Em trabalho de Grillo e colaboradores (2012), a análise do perfil de liberação para nanocápsulas de herbicidas triazínicos utilizando o modelo de Korsmeyer Peppas, mostrou que o herbicida é liberado destas por um processo de transporte governado por processos cinéticos não Fickiniano, uma vez que apresentaram um expoente de liberação de 0,87 para a simazina e de 0,99 para a ametrina.

Silva e colaboradores (2010b) estudaram nanopartículas de alginato contendo clomazone, obtidas pela técnica de dupla emulsificação, apresentando características de sistemas coloidais nanométricos. Os resultados mostraram uma boa eficiência de associação do herbicida nas partículas, onde valores de 89,8 e de 59,1%, foram alcançados. Pela análise da Figura 3.8 observa-se que  $70 \pm 4\%$  do clomazone foi liberado em um período de tempo de 240 min. Quando associado às matrizes poliméricas das nanopartículas de alginato/quitosana (AG/QS) e alginato/sódio bis(2-etil-hexil) sulfossuccinato (surfactante) (AG/AOT), os valores

máximos em porcentagem de liberação do clomazone (no mesmo período de tempo), foram de  $50 \pm 2\%$  e  $20 \pm 0,9\%$ , respectivamente. Indicando que a associação do herbicida às nanopartículas alterou o tempo de liberação, fazendo com que o clomazone seja liberado mais lentamente. A análise do perfil de liberação utilizando o modelo de Korsmeyer Peppas mostrou que o clomazone é liberado por um processo de transporte governado por processos cinéticos não Fickiniano.

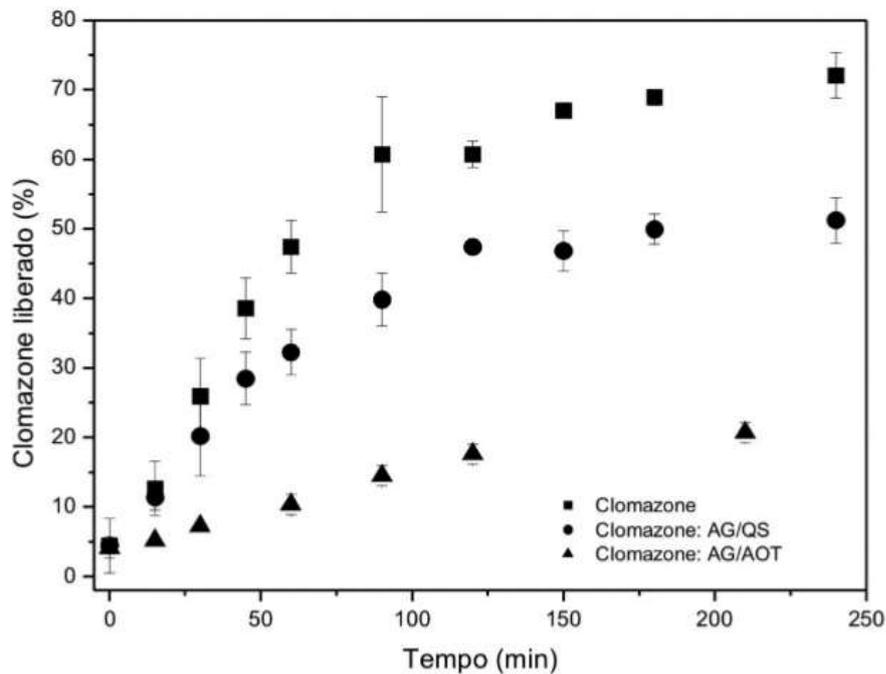


Figura 3.8. Curva de liberação do clomazone associado às nanopartículas de AG/QS e AG/AOT

Fonte: Silva et al., 2010b.

### 3.5. Bioensaios com sementes

A utilização de herbicidas com formulações de liberação controlada poderá ser uma ferramenta importante para reduzir problemas de lixiviação e garantir a eficácia desses produtos. A soja geneticamente modificada (GM) tolerante ao glifosato é uma opção favorável ao plantio direto, que possibilita redução no uso de herbicidas, flexibilidade no controle de plantas daninhas, menor impacto ambiental e potencial incremento em produtividade e rentabilidade da lavoura de soja. É

presumível que a verificação de cultivares quanto a transgenia venha fazer parte desses padrões, tendo em vista a liberação do plantio de soja GM e a exigência de pureza genética. No que se refere à soja GM tolerante ao glifosato, os bioensaios constituem uma alternativa prática e eficiente para detecção de sementes de soja GM (Pereira et al., 2009; Funguetto et al., 2004; Miranda et al., 2005; Mendonça et al., 2014).

Entre os bioensaios, que apresentam bons resultados para identificação de sementes tolerantes, podem ser citados: germinação seguida de aplicação do herbicida sobre as plantas; pulverização foliar com glifosato pós-germinação; umedecimento do substrato de germinação com solução do herbicida; identificação com base na atividade de enzimas; imersão de sementes em solução do herbicida; pré-embebição de sementes em substrato umedecido com glifosato; emergência da plântula<sup>4</sup> em areia, seguida de aplicação do herbicida; e, detecção em sistema hidropônico. A utilização desses métodos na detecção de sementes de soja convencional em lotes de soja GM, leva ao questionamento em relação a eficiência dos bioensaios. O produtor que opta por cultivar a soja tolerante ao herbicida, mas deseja antes investigar a pureza genética do lote de sementes adquirido. Caso o lote contenha sementes de soja convencional sensível ao herbicida, parte de sua lavoura seria perdida sob a aplicação do glifosato na pós-emergência. Ajustar metodologias de bioensaios para detecção de sementes de soja *Roundup Ready* (RR) quanto à umidade do substrato e à concentração do herbicida na solução e avaliar a eficiência de cada bioensaio na detecção e quantificação de misturas simuladas contendo sementes de soja GM e não-GM. Cultivares estudadas, CD 219 RR (GM) e CD 211, sendo esta última, convencional, sensível ao glifosato. As sementes foram submetidas aos bioensaios: germinação de sementes em papel

---

<sup>4</sup> embrião desde o início do seu desenvolvimento, em consequência da germinação da semente, até a formação das primeiras folhas (Pereira et al., 2009; Miranda et al., 2005).

umedecido com glifosato e pré-embebição das sementes em substrato umedecido com solução do herbicida (Pereira et al., 2009; Miranda et al., 2005).

A melhor umidade e solução, foram definidas para os bioensaios de germinação em papel umedecido com solução do glifosato e pré-embebição das sementes em papel umedecido com herbicida. Na germinação em papel umedecido com solução do glifosato a concentração 0,03 % e a umidade 3,0 constituíram o protocolo mais eficiente para a caracterização das plântulas em relação à tolerância ou sensibilidade ao herbicida glifosato (Funguetto et al., 2004; Cunha et al., 2005; Pereira et al., 2009). Na pré-embebição das sementes em papel umedecido com herbicida o melhor protocolo para este bioensaio foi a combinação da concentração 0,3 % e a umidade 2,0. Os bioensaios de umedecimento do substrato de germinação e de pré-embebição das sementes apresentam elevado potencial para a detecção e quantificação de misturas e podem se constituir em eficientes testes para identificação de cultivares. Anormalidades causadas pelo herbicida são particulares: ausência de raízes secundárias, redução no comprimento de raiz primária e seu engrossamento, sinal evidente de paralisação do desenvolvimento e etc (Figura 3.9) (Pereira et al., 2009).

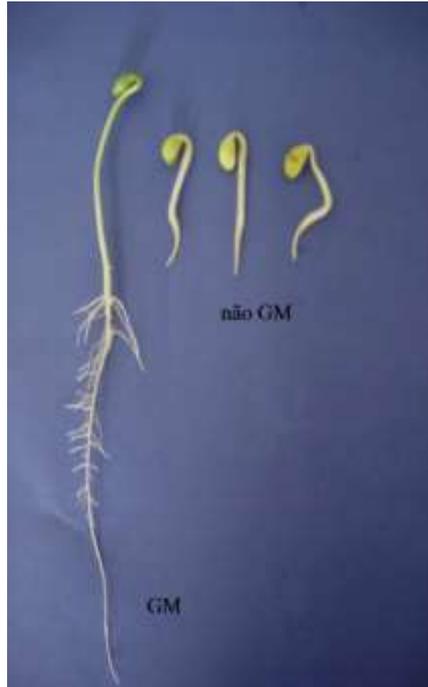


Figura 3.9. Plântulas de soja, cultivar OC 14 (não GM), comparadas à cultivar CD 213 RR (GM) na presença do herbicida glifosato.

Fonte: Funguetto et al., 2004.

Silva e colaboradores (2010a) estudaram a germinação de sementes de arroz, milho e feijão, que foram conduzidas através do bioensaio com substrato umedecido, onde o substrato utilizado foi papel toalha, distribuindo-se 400 sementes em repetições de 8 por 50, sobre 2 folhas de papel, sobre as quais era colocada mais uma folha, enrolando-se posteriormente o conjunto. O papel antes de ser utilizado, foi umedecido com água destilada à razão de 2,5 vezes o seu peso seco. Os tratamentos foram mantidos em germinador, mantido à temperatura constante de 25 °C. As contagens foram realizadas no 7º e 14º dias para o arroz, no 4º e 7º para o milho e no 5º e 9º dias para o feijão, após a semeadura e os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais (Silva et al., 2010a).

No bioensaio utilizando substrato com solução de herbicida, conduzido de acordo com as recomendações de Brasil (2009), o substrato mais utilizado foi o rolo

de papel – utilizando três folhas de papel germitest, umedecidas com água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel (Vidigal et al., 2007; Silva et al., 2010a).

A germinação de sementes em teste de laboratório (Bioensaio) é a emergência e desenvolvimento das estruturas essenciais do embrião, demonstrando sua aptidão para produzir uma planta normal sob condições favoráveis de campo. Nos testes de laboratório a porcentagem de germinação de sementes corresponde à proporção do número de sementes que produziu plântulas classificadas como normais. Para que uma plântula possa continuar seu desenvolvimento até tornar-se uma planta normal, deve apresentar as seguintes estruturas essenciais: sistema radicular (raiz primária e em certos gêneros raízes seminais), parte aérea (hipocótilo, epicótilo, mesocótilo (*Poaceae*), gemas terminais, cotilédones (um ou mais) e coleótilo em *Poaceae*). Um sistema radicular bem desenvolvido é formado por: raiz primária longa e delgada geralmente revestida por numerosos pelos absorventes e terminando numa extremidade afilada; raízes secundárias produzidas dentro do período de duração do teste. A parte aérea pode ser considerada bem desenvolvida quando formada por: mesocótilo alongado, em certos gêneros de *Poaceae* e um número específico de cotilédones: por exemplo, dois cotilédones em dicotiledôneas. Em plântulas com germinação epígea, eles geralmente são verdes e foliáceos, com tamanho e forma variando com a espécie em análise. Assim sendo, uma plântula com qualquer uma das suas estruturas essenciais ausentes ou tão danificadas que não possa ocorrer desenvolvimento proporcional, são consideradas anormais (BRASIL, 2009).

Classifica-se ainda como plântula anormal, quando ela apresenta um ou mais dos seguintes defeitos no Sistema radicular: Raiz primária atrofiada; curta e grossa; desproporcional em relação as outras estruturas da plântula; ausente; quebrada; fendida a partir da ponta; com estrangulamento; fina e fraca; retorcida; presa dentro do tegumento da semente; com geotropismo negativo; hialina; deteriorada devido a uma infecção primária. Raízes seminais, apenas uma raiz seminal fraca ou ausente.

A primeira parte que surge na germinação é a raiz principal proveniente da radícula as raízes secundárias ou seminais são geradas depois, no caso de apresentarem um ou mais dos defeitos citados são anormais e não podem substituir uma raiz primária anormal em casos onde a presença de várias raízes secundárias (por ex. Cucumis), ou pelo menos uma raiz seminal forte (por ex. Triticum), ou duas seminais fortes (por ex. Cyclamen), possibilitam a classificação da plântula como normal. Parte aérea: Hipocótilo, epicótilo e mesocótilo: curto e grosso, exceto em Cyclamen; não formando um tubérculo, como em Cyclamen; com rachadura profunda ou quebrado; com fenda que atravessa a estrutura, atingindo os tecidos condutores; ausente; com estrangulamento; torção completa ao longo de todo o comprimento da estrutura; curvado; retorcido; formando um laço ou espiral; hialino; deteriorados devido a uma infecção primária (BRASIL, 2009).

### **3.5.1. Arroz**

O arroz planta da classe monocotiledônea é do gênero *Oryza* e da família *Poaceae*, e a plântula normal formada em um teste de germinação exhibe os sistemas apresentados na Figura 3.10, sendo as estruturas essenciais a uma plântula normal: raiz principal (radícula), raízes seminais e caule (conjunto formado pelo mesocótilo e coleótilo) de acordo com as Regras para Análise de Sementes – RAS (Brasil, 2009; Franzin et al., 2008).

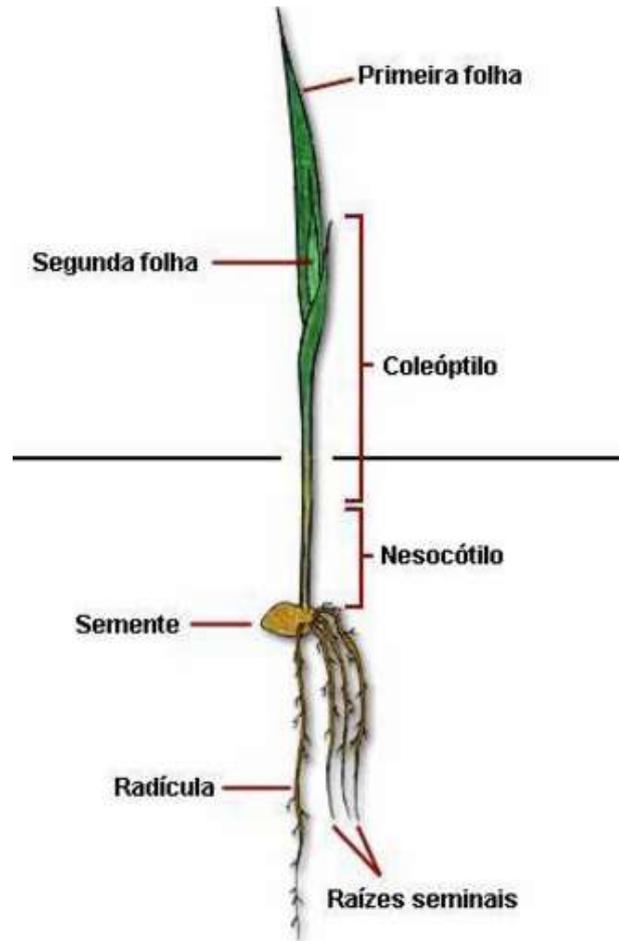


Figura 3.10. Plântula normal formada a partir da germinação da semente de arroz.

Fonte: <http://www.marchioro.eng.br/faseinicial.htm>

O arroz, é um dos cereais mais importantes para a alimentação humana, sendo superado apenas pelo trigo. É um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo e caracteriza-se como principal alimento de mais da metade da população mundial. É parte integrante do hábito alimentar dos brasileiros, que consomem cerca de 25 kg de arroz por ano. Na safra 2015/16, o Brasil produziu 10.602,9 mil toneladas de arroz, sendo o Rio Grande do Sul responsável por aproximadamente 70% desse montante. Isso contabiliza 8,07 milhões de toneladas, fato que caracteriza o estado como maior produtor desse cereal. A área plantada foi de 1,08 milhão de hectares, com produtividade de 7.466 kg/ha. Além das condições climáticas que propiciam altas produtividades, o Rio Grande do Sul possui logística

estratégica que facilita a comercialização do produto (CONAB, 2016). No entanto, o fator que mais se destaca como limitante para o aumento do potencial produtivo é o controle insatisfatório de plantas daninhas, especialmente do arroz-vermelho, considerado a principal planta daninha de áreas cultivadas com arroz irrigado (Mendonça et al., 2014).

Por ser da mesma espécie botânica do arroz cultivado, o controle do arroz vermelho com herbicidas é complicado. No entanto, práticas como o emprego de sementes isentas dessa invasora, mudança no sistema de cultivo, uso de rotação de culturas e manejo de água, até o momento demonstram baixa eficiência. Desse modo, o desenvolvimento do sistema Clearfield (CL), constitui-se uma alternativa promissora para o controle do arroz vermelho em lavouras infestadas e, também para superar o atual patamar de produtividade das cultivares de arroz irrigado utilizadas até o momento. A cultivar de arroz IRGA 422EPS CL e o híbrido Sator CL, desenvolvidas a partir de linhagens mutantes<sup>5</sup> são tolerantes a mistura herbicida Imazethapyr mais Imazapique. Herbicidas desse grupo inibem a enzima acetolactato sintetase (ALS), que é essencial na biossíntese dos aminoácidos de cadeia ramificada, como isoleucina, leucina e valina interferindo, então na síntese de DNA e no crescimento celular (Barbieri et al., 2010).

---

<sup>5</sup> Existem dois grupos de linhagens modificadas: a linhagem transgênica, resistente a herbicidas, e a linhagem mutante, tolerante a herbicidas. A mutação consiste em fontes primárias de variabilidade genética, resultantes de alterações de DNA que modificam o genótipo do indivíduo, podendo ser espontâneas ou induzidas. As mutações espontâneas são raras e não direcionadas, sendo limitado seu uso no melhoramento de plantas, pois a chance que ocorra espontaneamente uma mutação favorável é muito pequena. Portanto, ao referir-se a linhagens mutantes, pensa-se em mutação induzida. As linhagens mutantes, quer sejam obtidas por radiação, agentes químicos ou variação somaclonal não sofrem restrições do ponto de vista legal no Brasil, sendo permitido comercialização e consumo, atualmente, sem nenhuma restrição (Silva et al., 2007).

Com o desenvolvimento do arroz resistente ao grupo químico das imidazolinonas, tecnologia denominada Sistema Clearfield®, tornou-se possível o manejo do arroz-vermelho de forma eficiente. Porém, um dos problemas que pode ocorrer no referido sistema é o fluxo de genes ou a resistência natural em plantas de arroz-vermelho, prejudicando a eficiência do mesmo (Mendonça et al., 2014).

Em laboratórios de análises de sementes, vêm sendo utilizados testes de resistência a herbicidas, paralelamente juntos com testes de germinação, chamados de bioensaios, que foram utilizados e descritos por várias literaturas (Pereira et al., 2009; Miranda et al., 2005; Funguetto et al., 2004; Cunha et al., 2005). Esses testes estão fundamentados na caracterização morfológica das plântulas formadas no substrato umedecido com herbicida, ou de sementes embebidas em solução aquosa do herbicida. Assim como nas espécies geneticamente modificadas, no arroz mutante, é relevante o uso de técnicas de identificação eficientes, rápidas, de baixo custo e cujos resultados possam ser reproduzidos por diferentes laboratórios (Barbieri et al., 2010).

É possível identificar cultivares de arroz mutantes (Clearfield), através de bioensaios baseadas no teste de germinação. O bioensaio usando papel umedecido com a solução do herbicida a 0,0001% (v/v), na temperatura de 30 °C, com avaliação no quarto dia após a semeadura é eficiente para detecção de sementes de arroz tolerante a herbicidas do grupo das imidazolinonas segundo a literatura (Barbieri et al., 2010). Silva e colaboradores (2007) em seu trabalho obtiveram na análise de seus resultados, para a metodologia do papel umedecido, a concentração de 0,001 % (v/v) do herbicida diluído em água como adequada, para detecção de sementes de arroz mutante tolerante ao herbicida imazethapyr, tanto na avaliação final da germinação, aos 14 dias, quanto na primeira contagem, aos 7 dias.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Materiais

Na tabela 4.1 são apresentados dados sobre os reagentes e solventes utilizados nos procedimentos experimentais.

Tabela 4.1. Reagentes e solventes utilizados na preparação das microesferas

Produto	Descrição	Origem	Informações adicionais
PCL	poli( $\epsilon$ -caprolactona)	Sigma-Aldrich	70.000-90.000 g/mol
Roundup WG	Glifosato/herbicida	Monsanto do Brasil Ltda.	Pureza 72%
Diclorometano	Solvente orgânico	Nuclear	Pureza 99,5%
Álcool Polivinílico (PVA)	Agente surfactante	Vetec	86,5-89,5% de hidrólise
Ninidrina	Agente revelador	Nuclear/Vetec	>98%
Molibdato de sódio	Catalisador	Merck	Pureza 99,5%
Cloreto de cálcio	Sal	Nuclear	Pureza 96%
IRGA 424	semente de arroz convencional	FAD sementes	doação
PUITA INTA CL	semente de arroz mutante	FAD sementes	doação
GURI INTA CL	semente de arroz mutante	FAD sementes	doação
Papel Germitest	Substrato	Fundação IRGA	doação

## 4.2. Testes Preliminares para Preparação das Microesferas

Foram realizados vários testes (diferentes condições) para formação das microesferas com distribuição de tamanho uniforme, não agregadas e com morfologia esférica. A técnica de emulsificação seguida de evaporação do solvente foi escolhida devido a simplicidade dos procedimentos envolvidos. Este método é considerado simples, reproduzível e rápido, por utilizar polímeros pré-formados e devido as técnicas de evaporação de solvente não requererem equipamento pesado, sendo facilmente adaptáveis à escala industrial.

## 4.3. Síntese das Microesferas de PCL com Glifosato

As microesferas foram obtidas a partir de um polímero biodegradável (PCL), contendo herbicida (Glifosato) através da técnica de dupla emulsificação seguida de evaporação do solvente conforme descrito na literatura (Holz, 2012; Silva et al., 2010b). As preparações das microesferas foram realizadas no Laboratório de Organometálicos e Resinas (LOR) da Faculdade de Química (FAQUI) da Pontifícia Universidade Católica do Rio grande do Sul (PUCRS). A liofilização foi feita no Laboratório de Produtos Naturais/FAQUI/PUCRS, e as caracterizações das microesferas obtidas foram feitas nos Laboratórios de Caracterização de Materiais/FAQUI/PUCRS e de Espectroscopia/FAQUI/PUCRS e Centro de Microscopia da Faculdade de Engenharia (FENG)/PUCRS.

Nesse método, inicialmente, solubilizou-se 0,5 g de PCL em uma quantidade suficiente de solvente orgânico (por volta de 30 mL de diclorometano), originando a fase oleosa (O). A primeira fase aquosa (A<sub>1</sub>) foi obtida dissolvendo-se o glifosato granulado dispersível em água destilada, em uma proporção de 10, 20 e 30% em relação à massa de polímero. Estas concentrações teóricas de glifosato foram baseadas na literatura (Mendes, 2011; Souza et al., 2012; Grillo, Rosa, Fraceto, 2013; Lima et al., 2012). As microesferas produzidas contendo 10%, 20% e 30% de glifosato (teórico), foram nomeadas de ME1, ME2 e ME3, respectivamente.

A fase aquosa ( $A_1$ ) foi adicionada à fase oleosa (O) sob agitação em um emulsificador ultraturrax® por um minuto a 8.000 rpm, para formação da emulsão primária ( $A_1/O$ ). Sendo que para a segunda fase aquosa ( $A_2$ ), foi preparada uma solução de álcool polivinílico (PVA) com a concentração de 0,5% (m/v) (Lima et al., 2012; Holz, 2012).

A emulsão primária  $A_1/O$  foi adicionada, lentamente na segunda fase aquosa ( $A_2$ ), com o auxílio de um funil. A suspensão resultante foi mantida sob agitação por 5 minutos utilizando um emulsificador ultra-turrax® a 30.000 rpm, originando a emulsão dupla ( $A_1/O/A_2$ ), e a formação das microesferas. O solvente orgânico utilizado foi eliminado lentamente, sob agitação, com auxílio de um agitador magnético, pela difusão e evaporação do mesmo a temperatura ambiente e pressão atmosférica por um período de 12h.

As microesferas formadas foram isoladas por centrifugação (centrífuga modelo CT-5000, Cientec) com velocidade de 3.500 rpm por 15 minutos, e lavadas por três vezes com água destilada para remoção do excesso de surfactante (PVA). Por fim, as microesferas foram congeladas em nitrogênio líquido e submetidas ao processo de liofilização (FAQUI/PUCRS), para secagem e estabilização das partículas formadas, por um período de, no mínimo, 24h, e armazenadas em um dessecador.

O liofilizador é dotado de um condensador Helmut Saur Laborbedarf acoplado a uma bomba Edwards Model RV5. A temperatura do condensador varia de -100 a -110 °C, a pressão da bomba é de aproximadamente 0,5 torr e a temperatura da amostra durante o processo é de aproximadamente 40 °C.

As variações nas concentrações de glifosato na obtenção das microesferas foram estudadas buscando a formação das mesmas com distribuição de tamanho regular e não agregadas, com morfologia e tamanho uniforme, e levando-se em

consideração o potencial aumento da eficiência de incorporação. Também foram preparadas microesferas sem glifosato, isto é só com PCL, com a finalidade de comparar resultados (identificadas como ME).

#### **4.4. Técnicas de Caracterização**

##### **4.4.1. Espectroscopia Vibracional no Infravermelho (FTIR)**

As análises de infravermelho foram realizadas em um equipamento Perkin Elmer Instruments Spectrum One FT-IR Spectrometer, 16 varreduras, no intervalo de 4.000 a 650  $\text{cm}^{-1}$ , com o objetivo de caracterizar as microesferas obtidas quanto sua estrutura química. As amostras foram analisadas com o auxílio do acessório de Refletância Total Atenuada Universal (UATR).

##### **4.4.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)**

Os eventos térmicos, temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), temperatura de fusão ( $T_m$ ) e temperatura de cristalização ( $T_c$ ) do PCL e das microesferas, foram obtidos através da técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC). As temperaturas foram medidas em um aparelho de DSC TA Instruments, modelo Q20, em um intervalo de temperatura de -90 a 200 °C, com ciclos de aquecimento (10 °C/min) e resfriamento (10 °C/min), em atmosfera de nitrogênio.

O valor da cristalinidade ( $X_c$ ) foi calculado considerando o valor de 136 J/g (Roa et al., 2010; Campos, Marconato, Franchetti, 2010), calor de fusão para o PCL 100% cristalino ( $\Delta H_m^\circ$ ), com o valor da entalpia de fusão obtida para as amostras ( $\Delta H_m$ ), e considerando a fração de PCL na amostra ( $W$ ) através da Equação (4.1), conforme literatura (Cunha, 2012; Borghesi et al., 2016):

$$X_c = \left( \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^\circ \times W} \right) \times 100 \quad (4.1)$$

#### 4.4.3. Difração de Raios-X (DRX)

Para caracterizar a estrutura cristalina das microesferas foi utilizada a técnica de difração de raios-X (DRX), onde os materiais foram analisados sob a forma de pó em um difratômetro Shimadzu XRD 7000, radiação  $\text{CuK}\alpha$  operando com voltagem de 40 kV e corrente de 30 mA, varredura do  $2\theta$  de  $5^\circ$  a  $70^\circ$ , passo de  $0,02^\circ$  e tempo de contagem de 2,0 s no Laboratório de Materiais e Nanoestruturas (LMN-GEPSI) da PUCRS. Os dados foram tratados utilizando o software Origin 6.0. Para o cálculo da fração cristalina dividiu-se a área dos picos cristalinos pela soma das áreas correspondentes ao espalhamento amorfo e cristalino conforme literatura (Imane et al., 2015).

#### 4.4.4. Análise Termogravimétrica (TGA)

As análises termogravimétricas foram realizadas em um equipamento SDT (modelo Q600, TA Instruments) utilizando uma rampa de aquecimento de  $20^\circ\text{C}/\text{min}$  da temperatura ambiente até  $1000^\circ\text{C}$ , em atmosfera de nitrogênio, com aproximadamente 10 mg de amostra.

#### 4.4.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Essa técnica objetiva a análise detalhada da morfologia e da superfície da amostra. As caracterizações foram realizadas utilizando o Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), PHILIPS modelo XL30 com resolução de 3,5 nm (no modo elétron secundário) e faixa de aumentos de 500 a 50.000 vezes, tensão de aceleração de

20 kV, utilizando ouro para metalização das amostras. A faixa de diâmetro das partículas, foi obtida utilizando o software *ImageJ*.

#### 4.4.6. Determinação Espectrofotométrica do Glifosato

A determinação quantitativa do glifosato foi feita pelo método da ninidrina via técnica espectrofotométrica baseada na literatura (Bhaskara, Nagaraja, 2006). Neste método a ninidrina é usada como revelador, o que proporcionou ao composto uma coloração púrpura (*Ruhemann's purple*), que pode ter absorvância investigada em 570 nm. Para desenvolvimento da reação (Figura 4.1.) utilizou-se aquecimento (100 °C) e molibdato de sódio como catalisador.

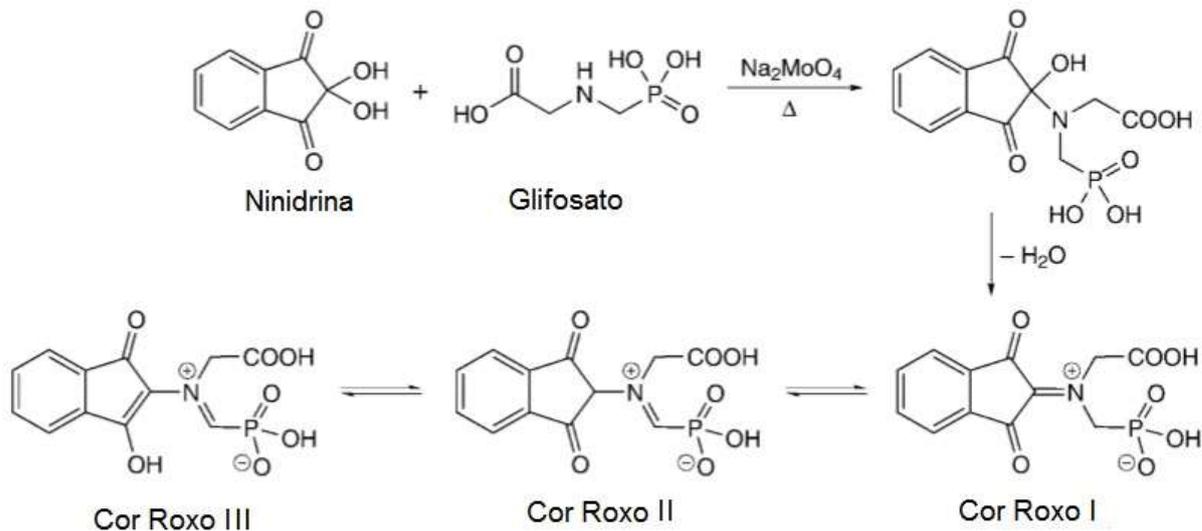


Figura 4.1. Reação de ninidrina com glifosato na presença de molibdato de sódio.

Fonte: Adaptado de Bhaskara, Nagaraja, 2006.

A eficiência de incorporação (EI) foi calculada utilizando a Equação 4.2, a partir da razão entre diferença da concentração teórica utilizada na formulação ( $C_{\text{teórica}}$ ) e a concentração livre ( $C_{\text{livre}}$ ) presente nas soluções obtidas na etapa de centrifugação e nas etapas de lavagem e a concentração teórica multiplicada por 100 (Külkamp et al., 2009).

$$EI = \frac{C_{teórica} - C_{livre}}{C_{teórica}} \times 100 \quad (4.2)$$

A concentração de glifosato livre foi obtida a partir da construção de uma curva analítica nas concentrações de 0,1 a 3,5  $\mu\text{g/mL}$  com a aplicação da Lei de Beer-Lambert (regressão linear), com as absorbâncias das soluções medidas no espectrofotômetro de UVvis (CELM E-225D). As soluções com diferentes concentrações foram preparadas a partir de alíquotas retiradas de uma solução de 50  $\mu\text{g/mL}$  de glifosato, obtida pela diluição de 35 mg de glifosato 72% em um balão de 500 mL. As essas distintas concentrações de glifosato foram adicionadas 1 mL de solução de ninidrina 5% (m/v) e 1 mL de solução de molibdato de sódio 5% (m/v) que serviu como catalisador da reação. A solução formada com glifosato, ninidrina e sódio molibdênio foi mantida na temperatura de 100 °C por 5 minutos. As soluções de coloração amarela/púrpura foram resfriadas até a temperatura ambiente e diluídas com  $\text{H}_2\text{O}$  deionizada em balões volumétricos de 10 mL, e tiveram suas absorbâncias investigadas em 570 nm.

A concentração livre presente nas soluções obtidas na centrifugação e nas lavagens das microesferas, foi estimada a partir da equação da reta (Equação 4.3), obtida pela regressão linear da curva analítica (Figura 4.2), que apresentou desvios de 0,001 a 0,002, construída a partir de diferentes concentrações do herbicida (Figura 4.3). Na Equação 4.3, C é a concentração em ( $\mu\text{g/mL}$ ) e A é a absorbância, que apresentou um coeficiente de correlação de 0,995.

$$A = 0,0406C - 0,0004 \quad (4.3)$$

## Curva de Calibração de Glifosato

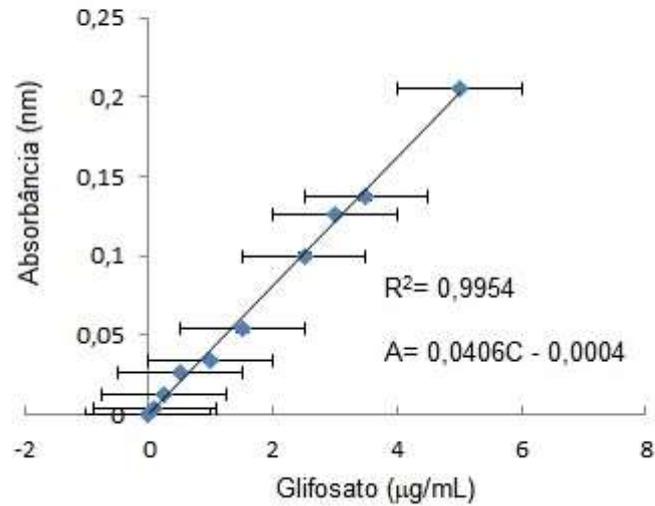


Figura 4.2. Curva de calibração da absorbância em função da concentração de glifosato, obtido pelo método da ninidrina, determinado por análise espectrofométrica em 570 nm. Regressão linear obtida a partir de diferentes concentrações do herbicida ( $n=4$ ).



Figura 4.3. Amostras com diferentes concentrações do herbicida para construção de curva analítica.

E ainda, foi verificado o tempo de estabilidade do agente revelador de cor na solução, no caso a ninidrina. A literatura (Bhaskara e Nagaraja, 2006) afirma que o mesmo apresenta estabilidade por até 10 horas, para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos através desta técnica. Nos testes realizados no espectrofotômetro de UVvis, os resultados obtidos para absorbância da cor púrpura obtida com glifosato em presença de ninidrina, revelaram que após 5h a absorbância reduziu aproximadamente 9%, após 10h a absorbância reduziu aproximadamente 21% e após 15 h a absorbância reduziu aproximadamente 33%, sendo estes os valores, para as menores concentrações dentro da curva analítica obtida. Assim sendo, o tempo de estabilidade do agente revelador (ninidrina) na solução foi menor do que afirma a literatura (Bhaskara e Nagaraja, 2006).

A tabela 4.2 apresenta as características óticas do glifosato na presença de ninidrina como reagente cromogênico e molibdato de sódio como catalisador. Para construção da curva analítica, as soluções com diferentes concentrações (10 concentrações distintas), foram preparadas em quadriplicata (n=4), sendo que os pontos analisados apresentaram desvio padrão máximo de 0,002  $\mu\text{g/mL}$  em relação à média.

Tabela 4.2. Características óticas do glifosato na presença de ninidrina como reagente cromogênico e molibdato de sódio como catalisador

Características óticas	Método ninidrina/molibdato
Cor	Púrpura
$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	570
Estabilidade (h)	5
Intervalo da Lei de Beer-Lambert ( $\mu\text{g/mL}$ )	0,1-5,0
Coeficiente angular	0,0406
Coeficiente linear	0,0004
Limite de Detecção (ppm)	0,0922
Limite de Quantificação (ppm)	0,3072
Coeficiente de Correlação ( $R^2$ )	0,9954

#### 4.4.7. Análise Elementar

A análise elementar do PCL e das microesferas de PCL/glifosato foi realizada em um equipamento LECO, modelo Truspec CHN, equipado com detectores de condutividade térmica e infravermelho no Laboratório de Análises Geoquímicas do IPR/PUCRS. As amostras (0,0500 g) foram queimadas numa atmosfera de  $\text{O}_2$  a uma temperatura de 950 °C.

#### 4.5. Cinética de Liberação de Glifosato em Meio aquoso

O estudo da cinética de liberação de glifosato em meio aquoso foi realizado, em temperatura ambiente, utilizando-se uma solução de  $\text{CaCl}_2$  0,01M que simula a força iônica do solo (Martinazzo et al., 2011; Hirsch, 2011). Inicialmente realizou-se

um teste para verificar o comportamento do glifosato neste meio e se a técnica utilizada para a quantificação do mesmo está adequada para determinação da liberação do glifosato em CaCl<sub>2</sub>. A concentração empregada para este ensaio foi calculada considerando que a liberação total de glifosato das microesferas não ultrapasse 5,0 µg/mL, que representa a concentração máxima permitida para que a linearidade a Lei de Beer-Lambert seja respeitada. O ensaio foi realizado em um período de 6 horas com medições realizadas a cada 5 minutos nos primeiros 30 minutos e a seguir a cada 30 minutos. Os resultados foram analisados por meio de espectroscopia de UV-vis (Hewlett® Packard 8453) em 570 nm semelhante ao procedimento adotado na literatura (Ávila et al., 2009), em triplicata.

Para a modelagem matemática dos perfis de liberação para análise do comportamento de liberação do glifosato a partir das microesferas de glifosato, foi utilizado o modelo semi empírico de Korsmeyer-Peppas (Equação 4.4).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (4.4)$$

Onde,  $M_t$  é a quantidade de herbicida liberado em um tempo  $t$ ,  $M_\infty$  é a quantidade de herbicida liberado em um tempo infinito,  $k$  é a constante cinética e  $n$  é o expoente de liberação. O valor de  $n$  está relacionado com a forma geométrica do sistema carreador e determina o mecanismo de liberação conforme literatura (Silva, 2010b; Melo et al., 2010; Grillo et al., 2012).

#### 4.6. Eficiência Agronômica

O comportamento das microesferas de PCL/Glifosato, frente ao herbicida livre, foi avaliado através de bioensaios, para verificar se o glifosato está sendo liberado das microesferas. E ainda, se apresenta um comportamento diferente do

livre (controle negativo), sendo que, a água foi utilizada como controle positivo no bioensaio. As alterações no comportamento de diferentes cultivares de arroz convencional e mutante, foram estudadas em substrato umedecido com soluções de microesferas com glifosato incorporado e de glifosato livre, ambas com a concentração de 0,03% e.a. Utilizou-se três cultivares de arroz, sendo duas mutantes, tecnologia Clearfield (CL), PUITA INTA CL e GURI INTA CL, e uma convencional (IRGA 424).

Nas condições do bioensaio de germinação das sementes de arroz em papel umedecido com solução de glifosato e de microesferas de glifosato, utilizou-se duas repetições de 100 sementes, para cada tipo de semente: Convencional (C) e Mutante (M) e nas condições: sem glifosato, com glifosato livre e com as microesferas de glifosato (mesma concentração foi testada), semeadas em rolos de papel (sobre 2 folhas de papel germitest, sobre as quais era colocada mais uma folha, enrolando-se posteriormente o conjunto) umedecidos com água destilada, na quantidade equivalente a 2,5 vezes a massa do substrato seco (Silva et al., 2010a; Vidgal et al., 2007; Franzin et al., 2007; Franzin et al., 2008), as quais foram mantidas em germinador regulado a temperatura entre 20 e 25 °C, esta faixa de temperatura se mostrou adequada para o ensaio de germinação segundo a literatura (Franzin et al., 2007; Franzin et al., 2008; Schuch et al., 2006). As avaliações foram realizadas aos 14 dias (Franzin et al., 2008; Schuch et al., 2006), após o início do teste, ou seja, após a semeadura e conduzido de acordo com as Regras para Análise de Sementes - RAS (BRASIL, 2009), sendo os resultados expressos em porcentagem de germinação e de plântulas normais. Os passos realizados no procedimento de germinação das sementes de arroz estão apresentados no Figura 4.4.

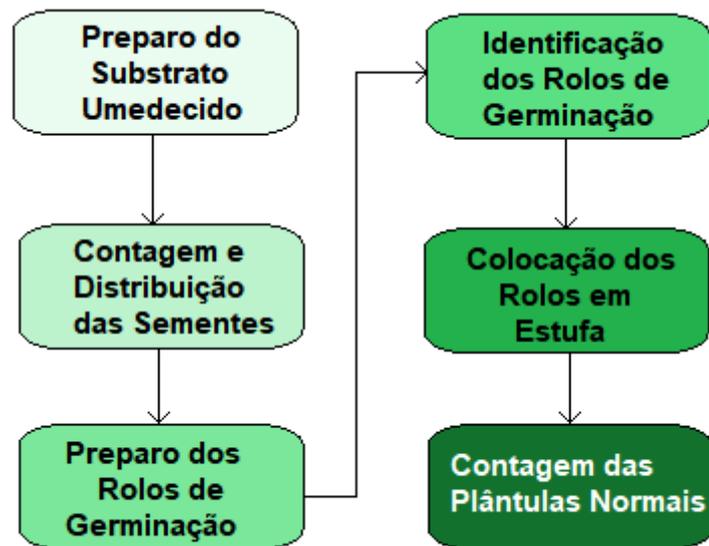


Figura 4.4. Fluxograma das etapas do Bioensaio.

A Figura 4.5. mostra como o procedimento experimental foi conduzido, iniciando pelo preparo das soluções/substrato de papel (germitest) umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel para o teste de germinação (Figura 4.5 a); contagem das 100 sementes por repetição (figura 4.5 b); distribuição das sementes sobre duas folhas de substrato e posterior colocação de uma folha adicional (figura 4.5 c); preparo dos rolos de germinação, enrolando-se o conjunto formado pelas sementes e três folhas de germitest umedecidas (Figura 4.5 d); identificação dos rolos, agrupados com variedades de arroz distintas, porém com soluções iguais (água, glifosato, microesferas) (Figura 4.5 e); colocação em estufa improvisada (aquário, lâmpada e termômetro) com a temperatura mantida entre 20 e 25 °C (Figura 4.5 f); rolos de germinação após 14 dias de bioensaio (Figura 4.5 g); análise das plântulas obtidas (Figura 4.5 h).



Figura 4.5. Procedimento experimental de germinação de sementes de arroz. a) preparo do substrato umedecido; b) contagem das sementes; c) distribuição das sementes; d) preparo dos rolos de germinação; e) identificação dos rolos; f) estufa improvisada; g) rolos após 14 dias de bioensaio; h) análise das plântulas obtidas.

Na avaliação da germinação as plântulas foram consideradas normais quando estas apresentavam os três sistemas essenciais: raiz principal (radícula), raízes seminais e caule (coleótilo) presentes, e anormal quando este padrão não ocorreu. Para avaliar o comprimento médio das estruturas essenciais para germinação de uma semente de arroz das cultivares estudadas, IRGA 424 (convencional), PUITA INTA CL (mutante) e GURI INTA CL (mutante), utilizou-se o comprimento médio da raiz principal, das raízes seminais e do caule, de todas as plantas consideradas normais para cada repetição, avaliado o comprimento das plântulas com auxílio de régua milimetrada, com resultados expressos em cm, para o bioensaio realizado sem glifosato, apenas com água, como controle positivo, conforme apresentado na Figura 4.6. (Franzin et al., 2007).

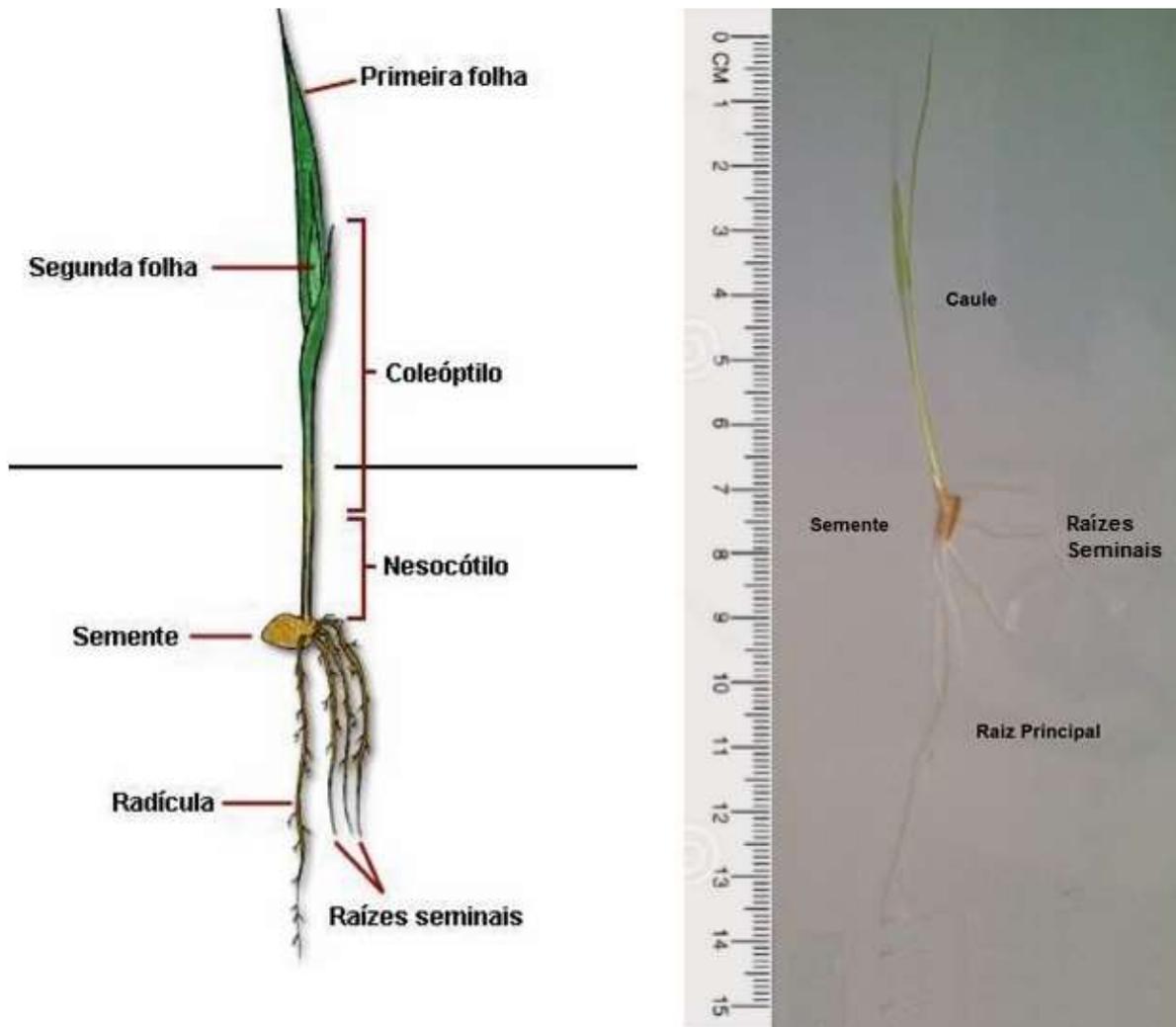


Figura 4.6. Verificação do tamanho das estruturas essenciais a uma plântula normal (raiz principal, raízes seminais e caule) com régua milimetrada.

De acordo com a Regra para Análise de Sementes (RAS), em uma análise de sementes é esperada e admitida certa variação quando se comparam resultados de determinações efetuadas com sementes obtidas da mesma amostra média ou de diferentes amostras médias do mesmo lote, ainda que essas determinações tenham sido feitas no mesmo laboratório e pelo mesmo analista. Essa variação pode ser atribuída às circunstâncias em que as análises foram realizadas, às características da espécie e às condições de produção das sementes, entre outras. O limite da variação acima do qual as diferenças entre resultados são consideradas não aceitáveis (significativas) é denominado tolerância. O objetivo do estabelecimento

de tolerâncias é avaliar se a variação dos resultados dentro e entre testes é aceitável quanto à precisão dos resultados (Brasil, 2009).

As Tabelas de Tolerância (Anexo A e B) elaboradas por Miles (1963, apud Brasil, 2009) foram baseadas em resultados experimentais e princípios estatísticos e são aplicáveis para comparação de resultados de repetições de um teste, resultados entre testes ou mesmo resultados de testes com um padrão estabelecido. Em todas as situações, devem ser rigorosamente observados os procedimentos referentes ao seu emprego.

A Tabela apresentada no Anexo A, foi utilizada para o teste de germinação (plântulas normais, anormais, sementes duras, dormentes e mortas), nela são apresentadas as tolerâncias máximas admitidas para comparação de resultados de dois testes de germinação realizados a partir de diferentes amostras médias do mesmo lote, quando o resultado da segunda análise é pior do que o resultado da primeira análise, realizada no mesmo laboratório ou em diferentes laboratórios, a 5% de probabilidade. Sendo que, considera-se como pior resultado, menor percentagem de plântulas normais ou maior percentagem de plântulas anormais, sementes duras, dormentes e mortas (Brasil, 2009).

A Tabela apresentada no Anexo B, foi utilizada para teste de Germinação (plântulas normais), onde são apresentadas as tolerâncias máximas admitidas para comparação do resultado do teste de germinação da amostra com o padrão estabelecido. São utilizadas para comparação de Testes de Germinação realizados com 400 ou 200 sementes com o padrão. Para grandes culturas e forrageiras, utiliza-se 5% de probabilidade e para sementes de espécies florestais, 1% de probabilidade (Brasil, 2009).

#### 4.7. Tratamento Estatístico

Para o tamanho de partícula foram utilizados os desvios padrões (DP) das amostras, com as medidas de pelo menos 50 partículas por imagem, tendo em vista sua capacidade de avaliar resultados que envolvem a mesma variável-resposta, calculou-se também o coeficiente de variação (CV), permitindo quantificar a precisão das pesquisas. Para construção da curva de calibração da concentração de glifosato em função da absorbância e da curva de liberação, foram calculados os DP, para  $n=4$  e  $n=3$ , respectivamente.

Sendo, CV uma medida de dispersão relativa, pois expressa a relação percentual do desvio padrão em relação à média (M) e o desvio padrão (DP) correspondente ao conceito matemático de distância, ou seja, a dispersão dos dados em relação à média de uma sequência pode-se calcular o CV através da Equação (4.5).

$$CV = \frac{SD}{M} \times 100 \quad (4.5)$$

Para fazer a análise estatística usamos o CV, pois leva em consideração a medida de dispersão absoluta (desvio padrão) e a média da série. Portanto, a medida de dispersão relativa (coeficiente de variação) prevalece sobre a medida de dispersão absoluta (desvio padrão). O coeficiente de variação foi interpretado da seguinte forma, para valores menores ou iguais a 20% trata-se de uma amostra homogênea, e para valores maiores que 20%, trata-se de uma amostra heterogênea, pois segundo a literatura existe uma classificação que considera os coeficientes de variação como baixos quando inferiores a 10%, médios entre 10 e 20%, altos entre 20 e 30% e muito altos se superiores a 30% (Garcia, 1989; Mohallem et al., 2008). Para avaliação da eficiência de incorporação os dados foram

apresentados utilizando média, desvio padrão e coeficiente de variação, com as análises realizadas em triplicata.

Caracterizou-se morfologicamente as plântulas tolerantes e sensíveis ao glifosato quando em presença do herbicida, ou seja, o efeito do herbicida incorporado nas microesferas frente ao herbicida livre nas sementes de arroz. Os resultados foram analisados segundo o delineamento inteiramente casualizado, com duas repetições de 100 sementes. Os dados foram apresentados, percentual de plântulas normais, por média, desvio padrão, coeficiente de variação (obtido pela razão entre o desvio padrão e a média) e em nível de 5 % de probabilidade, utilizando as Tabelas apresentadas no Anexo A e B, conforme Regra para Análise de Sementes (RAS) (Brasil, 2009).

A Figura 4.7 apresenta um fluxograma com as etapas do trabalho, desde o processo por emulsão múltipla e evaporação do solvente para obtenção das microesferas de PCL/Glifosato, até as caracterizações, análises e ensaios realizados nas mesmas, para verificar o potencial de sua aplicação como sistema de liberação controlada.

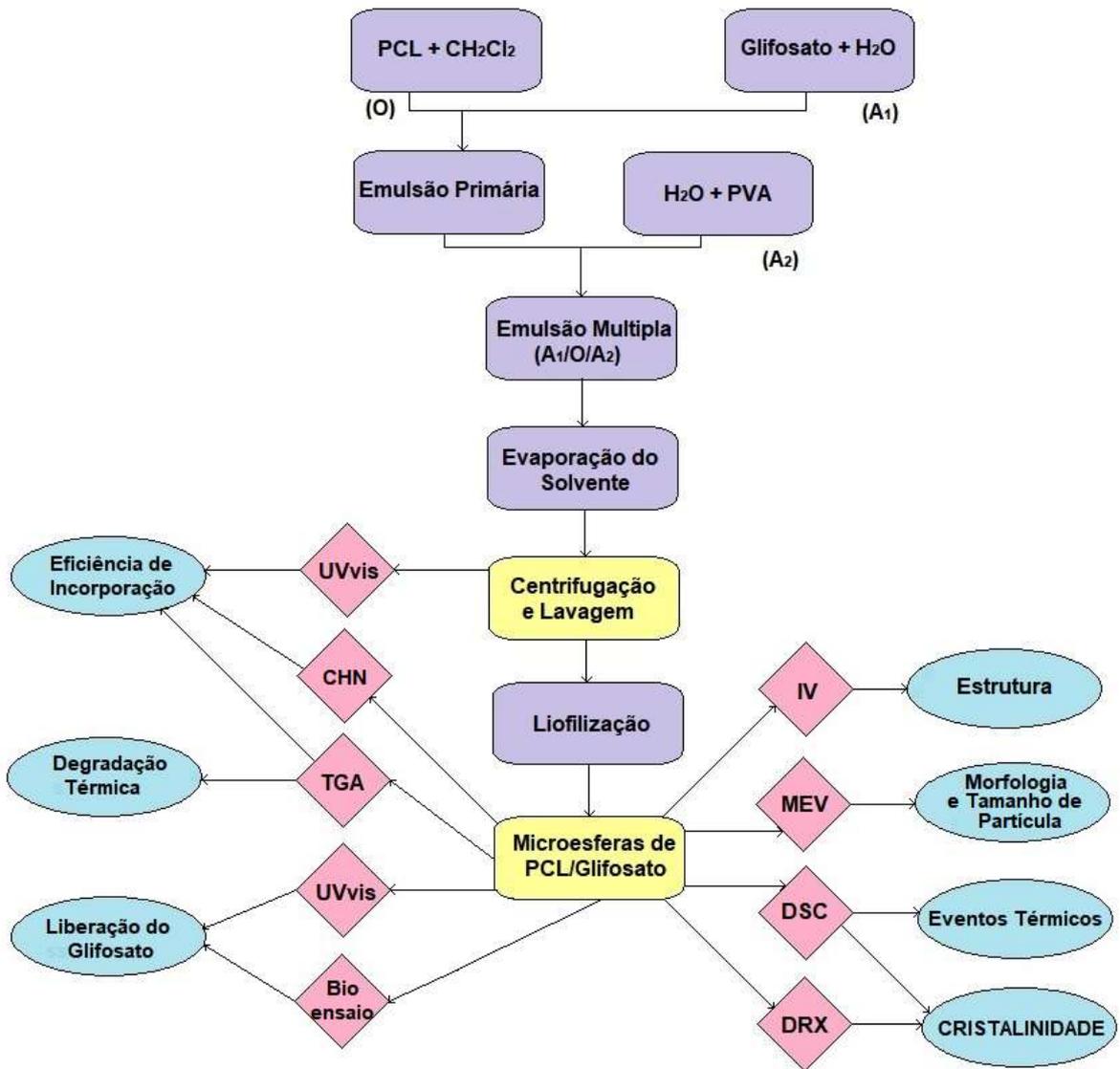


Figura 4.7. Fluxograma do processo por emulsão múltipla e evaporação do solvente para obtenção das microesferas de PCL/Glifosato, caracterizações, análises e ensaios realizados.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Testes Preliminares para Preparação das Microesferas

Nestes testes foram obtidas partículas malformadas quando:

- durante a segunda emulsificação adicionou-se a fase aquosa na emulsão primária formada, em seguida, avaliou-se a ordem das etapas (Figura 5.1a);
- a quantidade de surfactante foi maior que a necessária, logo, estimou-se a concentração de surfactante na fase aquosa A<sub>2</sub> (Figura 5.1b);
- realizou-se o procedimento de evaporação do solvente com bomba de vácuo, ou seja, avaliou-se o tempo para remoção do solvente (Figura 5.1c);
- utilizou-se uma menor velocidade de agitação na segunda emulsificação, otimizando assim a variável velocidade de agitação do procedimento (Figura 5.1d).

O melhor procedimento foi obtido quando as partículas formadas apresentaram forma esférica, sem qualquer agregação ou aderência e tamanho uniforme, ou seja, a partir do estudo preliminar conseguiu-se chegar a um processo mais adequado, conforme descrito no item 4.3.

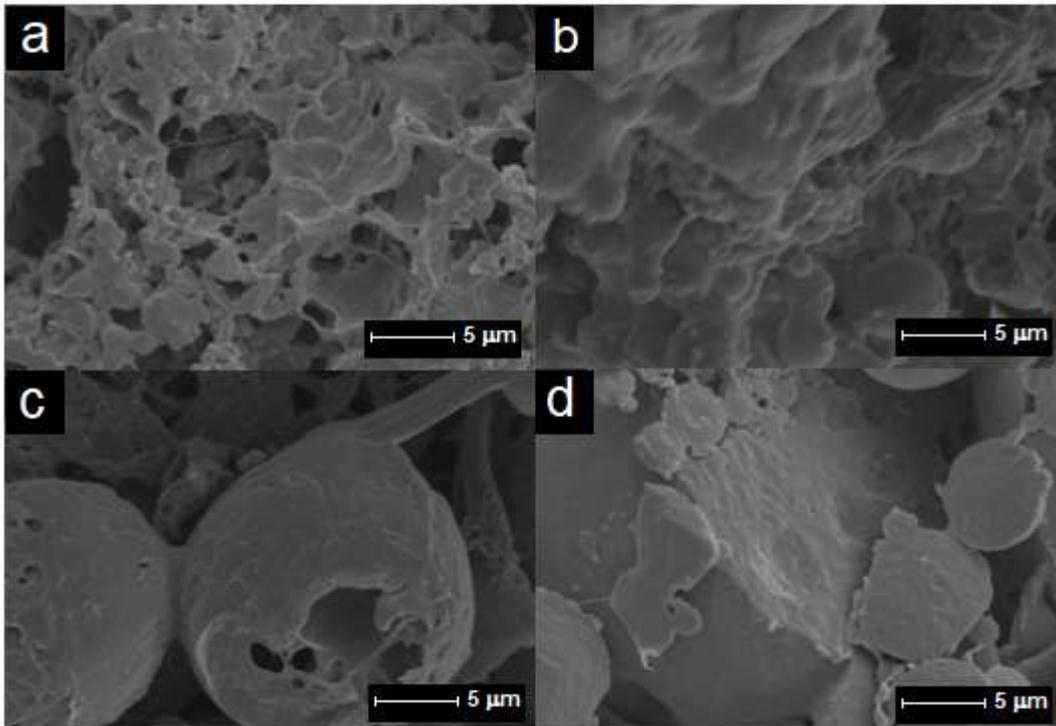


Figure 5.1. Micrografias das Microesferas com aumento de 4000X: a) durante a segunda emulsificação adicionou-se a fase aquosa na emulsão primária; b) quantidade de surfactante maior que a necessária; c) evaporação do solvente com bomba de vácuo; d) menor velocidade de agitação na segunda emulsificação.

## 5.2. Morfologia e tamanho de partícula das microesferas PCL/glifosato

Por meio da técnica de dupla emulsificação e evaporação do solvente foi possível produzir microesferas com o polímero PCL e o glifosato, na forma de esferas sólidas. A faixa de tamanho de partícula, tamanho médio e de desvio padrão (DP) foram medidos e calculados com o software *imageJ*, e seus resultados estão apresentados na Tabela 5.1. As microesferas de PCL (ME), sem glifosato (Figura 5.2a) apresentaram um menor tamanho de partícula, e se mostraram mais homogêneas, uma vez que, apresentaram a menor média de tamanho e o menor desvio padrão foi obtido quando comparada as microesferas obtidas de PCL com glifosato (ME1, ME2 e ME3) (Figura 5.2b, 5.2c e 5.2d).

Tabela 5.1. Tamanho de partícula das microesferas obtidas

Microesferas	Tamanho mínimo (μm)	Tamanho máximo (μm)	Média (μm)	Desvio Padrão (SD)	Coefficiente de variação (CV)
ME	0,8	3,3	1,7	0,5	29,4%
ME1	1,5	5,3	3,5	1,0	28,6%
ME2	2,1	4,9	3,5	0,6	17,1%
ME3	2,0	4,5	2,9	0,6	20,7%

Cada valor é a média de pelo menos 50 medições.

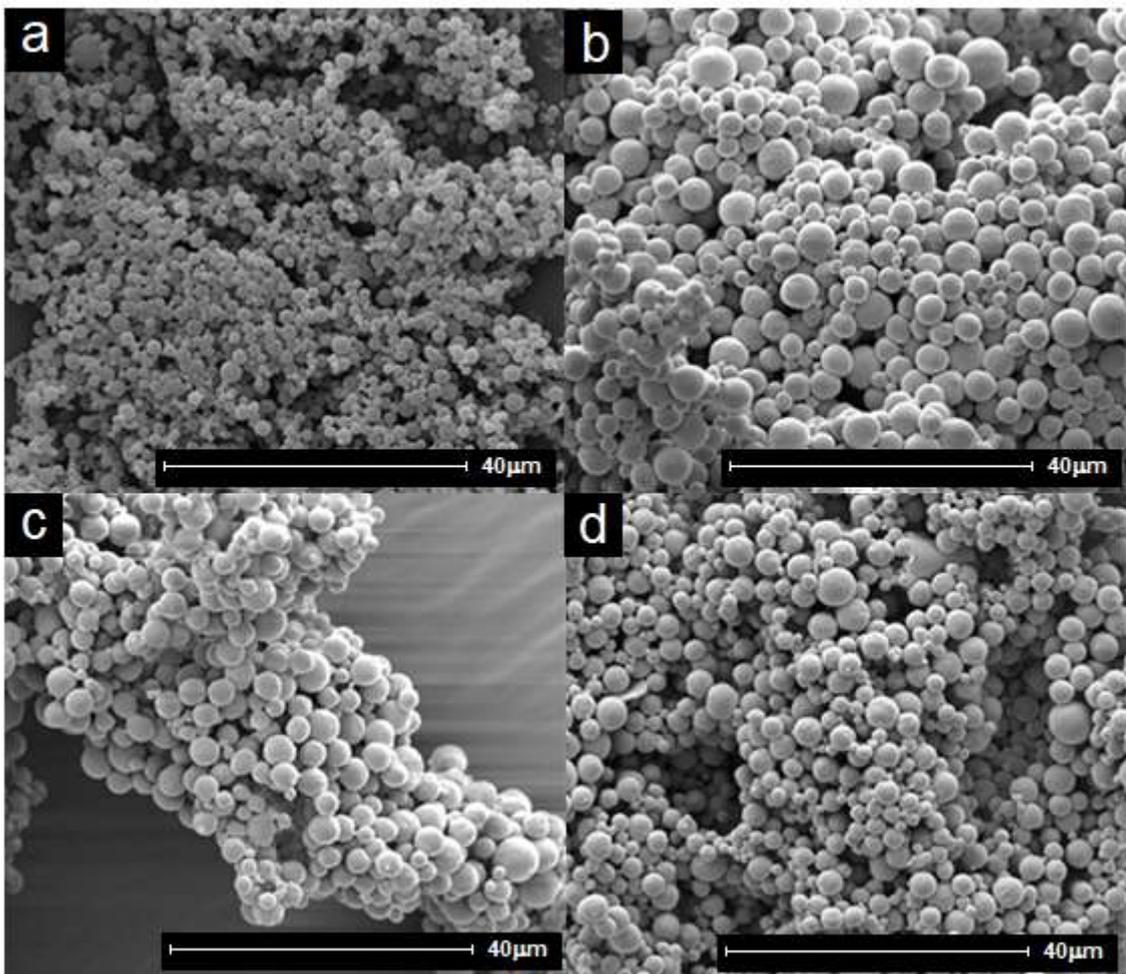


Figura 5.2. Micrografias das Microesferas com aumento de 4000X: a) ME; b) ME1; c) ME2 e d) ME3.

Observa-se que o desvio padrão nas ME (microesferas de PCL puro) tem um peso mais significativo do que nas ME2, uma vez, que o CV foi maior (Tabela 5.1). Ao se determinar o CV foi possível verificar de que forma o desvio padrão está para a média de tamanho de partícula das microesferas obtidas. Com isso, pode-se afirmar que uma distribuição mais homogênea foi obtida nos sistemas ME2 e ME3, pois ao se interpretar estes valores, em ambas, os desvios relativamente à média se apresentaram menores que 20% do valor desta. Portanto, as percentagens de CV que mostram o peso do desvio padrão sobre a distribuição se mostraram aceitáveis.

Porém, apesar de apresentarem um maior tamanho médio e um maior desvio padrão, os valores obtidos para as ME1, ME2 e ME3, que caracterizam os sistemas produzidos com glifosato, com diferentes proporções de herbicida, também podem ser considerados micrométricos e homogêneos, em relação ao tamanho de partícula. Estas apresentaram desvios inferiores a 1 (Tabela 5.1). De acordo com o trabalho de Farago e colaboradores (2008) que obteve microesferas de PHBV com um fármaco hidrofílico com uma faixa de tamanho de 5,5 a 26,2  $\mu\text{m}$  a partir da mesma técnica, valores inferiores a 2 são aceitáveis. Desta forma, é possível afirmar que a técnica utilizada para preparação das microesferas, se mostrou reprodutível em relação ao tamanho de partícula independentemente da quantidade de herbicida utilizada na formulação.

Em relação ao tamanho de partícula, pode-se observar através da análise da Tabela 5.1 que o aumento de glifosato na formulação diminuiu o tamanho médio de partícula, fator que corrobora com resultados encontrados na literatura (Farago et al., 2008). Farago e colaboradores (2008) também obtiveram partículas menores para maiores eficiências de incorporação, revelando eficiências de incorporação de 0,9%, 5,2% e 9,8% para partículas de 26,2  $\mu\text{m}$ , 14,3  $\mu\text{m}$  e 10,2  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

### 5.3. Estrutura química das microesferas PCL/glifosato

A técnica de infravermelho possibilitou analisar a presença do glifosato incorporado na matriz de PCL comparando com os espectros das microesferas de PCL puro (ME) e do glifosato puro (Figura 5.3).

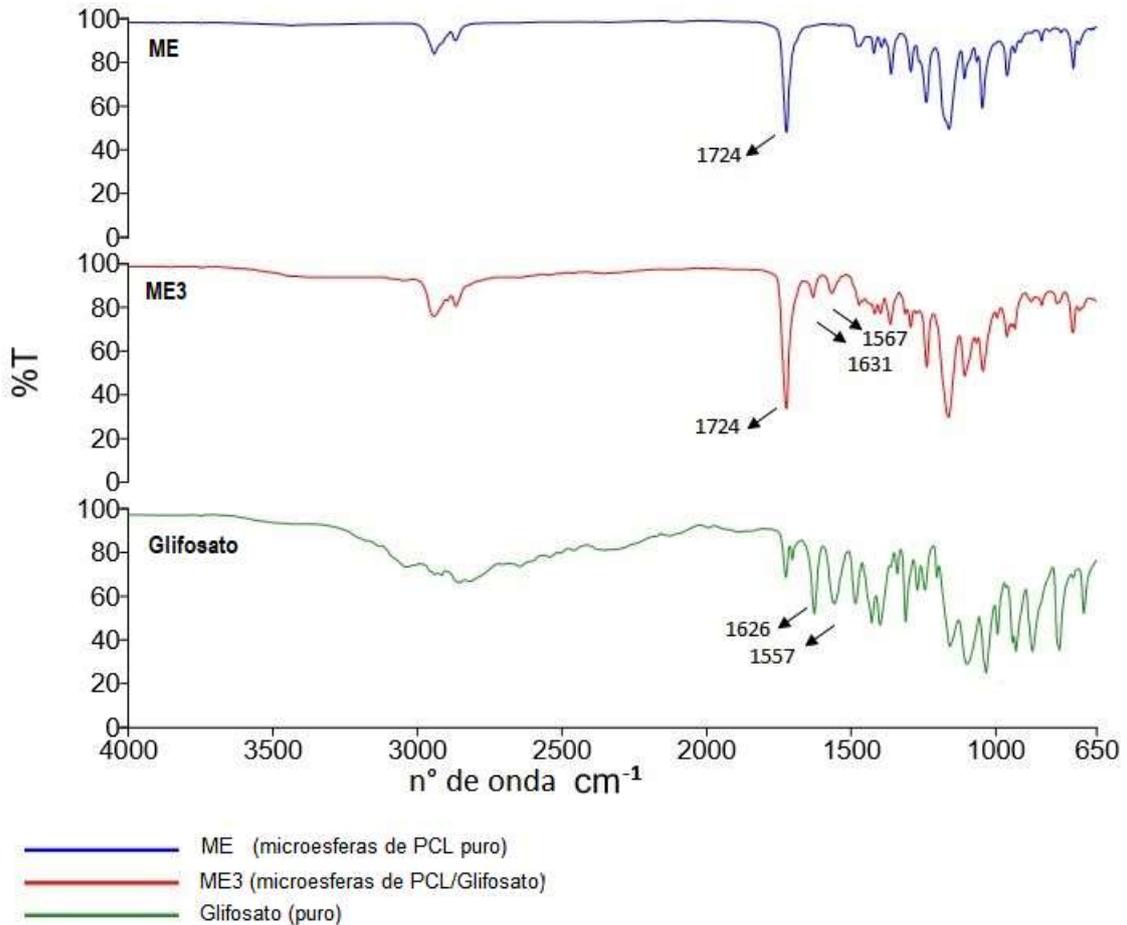


Figura 5.3. Espectros de FTIR das microesferas de PCL puro (ME), das microesferas de PCL/Glifosato (ME3) e do Glifosato puro no modo transmissão.

No espectro de infravermelho das microesferas ME3 (Figura 5.3) observou-se bandas de absorção na região de 2944 e 2867  $\text{cm}^{-1}$  características da ligação C-H de metileno ( $\text{CH}_2$ ), e ainda, devido ao estiramento do grupo carbonila ( $\text{C}=\text{O}$ ) em 1724  $\text{cm}^{-1}$  e ao estiramento da ligação C-O em 1237 e 1163  $\text{cm}^{-1}$  (Cunha, 2012; Mohamed, Gordon, Biresaw, 2007; Ortega-Toro et al., 2015; Pavia et al., 2012;

Silverstein et al., 2012; Giacomelli, 2005; Roa et al., 2010). A presença de bandas de absorção características do grupo éster, uma vez que o PCL é um poliéster alifático biodegradável, mostra que as microesferas obtidas foram efetivamente formadas pelo polímero (Tabela 5.2). No que diz respeito ao espectro referente as microesferas obtidas apenas com PCL (ME), basicamente as mesmas bandas características foram observadas, uma vez que estas apresentaram as bandas características do polímero (espectro semelhante ao do PCL puro, não apresentado). Entretanto, as bandas associadas ao glifosato que serão descritas na sequência não aparecem.

Tabela 5.2. Principais bandas do PCL puro e das microesferas de PCL com Glifosato incorporado.

Tipo de Interação	Microesferas de PCL Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Glifosato Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Microesferas PCL/Glifosato Número de onda (cm <sup>-1</sup> )
Estiramento CH <sub>2</sub>	2942, 2869	n.d.	2944,2867
Estiramento C=O	1724	1725	1724
Estiramento C=O	n.d.	1626	1631*
Deformação N-H (amina II)	n.d.	1557	1567*
Estiramento C-O	1239, 1160	1270, 1243	1237, 1163
Estiramento PO <sub>3</sub> (fosfonato)	n.d.	1098	n.d.
Deformação CH <sub>2</sub> - angular	1107	1484, 1428	1106
Deformação CH <sub>2</sub> - <i>rocking</i>	730	n.d.	731

n.d. não detectada; \*bandas observadas no espectro do glifosato.

No espectro de infravermelho do glifosato puro (ácido de N-fosfonometil glicina) (Figura 5.3), observa-se as bandas características dos grupos funcionais carboxila (ácido carboxílico), amina e fosfonato (Yamada, Castro, 2007). Observa-se claramente uma banda devido ao estiramento do grupo carboxila (C=O) de aproximadamente 1725 cm<sup>-1</sup>, duas bandas características de absorção referentes ao estiramento (C=O) em 1626 cm<sup>-1</sup> e de deformação (N-H) em 1557 cm<sup>-1</sup> (amina II), sendo que, estas bandas aparecem em 1631 e 1567 cm<sup>-1</sup>, no espectro de infravermelho das microesferas (ME3), o que evidencia a presença de glifosato nas

mesmas. E ainda, exibe deformação angular (CH<sub>2</sub>) em 1484 e 1428 cm<sup>-1</sup> e aparecem duas bandas de deformação axial, devido ao acoplamento da deformação angular no plano da ligação O-H e a deformação axial de C-O de ácido carboxílico em 1270 e 1243 cm<sup>-1</sup>. A banda em 1098 cm<sup>-1</sup>, por sua vez, é aparentemente formada pela contribuição de diferentes funções químicas, estiramento (PO<sub>2</sub>) ou estiramento (P-OH) de ésteres de fosfato, os quais estão presentes em quantidades significativas no herbicida (Yamada, Castro, 2007; Giacomelli, 2005).

Podem ocorrer variações pequenas (5 a 10 cm<sup>-1</sup>) nas bandas de absorção, como as apresentadas no espectro das microesferas de PCL com glifosato, pois se acredita que o PCL interage com o glifosato, fato evidenciado pelo deslocamento das bandas características C=O em 1626 cm<sup>-1</sup> e de N-H em 1557 cm<sup>-1</sup> (Figura 5.3 e Tabela 5.2), que foi percebido através da análise e comparação dos espectros do glifosato puro e das microesferas (ME3). Esta diferença é uma forte evidência da interação entre o PCL e o glifosato nas microesferas formadas. A forte interação entre o glifosato e o PCL indica que as microesferas formadas de PCL não encapsularam simplesmente o herbicida, mas que muito provavelmente existe uma interação dos mesmos, ou ainda glifosato presente na superfície das mesmas (Mohamed, Gordon, Biresaw, 2007; Tang, Cheng, Ma, 2006). Os espectros de infravermelho das ME1 e ME2 mostraram-se semelhantes ao das ME (sem glifosato) e do polímero puro, provavelmente por apresentarem uma menor concentração de glifosato incorporado, não sendo detectadas as bandas características do herbicida por esta técnica.

#### **5.4. Eficiência de Incorporação do Glifosato nas Microesferas**

A avaliação da eficiência de incorporação (EI) do glifosato nas microesferas foi determinada de três modos diferentes: determinação espectrofotométrica de glifosato, determinação por termogravimetria e por análise elementar. Na determinação espectrofotométrica a partir da construção de uma curva analítica a

quantidade de glifosato incorporado foi obtida através da diferença entre a quantidade livre (não incorporada) e quantidade utilizada na formulação, e tem seus resultados apresentados na seção 5.4.1. Os resultados por termogravimetria, bem como por análise elementar estão apresentados na seção 5.4.2. A partir da termogravimetria os resultados foram obtidos através da comparação dos termogramas das microesferas e do polímero puro e na análise elementar utilizando a quantidade de nitrogênio presente nas microesferas.

#### 5.4.1. Determinação espectrofotométrica do glifosato e avaliação da eficiência de incorporação

A Tabela 5.3 apresenta as eficiências de incorporação obtidas para as diferentes formulações e o respectivo tamanho de partícula. Pode-se observar que o sistema com maior quantidade de glifosato em sua formulação (ME3) obteve uma maior eficiência de incorporação de 30,9%, e que o aumento de glifosato nas formulações acarretou em valores maiores de eficiência de incorporação do herbicida nas microesferas formadas de polímero.

Tabela 5.3. Determinação da eficiência de incorporação pelo método da ninidrina.

Material	Glifosato teórico <sup>1</sup> (%)	EI (%)	glifosato incorporado <sup>2</sup> (%)	Diâmetro ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ SD
PCL	-	-	-	1,7 $\pm$ 0,5
ME1	10	5,4	0,5	3,5 $\pm$ 1,0
ME2	20	14,6	2,9	3,5 $\pm$ 0,6
ME3	30	30,9	9,3	2,9 $\pm$ 0,6

<sup>1</sup>quantidade % de glifosato (teórico) em relação a massa de polímero na formulação; <sup>2</sup>quantidade % de glifosato em relação a massa de polímero incorporado nas microesferas. (Cada valor é a média de 3 amostras).

A partir da técnica utilizada para quantificação do glifosato incorporado, bem como, eficiência de incorporação do mesmo nas microesferas, pode-se afirmar que apesar da eficiência de incorporação de 30,9 % ser inferior a encontrada na literatura (Kulkamp et al., 2009), para o PCL com outro princípio ativo (77 a 90%), que esta se mostrou maior para formulações contendo concentrações mais elevadas de agente ativo, corroborando com os resultados encontrados na literatura (Kulkamp et al., 2009). A taxa de incorporação é afetada pela quantidade de herbicida adicionada na formulação, assim como, em estudos realizados com poli( $\epsilon$ -caprolactona), ou outros polímeros, que também demonstraram um aumento percentual de incorporação em micro e nanopartículas com o aumento da concentração de princípio ativo inicialmente adicionado as formulações (Külkamp et al., 2009).

Quando comparada a EI obtida no presente trabalho, com estudos que encapsularam herbicidas tiazídicos em nanocápsulas de PCL, os valores também estão abaixo, segundo Grillo e colaboradores (2012) eficiências em torno de 85% foram obtidas. Porém ao se comparar com trabalhos que utilizaram a técnica de emulsão seguida de evaporação do solvente, os valores alcançados para EI estão acima do esperado para esta técnica, uma vez que estudos apontam ter obtido valores máximos de 9,8% de EE para micropartículas de PHBV, e consideraram este valor como sendo apropriado para micropartículas poliméricas (Farago et al., 2008).

Considerando que no presente trabalho foram encontradas eficiências de incorporação de 5,4 a 30,9%, pode-se afirmar que se obteve valores consideráveis de EI para o glifosato em microesferas de PCL. E comparando a quantidade de glifosato incorporado nas ME3 em relação a massa de polímero, de 9,3%, este também foi superior ao valor encontrado na literatura (7,9%) para incorporação deste herbicida em micro e nanoesferas de sílica (Liu et al., 2012).

Comparando os resultados apresentados na tabela 5.3 com os da tabela 5.1, observa-se que as microesferas ME1 e ME2 apresentaram um tamanho médio de 3,5  $\mu\text{m}$  e EI de 5,4 e 14,6 %, respectivamente. Entretanto, as ME3 apresentaram um menor tamanho médio de 2,9  $\mu\text{m}$  e uma maior EI de 30,9 %. Portanto, com o aumento da EI do glifosato houve uma diminuição no tamanho médio das microesferas formadas, o que se assemelha aos resultados encontrados na literatura mencionados anteriormente (Farago et al., 2008).

O procedimento de lavagem para remoção do agente tensoativo residual, PVA, utilizado para a formação das microesferas também foi avaliado, com a finalidade de investigar se este procedimento não removia o herbicida, ocasionando uma redução na eficiência de incorporação das microesferas. A partir da curva analítica obtida, e a partir dos testes realizados em triplicata no resíduo de lavagem, pós-centrifugação, pode-se afirmar que tal procedimento não interferiu na EI, pois não foi identificada a presença de glifosato na água de lavagem das microesferas.

#### **5.4.2. Análises termogravimétrica e elementar das microesferas e avaliação da eficiência de incorporação**

O Apêndice A mostra a curva de decomposição térmica (TG e DTG) obtida para o PCL puro. A degradação térmica acontece em um processo único de perda de massa, o qual se inicia em aproximadamente 346 °C e atinge a máxima velocidade de degradação em 443 °C, valores próximos aos encontrados na literatura (Mohamed, Gordon, Biresaw, 2007). O resíduo final em 492 °C corresponde a cerca de 1,6% da massa inicial da amostra. A degradação térmica das microesferas (ME3) (Apêndice B) se inicia em aproximadamente 275 °C, ou seja, em uma temperatura aproximadamente 71 °C mais baixa do que a do polímero puro, corroborando com a literatura (Mainardes, Gremião, Evangelista, 2006). As micropartículas, estão mais expostas à degradação térmica, devido a sua dimensão micrométrica, que faz com que a área superficial de troca térmica seja maior, em

relação ao polímero. Logo, as microesferas de PCL/Glifosato apresentaram menor estabilidade térmica do que o polímero puro e com isso, degradam mais facilmente (Mainardes, Gremião, Evangelista, 2006). Para as microesferas ME3, não foi observado o aparecimento do evento térmico de decomposição característico do glifosato. Este comportamento térmico sugere que ocorreu uma interação do herbicida com o polímero, conforme literatura (Mendes, 2011).

A eficiência de incorporação do herbicida nas microesferas poliméricas formadas de PCL foi determinada através da perda de massa a 600 °C e realizando uma comparação com a perda de massa encontrada para o polímero puro conforme literatura (Tang, Cheng, Ma, 2006). A diferença encontrada (Figura 5.4) sugere que a partícula (ME3) é constituída de aproximadamente 9,1% de glifosato. Considerando que durante a reação de formação das mesmas adicionou-se uma concentração inicial de 30% de glifosato em relação à massa de polímero, pode-se calcular que a eficiência de incorporação de glifosato nas microesferas ME3 é de 30,3%. Para as ME1 e ME2, os resultados apresentados a partir da análise termogravimétrica (Apêndice C e D) revelaram que estas são constituídas de 6,7% e de 7,6% de glifosato, respectivamente, com eficiências de incorporação de 67% e de 38%, resultados que ficam distantes dos encontrados a partir da análise espectrofotométrica.

Considerando os resultados encontrados no presente trabalho e comparando a quantidade de glifosato incorporado nas ME3 em relação a massa de polímero, de 9,1 %, com os valores encontrados na literatura, de 7,9% para incorporação deste herbicida (Liu et al., 2012) pode-se afirmar, que obteve-se uma taxa considerável de associação do glifosato com o PCL.

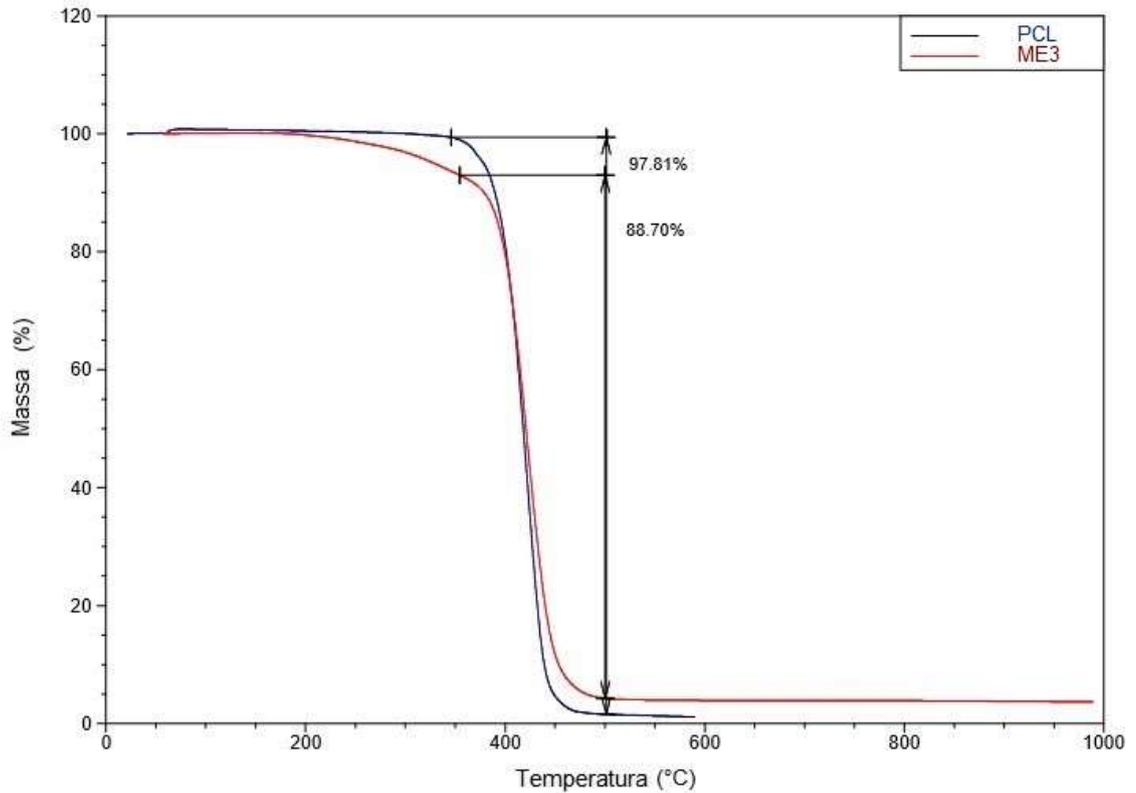


Figura 5.4. Termogramas do PCL puro e das ME3.

Para estimar a quantidade de glifosato incorporado na matriz polimérica de PCL, além da análise termogravimétrica das microesferas, foram realizadas análises elementares do PCL puro (C = 61,43%; H = 8,46% e N = 0,02%) e das ME2 (C = 61,55%; H = 8,27% e N = 0,35%) para confirmar os dados obtidos por TGA, conforme literatura (Monteiro et al., 2017). A incorporação de glifosato foi estimada em aproximadamente 4,0% a partir da análise elementar do nitrogênio, esse dado é próximo do valor encontrado na análise espectrofotométrica (2,9%) e comparável ao encontrado por TGA (7,6%), levando a um valor para eficiência de incorporação de 19,9 % para as ME2.

### 5.5. Propriedades Térmicas das Microesferas de PCL/Glifosato

Comparando a temperatura de transição vítrea do PCL puro de -64 °C (Apêndice E), com a  $T_g$  das microesferas (Apêndice I) que apresentaram uma maior

carga de glifosato incorporada (ME3) conforme resultados apresentados na seção 5.4.1 e 5.4.2, observou-se uma redução de 10 °C ( $T_g = -74$  °C). Em trabalho de Farago e colaboradores (2008), também se verificou uma redução na temperatura de transição vítrea quando comparadas as microesferas obtidas com o polímero puro. Além disso, quando uma baixa quantidade de glifosato foi carregada (ME1) (Apêndice G), não foram observadas alterações no perfil DSC, comparando-se com os dados térmicos para o PCL, este resultado também está de acordo com a literatura (Farago et al., 2008).

Conforme a Tabela 5.4, que apresenta os resultados da análise térmica do PCL puro (Apêndice E), das microesferas de PCL (ME) (Apêndice F) e das microesferas de PCL com glifosato (ME1, ME2 e ME3), obtidos por DSC (Apêndice G, H e I), pode-se afirmar que a temperatura de cristalização das microesferas (ME3) em relação ao polímero puro apresentou um aumento de 7 °C e a de fusão uma redução de 5 °C, sendo a entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ) das microesferas (ME3) maior do que para o PCL. Esses valores de  $\Delta H_m$  tem relação com a cristalinidade do polímero, quanto mais altos mais cristalino será o polímero. Sendo que, a porcentagem de cristalinidade calculada para o PCL puro corrobora para os dados encontrados na literatura (Rosa, Penteado, Calil, 2000; Mohamed, Gordon, Biresaw, 2007).

Observa-se que a temperatura de fusão do PCL diminui com a adição de glifosato (Tabela 5.4). Isto é um fator importante, uma vez que para polímeros semicristalinos a diminuição do ponto de fusão é um método muito utilizado para se estudar a miscibilidade entre os componentes do polímero, pois, uma vez que ocorra alguma miscibilidade entre os componentes do polímero há uma diminuição da temperatura de fusão no equilíbrio. Em relação à entalpia de fusão, pode-se notar (Tabela 5.4) que há indícios de que esta aumenta com a adição de glifosato (ME1, ME2 e ME3) e, conseqüente, a cristalinidade que também apresenta o mesmo comportamento. Sugere-se que este efeito esteja relacionado ao aumento

da compatibilidade do PCL com o glifosato, avaliação realizada com base na literatura (Borghesi et al., 2016). No entanto, os dados obtidos não são suficientes para suportar essa afirmação, pois não foram feitas repetições do DSC, a fim de se avaliar se este comportamento se repetiria.

Tabela 5.4. Propriedades térmicas e grau de cristalinidade

Material	T <sub>c</sub> (°C)	T <sub>g</sub> (°C)	T <sub>m</sub> (°C)	ΔH <sub>m</sub> (J/g)	X <sub>c</sub> (%)
PCL	20,18	-64,20	55,14	43,85	32,24
ME	25,53	-63,60	54,38	43,22	31,78
ME1	17,83	-64,12	54,94	46,23	34,16
ME2	25,43	-64,05	55,89	50,12	37,95
ME3	27,11	-74,41	50,20	53,24	43,16

As microesferas (ME2) foram caracterizadas pela técnica de difração de raios-X (DRX) para verificar a cristalinidade das mesmas. As curvas de DRX (Figura 5.5) apresentam a contribuição de duas fases, cristalina e amorfa. Determinou-se o ajuste das curvas lauresianas geradas à base dos picos de difração, de forma a estimar o espalhamento amorfo e cristalino. Estes ajustes foram realizados no *software Origin 6.0.*, revelando que a curva Lauresiana modela de modo aceitável os dados, uma vez que conferiu valores de 0,95 a 0,99 para o coeficiente de correlação. Os resultados obtidos para o PCL e para as ME2 foram de 38 e 33%, respectivamente, o que discorda da afirmação de que a cristalinidade tenha aumentado, pois a partir dessa técnica a mesma diminuiu com a adição de glifosato. Contudo, fica evidente que os valores obtidos por ambas as técnicas são comparáveis entre si, o que concorda com informações encontradas na literatura (Balu et al., 2011; Borjigin et al., 2013).

Pequenas diferenças nos resultados podem ser justificadas pelas diferenças no tratamento da amostra nas técnicas utilizadas (DSC e DRX). A quantificação da

cristalinidade pelo método óptico baseia-se na reflexão do raio X na superfície da amostra e a sua intensidade é captada pelo receptor, enquanto no DSC é o calor total necessário para a fusão completa dos cristaliticos que é quantificada, necessitando a amostra ficar sob efeito de temperatura. Estudos consideram que a técnica de DSC apresenta uma estimativa mais precisa da cristalinidade do material (Imane et al., 2015).

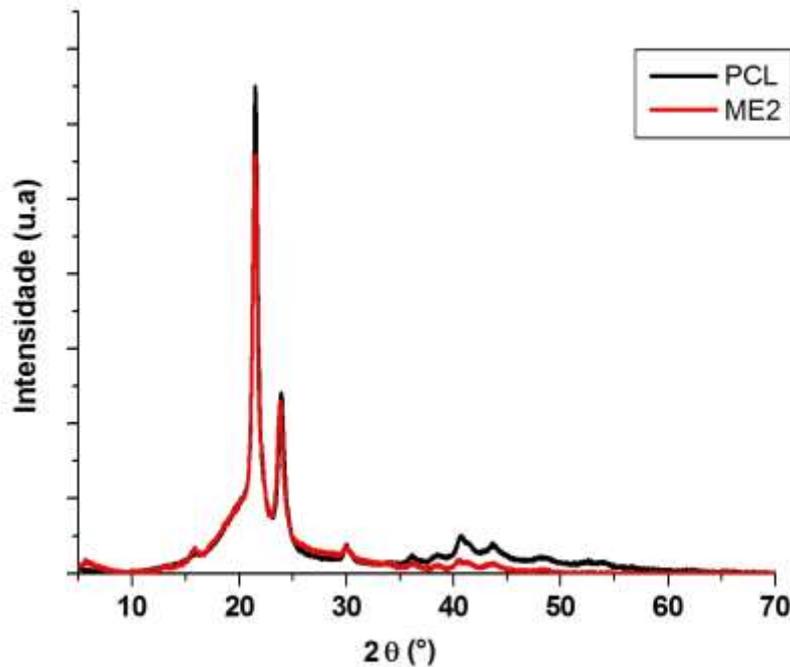


Figura 5.5. DRX do PCL puro e das ME2.

### 5.6. Cinética de liberação do glifosato das microesferas em meio aquoso

Na avaliação do perfil de liberação do glifosato das microesferas, observou-se que transcorridos 360 minutos aproximadamente 17% do herbicida foi liberado para o meio (Figura 5.6), solução de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M em temperatura ambiente sendo necessário um maior tempo de monitoramento para garantir a taxa de liberação de glifosato tenha sido estabilizada no meio testado. Em testes realizados com glifosato livre em solução de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M em um período total de 10 horas, com intervalos 10 minutos na primeira hora, e de 1 h nas seguintes, confirmou-se não haver

interação do herbicida com o meio, uma vez que os valores obtidos foram próximos da concentração inicial de  $5 \mu\text{m}/\text{mL}$  testada (valor manteve-se constante).

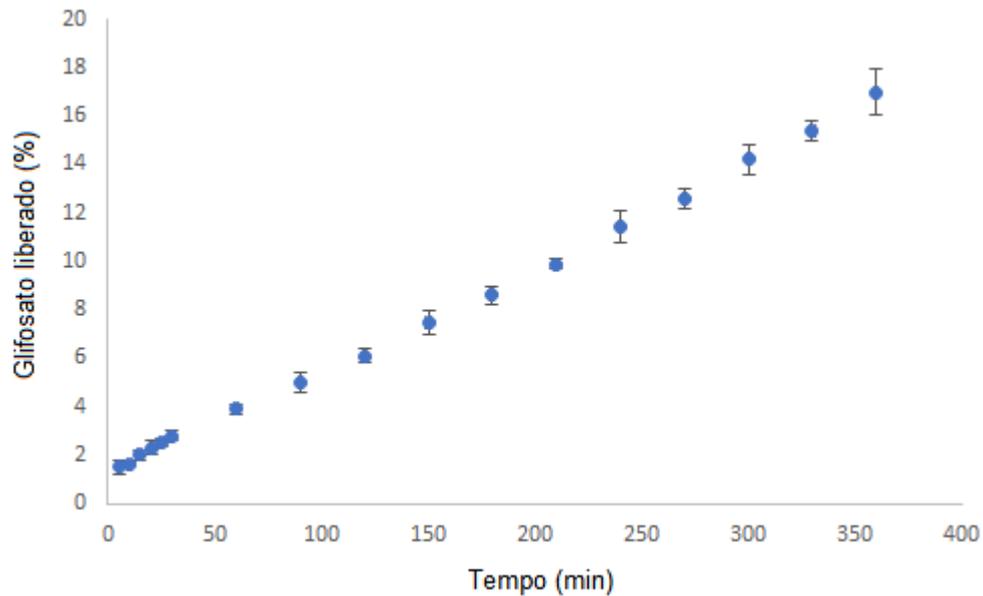


Figura 5.6. Liberação cumulativa de glifosato das microesferas de PCL (n=3).

Contudo, o resultado obtido mostrou-se semelhante ao encontrado por Silva e colaboradores (2010b) onde 20% do herbicida clomazone foi liberado em 240 minutos de ensaio de liberação. E em trabalho publicado por Grillo e colaboradores (2012), as nanocápsulas poliméricas de PCL com simazina liberaram 25% do herbicida após 5 dias de experimento, a pequena quantidade liberada foi atribuída a hidrofobia da simazina, ou ainda, a forte interação com o PCL.

Com o objetivo de caracterizar o fenômeno de transporte de liberação do glifosato das microesferas, utilizou-se o modelo teórico descrito por Korsmeyer-Peppas para liberação de agentes ativos de matriz polimérica, conforme literatura (Melo et al., 2010). Através da linearização da Equação (4.4) do modelo de Korsmeyer-Peppas, obtêm-se a Equação (5.1):

$$\ln\left(\frac{M_t}{M_\infty}\right) = \ln k + n \ln t \quad (5.1)$$

A partir da construção do gráfico de  $\ln M_t/M_\infty$  em função de  $\ln t$  (Figura 5.7), que fornece o expoente de liberação ( $n$ ) e a constante de liberação ( $k$ ), sendo que  $n$  é o coeficiente angular da reta e  $\ln k$  o coeficiente linear, obteve-se um  $R^2 = 0,996$ ,  $k = 194,8 \text{ min}^{-n}$  (constante da taxa de liberação),  $n = 0,50$  (expoente de liberação), para um primeiro momento. E em um segundo momento, obteve-se um  $R^2 = 0,992$ ,  $k = 859,2 \text{ min}^{-n}$  (constante da taxa de liberação) e  $n = 0,84$  (expoente de liberação). A significância estatística obtida está de acordo com a literatura, que utilizou o mesmo modelo para liberação do herbicida atrazina em solução de  $\text{CaCl}_2$  (Ávila et al., 2009). A partir deste estudo pode-se constatar que o glifosato associado as microesferas de PCL é liberado pelo transporte anômalo não governado pela difusão de Fick, que ocorre em dois momentos, e este fenômeno pode ser bem representado pelas Equações 5.2 e 5.3, conforme literatura (Melo et al., 2010):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 194,8t^{0,50} \quad (5.2)$$

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 859,2t^{0,84} \quad (5.3)$$

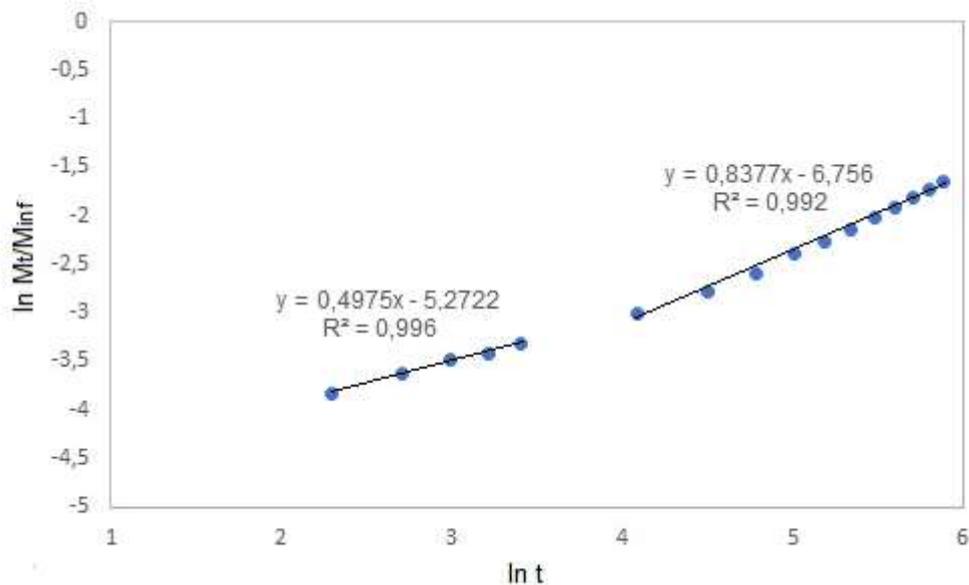


Figura 5.7. Gráfico de  $\ln M_t/M_{inf}$  em função de  $\ln t$  (Modelo de Korsmeyer-Peppas).

Este resultado torna-se interessante, uma vez que esta alteração no perfil de liberação pode acarretar em diversos fatores positivos na utilização deste herbicida, dentre eles destacam-se: a redução da quantidade de substância química necessária para o controle de pragas; diminuição do risco de contaminação ambiental; redução da quantidade de energia gasta (uma vez que se reduz o número de aplicações necessárias comparadas às formulações convencionais), aumento na segurança das pessoas responsáveis pela aplicação do produto no campo, além de outros.

Portanto, a hipótese inicial do presente estudo, está confirmada, tendo em consideração os resultados encontrados, bem como as correlações, uma vez que a avaliação da liberação do glifosato pode ser bem representada pela equação descrita por Korsmeyer-Peppas para liberação de princípios ativos de sistemas poliméricos, revelando um resultado semelhante aos encontrados na literatura para outros herbicidas (Silva et al., 2010b; Grillo et al., 2012). Em trabalho de Grillo e colaboradores (2012), a análise do perfil de liberação para nanocápsulas de herbicidas triazínicos utilizando o modelo de Korsmeyer Peppas, mostrou que o herbicida é liberado destas por um processo de transporte governado por processos

cinéticos não Fickiniano, uma vez que apresentaram um expoente de liberação de 0,87 para a simazina e de 0,99 para a ametrina. Silva e colaboradores (2010b) estudaram nanopartículas de alginato contendo clomazone, obtidas pela técnica de dupla emulsificação seguida de evaporação do solvente, a análise do perfil de liberação utilizando o modelo de Korsmeyer-Peppas mostrou que o clomazone é liberado destas por um processo de transporte governado por processos cinéticos não Fickiniano.

### **5.7. Eficiência agrônômica das microesferas em semestres de arroz**

O comportamento das microesferas de PCL/Glifosato, frente ao herbicida livre, foi avaliado através de bioensaios, para verificar se o glifosato estava sendo liberado das microesferas, e ainda, se apresenta um comportamento diferente do livre (controle negativo), sendo que, a água foi utilizada como controle positivo no bioensaio. Três variedades de sementes de arroz foram submetidas ao teste de germinação, sendo duas mutantes, tecnologia Clearfield (CL), PUITA INTA CL e GURI INTA CL, e uma convencional (IRGA 424). As alterações no comportamento de diferentes cultivares de arroz convencional e mutante foram estudadas em substrato umedecido com soluções de microesferas com glifosato incorporado e de glifosato livre, ambas com a concentração de 0,03% e.a. O primeiro bioensaio foi realizado em agosto e o segundo em outubro de 2016. Considerando como plântula normal apenas as plântulas que apresentaram raiz principal, raízes seminais e caule, conforme descrito no item 4.6 da metodologia.

Para a aplicação das Tabelas de Tolerância (Anexo A e B) é importante que os testes tenham sido executados de acordo com as especificações prescritas pela RAS. Para comparar resultados entre testes, calcula-se a média dos resultados e localiza-se na tabela, na coluna correspondente, o valor dessa média. O valor da tolerância permitida é obtido na linha correspondente à média e na coluna referente à probabilidade, número de testes ou de repetições utilizado. Se a diferença entre

os resultados comparados não exceder a tolerância indicada na tabela, a variação é considerada não significativa e aceitável. Quando o objetivo é a comparação do resultado de uma determinação com um padrão estabelecido, localiza-se o valor desse padrão na primeira coluna da tabela. O valor da tolerância permitida é obtido na mesma linha e na coluna adequada para o caso, conforme a probabilidade, tipo de semente e número de sementes utilizado. Se a diferença entre o resultado comparado e o padrão não exceder a tolerância indicada na tabela, a variação é considerada não significativa e o resultado é considerado dentro do padrão. Nas comparações entre resultados de testes ou de resultados com padrões estabelecidos, recomenda-se 5% de probabilidade. Outras probabilidades menores que 5% (1,0 ou 2,5%) são apresentadas nas tabelas de tolerância para o teste de germinação (Brasil, 2009).

Para a cultivar IRGA 424 (convencional) obteve-se 57% e 49% de germinação, nos bioensaios 1 e 2 (realizados apenas com água), respectivamente, resultando em uma média de germinação de 53%, com uma diferença entre os resultados de 8%, no Anexo A (seção 4.6) (Coluna A), a média encontra-se no intervalo 51 – 59, com tolerância 11 (Coluna C). Como a diferença (8) é inferior à tolerância (11), os resultados são compatíveis. Logo, o teste é válido, pois mostrou-se reprodutível de acordo com a tolerância permitida a nível de 5% de probabilidade, de acordo com a RAS (Brasil, 2009).

Para a cultivar PUITA INTA CL (mutante) obteve-se 32% e 59% de germinação, nos bioensaios 1 e 2 (realizados apenas com água), respectivamente, resultando em uma média de germinação de 46%, com uma diferença entre os resultados de 27%, no Anexo A (Coluna A), a média encontra-se no intervalo 42 – 50, com tolerância 11 (Coluna C). Como a diferença (27) é superior à tolerância (11), os resultados não são compatíveis. Logo, o teste não é válido, pois não está de acordo com a tolerância permitida a nível de 5% de probabilidade.

Para a cultivar GURI INTA CL (mutante) obteve-se 63% e 71% de germinação, nos bioensaios 1 e 2 (realizados apenas com água), respectivamente, resultando em uma média de germinação de 67%, com uma diferença entre os resultados de 8%, no Anexo A (Coluna A), a média encontra-se no intervalo 60 – 69, com tolerância 10 (Coluna C). Como a diferença (8) é inferior à tolerância (10), os resultados são compatíveis. Logo, o teste é válido, pois mostrou-se reprodutível de acordo com a tolerância permitida a nível de 5% de probabilidade.

Com os resultados apresentados, para as diferentes cultivares, realizados como controle positivo (apenas com água) pode-se conferir um padrão para caracterizar uma plântula normal, para as cultivares IRGA e GURI (Tabela 5.5). Uma vez que os bioensaios realizados para estas cultivares se mostraram compatíveis a nível de 5% de probabilidade, de acordo com a RAS (Brasil, 2009). Para cultivar PUITA INTA CL não foi possível conferir um padrão. Os resultados para esta variedade não foram compatíveis, uma vez que a análise estatística apontou o teste como não válido.

Tabela 5.5. Características de uma plântula normal para as cultivares IRGA e GURI

Cultivares	Plântula Normal	Tamanho médio (cm)	DP	CV (%)
IRGA 424	Raiz principal	6,99	0,34	4,86
	Raízes seminais	1,64	0,17	10,35
	Caule	4,84	0,74	15,19
GURI INTA CL	Raiz principal	7,29	0,95	13,00
	Raízes seminais	2,62	0,23	8,90
	Caule	6,43	0,69	10,78

Cada valor é a média de duas repetições de 100 sementes.

CL= Clearfield, DP=Desvio Padrão e CV= Coeficiente de Variação.

O padrão de tamanho médio determinado a partir dos bioensaios, para a raiz principal, raízes seminais e caule de uma plântula normal das cultivares IRGA e GURI, apresentou conforme análise estatística, desvios padrões inferiores a 1, e coeficientes de variação inferiores a 15,19 % o que caracteriza as amostras como

homogêneas, e os valores considerados, padrões aceitáveis (Barbieri, et al., 2010; Mendonça et al., 2014).

No bioensaio realizado em substrato umedecido com a solução de microesferas e de glifosato com a concentração de 0,03%, não se obteve plântulas normais para as diferentes variedades de sementes testadas. Porém, pode-se observar que no ensaio realizado com o glifosato livre, após 14 dias não foram formados nenhum dos três sistemas principais analisados (raiz principal, raízes seminais e caule), nas três variedades estudadas.

Já no teste realizado com a solução de microesferas, apesar de também não resultar em nenhuma plântula normal, as três variedades de sementes apresentaram uma formação inicial de raiz principal, possivelmente formação da radícula, que muito provavelmente foi inibida com o passar do tempo do ensaio, uma vez que o tamanho máximo de raiz obtido para variedade PUITA foi de 2 cm. A inibição da formação do sistema radicular com a ausência de raízes seminais e inibição do desenvolvimento da raiz principal deve-se principalmente a liberação do glifosato das microesferas após transcorrido um período inicial do bioensaio.

O local de aplicação ideal deste herbicida, o glifosato, são as folhas e partes aéreas das plantas, conforme literatura, e os sintomas aparecem de 5 a 10 dias após a aplicação, que deve ser realizada na planta em condições de transporte (Oliveira Jr et al., 2011). Para a IRGA 424 não houve formação de caule (sistema aéreo da plântula) lembrando que esta é a variedade convencional, ou seja, não modificada, não tolerante a herbicida, e para a variedade PUITA INTA CL (mutante) da semente de arroz, que é modificada, uma semente mais forte e que suporta condições adversas, houve a formação de 1 caule de 1,5 cm, o que corrobora para a literatura (Oliveira Jr et al., 2011).

Na cultivar GURI INTA CL (mutante), que é a semente de arroz mais forte das três estudadas, sendo considerada tolerante ao herbicida do grupo químico das imidazolinonas, ocorreu a formação de 13 caules de até 2,5 cm, por bioensaio. Este bioensaio foi realizado com uma duplicata de 100 sementes, e como não pode-se dizer que obteve-se plântulas normais, não foi possível aplicar um tratamento matemático nos dados obtidos (Anexo B, seção 4.4), sendo os mesmo qualitativos e passíveis de um novo estudo mais detalhado. A inibição, bem como a ausência de caule, deve-se principalmente a liberação do glifosato das microesferas após transcorrido um período inicial do bioensaio, uma vez que os caules formados não atingiram o valor padrão para duração do teste realizado que deveria ser de aproximadamente 6,43 cm (Tabela 5.5).

Tendo como objetivo avaliar se o herbicida incorporado seria liberado das microesferas, e que neste caso as sementes não apresentariam plântulas normais conforme literatura (Pereira et al., 2009), pode-se afirmar que no período de realização deste bioensaio, 14 dias, o herbicida foi liberado em quantidade suficiente, uma vez que, as espécies testadas não germinaram. Lembrando que todas as espécies testadas são sensíveis ao herbicida incorporado nas microesferas. Contudo, não foi possível avaliar o bioensaio estatisticamente procedendo a análise de variância e o teste de médias de Tukey, em nível de 5 % de probabilidade proposto pela literatura (Pereira et al., 2009).

Uma vez que, o herbicida utilizado (glifosato), não é recomendado para o sistema Clearfield (CL), pois esta tecnologia torna as sementes tolerantes ao herbicida pertencente ao grupo químico das Imidazolinonas (Barbieri et al., 2010), sugere-se realizar testes com soluções de menor dosagem de glifosato livre e incorporado em microesferas observando as concentrações utilizadas para herbicidas do grupo das imidazolinonas (Barbieri et al., 2010). Com a finalidade de avaliar estatisticamente este bioensaio, lembrando que estes foram realizados conforme dosagem ótima obtida na literatura para o glifosato para investigar

sementes de soja convencional e transgênicas (Funguetto et al., 2004; Cunha et al., 2005; Pereira et al., 2009). Mas, pode-se dizer que o glifosato incorporado nas microesferas revelou um comportamento distinto, quando comparado ao herbicida livre, em uma avaliação de eficiência agrônômica preliminar apresentada neste estudo, o que torna a produção de microesferas de glifosato potencialmente aplicável, como uma tecnologia para liberação controlada de herbicidas organofosforados. As microesferas que carregam glifosato serão degradadas com o tempo por serem constituídas por um polímero biodegradável, assim liberando o herbicida aos poucos, sendo mais eficiente e menos tóxica do que o herbicida livre, uma vez que tornará possível utilizar-se uma quantidade menor para se conseguir o mesmo efeito, pois se acredita que o herbicida ficará protegido de intempéries (Souza et al., 2012).

Este estudo fornece subsídios para avaliações posteriores destes sistemas contendo herbicida glifosato em matrizes ambientais, abrindo assim perspectivas do uso de microesferas poliméricas para fins agrícolas, uma vez que estes sistemas podem acarretar em diversos fatores positivos, entre eles, redução da quantidade de substância química necessária para o controle de pragas; diminuição do risco de contaminação ambiental; redução da quantidade de energia gasta (reduz o número de aplicações necessárias comparadas às formulações convencionais); aumento na segurança das pessoas responsáveis pela aplicação do produto no campo, entre outros.

## 6. CONCLUSÕES

Conclui-se que através da técnica de emulsão múltipla e evaporação do solvente foi possível produzir microesferas a partir do polímero PCL com glifosato. Estas apresentaram a forma de esferas sólidas e os tamanhos médios de  $3 \mu\text{m} \pm 0,6 \mu\text{m}$  (ME3). Foi possível incorporar 9,3% de glifosato em relação à massa de polímero nas partículas formadas, uma vez que a EI quantificada utilizando a técnica de UV-vis, revela que foi possível incorporar até 30,9% da quantidade inicial (30%) adicionada durante a reação de formação das microesferas (ME3).

A EI do herbicida nas microesferas de PCL/glifosato também foi determinada através da termogravimetria, revelando que a partícula (ME3) é constituída de aproximadamente 9,1% de glifosato e EI de 30,3%, valor próximo ao encontrado por UVvis. Para as ME1 e ME2, os resultados apresentados a partir do TGA revelam que estas são constituídas de 6,7% e de 7,6% de glifosato, respectivamente, com eficiências de incorporação de 67% e de 38%, resultados distantes dos encontrados a partir da caracterização realizada por Uvvis.

Para estimar a quantidade de glifosato suportada pela matriz polimérica de PCL, também foram realizadas análises elementares do PCL puro e das ME2, com o intuito de confirmar os dados obtidos por TGA. A incorporação de glifosato foi estimada em aproximadamente 4,0%, a partir da análise do nitrogênio, esse dado é próximo do valor encontrado na análise por Uvvis (2,9%) e comparável ao encontrado por TGA (7,6%), acarretando em um valor para EI de 19,9 % (ME2).

A partir das técnicas utilizadas para quantificação do glifosato incorporado (UVvis, TGA e CHN), bem como, EI do mesmo nas microesferas, pode-se afirmar que a taxa de incorporação é afetada pela quantidade de herbicida adicionada na formulação, demonstrando que com o aumento da concentração de glifosato existe um aumento de sua incorporação nas microesferas. Observou-se também, comparando os resultados de tamanho de partícula e EI para as microesferas ME1, ME2 e ME3, que apresentaram um tamanho médio de 3,5  $\mu\text{m}$ , 3,5  $\mu\text{m}$  e 2,9  $\mu\text{m}$  e EI de 5,4%, 14,6 % e 30,9%, respectivamente, que com o aumento da EI do glifosato houve uma diminuição no tamanho médio das microesferas formadas.

A temperatura de transição vítrea do PCL, bem como, a de fusão diminui com a adição de glifosato. Em relação à entalpia de fusão, pode-se notar que há indícios de que esta aumenta com a adição de glifosato (ME1, ME2 e ME3), consequentemente a cristalinidade também apresenta o mesmo comportamento, e ainda, valores semelhantes para a cristalinidade foram obtidos por DRX.

O comportamento das microesferas de PCL/Glifosato frente ao herbicida livre foi avaliado através de bioensaios, evidenciando a liberação do herbicida no período de sua duração (14 dias). Pode-se dizer que o glifosato incorporado nas microesferas revelou um comportamento distinto, quando comparado ao herbicida livre, em uma avaliação de eficiência agrônômica realizada neste estudo, o que torna a produção de microesferas de glifosato potencialmente aplicável, como uma tecnologia para liberação controlada de herbicidas organofosforados.

Na avaliação do perfil de liberação do glifosato das microesferas, observou-se que transcorridos 360 minutos aproximadamente 17% do herbicida foi liberado para o meio, solução de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M em temperatura ambiente. E ainda, que o modelo teórico descrito por Korsmeyer-Peppas é adequado para caracterizar o fenômeno de transporte de liberação do glifosato das microesferas, revelando um transporte anômalo não governado pela difusão de Fick.

## 7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Na continuidade deste trabalho poder-se-ia:

- Estudar a sorção do glifosato no solo, uma vez que, tal mecanismo afeta a sua absorção pelas raízes de plantas daninhas e os processos de sua dissipação, tais como: degradação biológica, volatilização, lixiviação e transporte por erosão hídrica;
- Desenvolver outra técnica para quantificação do glifosato nas microesferas;
- Estudar o comportamento de outros herbicidas incorporados as microesferas;
- Avaliar a eficiência agronômica em mudas de ervas daninhas;
- Testar preparar partículas com PCL de menor massa molar;
- Estimar o tempo de degradação das microesferas com herbicida incorporado;
- Avaliar diferentes concentrações de glifosato.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARANTE Jr, O. P.; Santos, T. C. R.; Brito, N. M.; Ribeiro, M. L. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Quim. Nova**, 25, 4, 589-593, 2002a.

AMARANTE Jr, O. P.; Santos, T. C. R.; Brito, N. M.; Ribeiro, M. L. Métodos de extração e determinação do herbicida glifosato: Breve revisão. **Quim. Nova**, 25, 3, 420-428, 2002b.

ÁVILA, L. G.; Leite, S. B.; Dick, D. P. Formulações de atrazina em xerogéis: síntese e caracterizações. **Quim. Nova**, 32, 7, 1727-1733, 2009.

BALU, R.; Kumar, T. S. S.; Ramalingam, M.; Ramakrishna, S. Electrospun Polycaprolactone/Poly(1,4-butylene adipate-co-polycaprolactam) Blends: Potential Biodegradable Scaffold for Bone Tissue Regeneration. **Journal of Biomaterials and Tissue Engineering**, 1, 30-39, 2011.

BARBIERI, A. P. P.; Menezes, N. I.; Vidal, M. D.; Tunes, L. M. Bioensaios para detecção de sementes de arroz tolerante à mistura herbicida imazethapyr e imazapique. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, 17, 1, 88-103, 2010.

BHASKARA, B. L.; Nagaraja, P. Direct Sensitive Spectrophotometric Determination of Glyphosate by Using Ninhydrin as a Chromogenic Reagent in Formulations and Environmental Water Samples. **Helvetica Chimica Acta**, 89, 2686-2693, 2006.

BORGHESI, D. C.; Molina, M. F.; Guerra, M. A.; Camposa, M. G. N. Biodegradation Study of a Novel Poly-Caprolactone-Coffee Husk Composite Films. **Materials Research**, 19, 4, 752-758, 2016.

BORJIGIN, M.; Eskridge, C.; Niamat, R.; Strouse, B.; Bialk, P.; Kmiec, E. B. Electrospun fiber membranes enable proliferation of genetically modified cells. **International Journal of Nanomedicine**, 8, 855-864, 2013.

BOTERO-COY, A. M; Ibáñez, M.; Sancho, J.V.; Hernández, F. Direct liquid chromatography–tandem mass spectrometry determination of underivatized glyphosate in rice, maize and soybean. **Journal of Chromatography A**, 1313, 157–165, 2013.

BRASIL. Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989. 1989, p. 1–7.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Regras para análise de sementes. Brasília: 2009.

CAMPOS, A.; Marconato, J. C.; Franchetti, S. M. M. Biodegradação de Filmes de PP/PCL em Solo e Solo com Chorume. **Polímeros**, 20, 295-300, 2010.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Evolução dos custos de produção de arroz no Brasil. Compêndio de estudos Conab. v.4, 2016.

CRUZ, L.; Assumpção, E.; Guterres, S. S. High encapsulation efficiency of sodium alendronate in eudragit S100/HPMC blend microparticles. **Quim. Nova**, 32, 5, 1170-1174, 2009.

CUNHA, C. S. M.; Tillmann, M. A. A.; Villela, F. A.; Dode, L. B.; Balerini, F. Comparação de métodos na detecção de sementes de soja geneticamente modificada resistente ao glifosato. **Revista Brasileira de Sementes**, 27, 1, 167-175,

2005.

CUNHA, T. F. **Aplicação do Poli( $\epsilon$ -caprolactona) com estrutura estrelada para obtenção de microesferas biorreabsorvíveis.** Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 2012.

DASH, T. K., Konkimalla, V. B. Poly- $\epsilon$ -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. **Journal of Controlled Release**, 158, 15-33, 2012.

DURÁN, N., Mattoso, L. H. C., Morais, P. C. **Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação.** 1ªed. São Paulo: Artliber Editora Ltda, 2006, 208 p.

FARAGO, P. V.; Raffin, R. P.; Pohlmann, A. R. Guterres, S. S.; Zawadzki, S. F. Physicochemical characterization of a hydrophilic model drug-loaded PHBV microparticles obtained by the double emulsion/solvent evaporation technique. **J. Braz. Chem. Soc.**, 19, 7, 1298-1305, 2008.

FARIA, D. M. **Obtenção e Caracterização de Micropartículas de Alginato Para a Liberação Controlada do Herbicida Tebuthiuron.** Dissertação de Mestrado. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, 2016.

FOLDBJERG, R.; Dang, D. A.; Autrup H. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, **A549. Arch Toxicol.**, 85, 7, 743-50, 2011.

FRANZIN, S. M.; Menezes, N. L.; Bahry, C. A.; Marchezan, E. Pré-germinação de sementes de arroz irrigado CV. IRGA 417. **Revista Brasileira Agrociência**, Pelotas, 14, 1, 33-47, 2008.

FRANZIN, S. M.; Menezes, N. L.; Garcia, D. C.; Tillmann, M. A. A. Pré-germinação de sementes de arroz de sequeiro. **Revista Brasileira de sementes**, 29, 1, 68-75, 2007.

FUNGUETTO, C. I.; Tillmann, M. A. A.; Villela, F. A.; Dode, L. B. Detecção de sementes de soja geneticamente modificada tolerante ao herbicida glifosato. **Revista Brasileira de sementes**, 26, 1, 130-138, 2004.

GARCIA, C. H. Tabelas para classificação do coeficiente de variação. Circular técnica nº171, Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF), 1989.

GIACOMELLI, V. S., **Morfologia, Propriedades Térmicas e Mecânicas de Filmes de Proteína Isolada de Soja / Dodecilsulfato de Sódio / Policaprolactona-Triol**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

GONNET, M.; Lethuaut, L.; Bury, F. New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. **Journal of Controlled Release**, 146, 276-290, 2010.

GRILLO, R. **Desenvolvimento de sistemas de liberação modificada para herbicidas triazínicos utilizando nanocapsulas poliméricas**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, 2011.

GRILLO, R.; Rosa, A. H.; Fraceto, L. F. Poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanocapsules carrying the herbicide atrazine: effect of chitosan-coating on physico-chemical stability and herbicide release profile. **Int. J. Environ. Sci. Technol**, 11, 6, 1691-1700, 2013.

GRILLO, R.; Santos N.Z. P.; Maruyama, C. R.; Rosa, A. H.; Lima R.; Fraceto,

L. F. Poly( $\epsilon$ -caprolactone)nanocapsules as carrier systems for herbicides: Physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. **J of Harzardous Materials**, 231-232, 1-9, 2012.

HIRSCH, M. M. **Obtenção e caracterização de formulações de liberação controlada de atrazina e avaliação dos perfis de liberação**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

HOLZ, J. P. **Preparação de micro e nanoesferas de PLGA com mentol**. Dissertação de Mestrado, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2012.

IMANE, B. M.; Asma, A.; Fouad, C. S.; Mohamed, S. Weathering Effects on The Microstructure Morphology of Low Density Polyethylene. **Procedia - Social and Behavioral Sciences**, 195, 2228-2235, 2015.

JIANG, I. C.; Basri, M.; Omar, D.; Rahman, M. B. A.; Salleh, A. B.; Rahman, R. N. Z. R. A.; Selamat, A. Green nano-emulsion intervention for water-soluble glyphosate isopropilamine (IPA) formulations in contolling Eleusine Indica (E. indica), **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 102, 19-29, 2012.

KISSEL, T., Maretschek, S., Packhäuser, C., Schinieders, J., Seidel, N. Microencapsulation techniques for parenteral depot systems and their application in the pharmaceutical industry. In: **BENITA, S. Microencapsulation: methods and industrial aplications**. 2 ed., Boca Raton: CRC Press- Taylor & Francis Group, 2006, 741 p. Capitulo 14, p. 98-122.

KÜLKAMP, I. C.; Paese, K.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. Estabilização do ácido lipolico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea. **Quim. Nova**, 32, 8, 2078-2084, 2009.

LIMA, R.; Feitosa, L. O.; Grillo, R.; Pereira, A. E. S.; Fraceto, L. F. Evaluation of the genotoxicity of polymeric microparticles containing ametryn herbicide. **Journal of Environmental Science and Engineering**, A, 1, 553-565, 2012.

LIU, C.; Yin, H.; Wang, A.; Wu, Z. Wu, G.; Jiang, T.; Shen, Y. Jiang, T. Size-controlled preparation of hollow silica spheres and glyphosate release. **Trans. Nonferrous Met. Soc. China**, 22, 1161-1168, 2012.

MACHADO, M. O. **Glifosato: A emergência de uma controvérsia científica global**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.

MAINARDES, R. M., Gremião, M. P. D., Evangelista, R. C. Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 42, 4, 523-530, 2006.

MARTINAZZO, R., DICK, D. P., HIRSCH, M. M., LEITE, S. B., Peralba, M. C. R. Sorção de Atrazina e de Mesotriona em Latossolos e Estimativa do Potencial de Contaminação. **Quim. Nova**, 34, 8, 1378-1384, 2011.

MATTOS, R. A. **Estudo das interações do herbicida glifosato com argila natural brasileira monoiónica**. Dissertação de Mestrado, Pontifícia Universidade Estadual de Campinas, 2008.

MELO, N. F. S.; Grillo, R.; Rosa, A. H.; Fraceto, L. F.; Filho, N. L. D.; Paula, E.; Araújo, D. R. Desenvolvimento e Caracterização de Nanocápsulas de Poli (L-Lactídeo) Contendo Benzocaína. **Quim. Nova**, 33, 1, 65-69, 2010.

MENDES, J. B. E. **Desenvolvimento e avaliação de micropartículas poliméricas contendo resveratrol**. Dissertação de Mestrado, Universidade

Estadual de Ponta Grossa, 2011.

MENDONÇA, A. O.; Dias; I. W.; Brunes, A. P.; Oliveira, S.; Elemen, E. S.; Agostinetto, D.; Meneghello, G. E. Identificação de biótipos de arroz-vermelho resistente a herbicidas por bioensaio. **Revista de la Facultad de Agronomía**, La Plata, 113, 2, 114-122, 2014.

MILES, S.R. **Handbook of tolerances and of measures of precision for seed testing**. Proceedings of the International Seed Testing Association, Bassersdorf, 28, 525-686, 1963.

MIRANDA, D. M.; Tillmann, M. A. A.; Balerini, F.; Villela, F. A. Bioensaios na detecção e quantificação de sementes de soja geneticamente modificada resistente ao glifosato. **Revista Brasileira de Sementes**, 27, 1, 93-103, 2005.

MOHALLEM, D.F.; Tavares, M.; Silva, P.L.; Guimarães, E.C.; Freitas, R.F. Avaliação do coeficiente de variação como medida da precisão em experimentos com frangos de corte. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, 60, 2, 449-453, 2008.

MOHAMED, A.; Gordon, S. H.; Biresaw, G. Polycaprolactone/polystyrene bioblends characterized by thermogravimetry, modulated differential scanning calorimetry and infrared photoacoustic spectroscopy. **Pol. Deg. and Stability.**, 92, 1177-1185, 2007.

MONTEIRO, W. F.; Vieira, M. O.; Aquino, A. S.; Souza, M. O.; Lima, J.; Einloft, S.; Ligabue, R. CO<sub>2</sub> conversion to propylene carbonate catalyzed by ionic liquid containing organosilane groups supported on titanate nanotubes/nanowires. **Applied Catalysis A**, 544, 46–54, 2017.

MORAES, P. V. D.; Rossi, P. Comportamento ambiental do glifosato. **Scientia Agraria Paranaensis**, 9, 3, 22-35, 2010.

NOGUEIRA, P. F. M.; Paino, I. M. M.; Zucolotto, V. *Nanosilver*: Propriedades, Aplicações e impactos na Saúde Pública e Meio Ambiente. **Vigilância Sanitária em Debate**; 1, 4, 59-71, 2013.

OBBERDÖRSTER, G.; Maynard, A.; Donaldson, K.; Castranova, V.; Fitzpatrick, J.; Ausman, K.; Carter, J.; Karn, B.; Kreyling, W.; Lai, D.; Olin, S.; Monteiro-Riviere, N.; Warheit, D.; Yang, H. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. **Part Fibre Toxicol.**, 6, 2-8, 2005.

OLIVEIRA Jr, R. S. et al. (Eds), **Biologia e Manejo de Plantas Daninhas**, 1ªed, Editora Omnipax, 2011, 348 p.

OLIVEIRA, S. S. A. M. **Preparação e caracterização in vitro de micropartículas de heparina fracionada potencialmente aplicáveis ao tratamento da trombose venosa profunda**. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, 2009, 82 p.

ORTEGA-TORO, R.; Morey, I.; Talens, P.; Chiralt, A. Active bilayer films of thermoplastic starch and polycaprolactone obtained by compression molding. **Carbohydrate Pol.**, 127, 282-290, 2015.

PAVIA, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S.; Vyvyan, J. R. **Introdução à Espectroscopia**, Cengage Learning, São Paulo, 2010, 700 p.

PEREIRA, W. A.; Lisboa, S. P.; Dias, D. C. F. S.; Alvarenga, E. M.; Borém, A. Ajuste de metodologias para a identificação de cultivares de soja quanto à tolerância ao glifosato. **Revista Brasileira de Sementes**, 31, 4, 133-144, 2009.

PITTS, R. D.; Sissom L. E. **Fenômenos de Transporte. Transmissão de Calor, Mecânica dos Fluidos e Transferência de Massa**. Editora McGraw-Hill do Brasil, Ltda, 1981, p. 340.

POHLMANN, M.; Rossi, W. S.; Brendler, C. F.; Teixeira, F. G.; Kindlein Jr, W. Drawing, virtual modeling and 3D print in the production of didactic models for the teaching-learning of visually impaired students: case study of nanostructured systems. **International Journal of Education and Research**, 3, 12, 453-466, 2015.

RAO, J. P.; Geckeler, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation Techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, 36, 887-913, 2011.

RIGOTTO, R. M.; Vasconcelos, D. P.; Rocha, M. M. Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 30, 7, 1-3, 2014.

ROA, J. P. B.; Mano, V.; Faustino, P. B.; Felix, E. B.; Silva, M. E. S. R. Filho, J. D. S. Síntese e Caracterização do Copolímero Poli(3-Hidroxibutirato-co- $\epsilon$ -caprolactona) a partir de Poli(3-Hidroxibutirato) e Poli( $\epsilon$ -caprolactona). **Polímeros**, 20, 221-226, 2010.

ROSA, D. S.; Penteado D. F.; Calil M. R. Propriedades Térmicas e Biodegradabilidade de PCL e PHB em um Pool de Fungos. **Revista de Ciência & Tecnologia**, 15, 75-80, 2000.

ROUNDUP WG, Bula, Registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento / MAPA sob nº 002094, Fabricado por Monsanto do Brasil LTDA. Disponível em: <<http://www.roundup.com.br/online/materiais/bulas/WG.pdf>> Acesso em: setembro de 2014.

SANTOS, R. M. M.; Fialho, S. L. Nanopartículas. **Biotecnologia Ciência e**

**Desenvolvimento**, Ano 10, Número 37, Janeiro/Fevereiro, 2007.

SCHAFFAZICK, S. R.; Guterres, S. S.; Freitas, L. L.; Pohlmann, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quim. Nova**, 26, 5, 726-737, 2003.

SCHUCH, J. Z.; Filho, O. A. I.; Peske, S. T.; Dutra, L. M. C.; Brancão, M. F.; Rosenthal, M. D. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de arroz com diferentes graus de umidade e tratadas com fungicida. **Revista Brasileira de Sementes**, 28, 1, 45-53, 2006.

SILVA, A. S. **Desenvolvimento de métodos quantitativos e de sistemas de screening para a determinação de glifosato**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, 2012.

SILVA, A. S.; Fernandes, F. C. B.; Tognolli, J. O.; Pezza, L.; Pezza, H. R. A simple and green analytical method for determination of glyphosate in commercial formulations and water by diffuse reflectance spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A.**, 79, 1881-1885, 2011.

SILVA, A. S.; Pezza, L.; Pezza, H. R. Determinação espectrofotométrica por injeção em fluxo de glifosato em formulações comerciais de herbicidas. **Quim. Nova**, 35, 1, 14-118, 2012.

SILVA, F. S.; Porto, A. G.; Pascuali, L. C.; Silva, F. T. C. Viabilidade do armazenamento de sementes em diferentes embalagens para pequenas propriedades rurais. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, Alta Floresta, 8, 1, 45-56, 2010a.

SILVA, M. P.; Villela, F. A.; Dode, L. B.; Magalhães Jr, A. M.; Tillmann, M. Â. A. Detecção de sementes de arroz mutante tolerante ao herbicida imazethapyr. **Revista Brasileira de Sementes**, 29, 2, 130-137, 2007.

SILVA, M. S.; Cocenza, D. S.; Melo, N. F. S.; Grillo, R.; Rosa, A. H.; Fraceto, L. F. Nanopartículas de alginato como sistema de liberação para o herbicida clomazone. **Quim. Nova**, 33, 9, 1868-1873, 2010b.

SILVERSTEIN, R. M.; Webster, F. X.; Kielme, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, Ed.; LTC, Rio de Janeiro, 2012, 490 p.

SINDICATO NACIONAL DA INDUSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA VEGETAL (SINDIVEG). Balanço 2015: Setor de agroquímicos confirma queda de vendas. Março de 2016. Disponível em: < <http://www.sindiveg.org.br/docs/balanco-2015.pdf>>. Acesso em: 18 de Julho de 2017.

SINDICATO NACIONAL DA INDUSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA VEGETAL (SINDIVEG). Setor de defensivos agrícolas registra queda nas vendas em 2016. Abril de 2017. Disponível em: <[sindiveg.org.br/wp-content/uploads/2017/06/Release-03abr2017-FINAL.pdf](http://sindiveg.org.br/wp-content/uploads/2017/06/Release-03abr2017-FINAL.pdf)>. Acesso em: 18 de Julho de 2017.

SOUZA, P. M. S.; Lobo, F. A.; Rosa, A. H.; Fraceto, L. F. Desenvolvimento de nanocápsulas de poli-e-caprolactona contendo o herbicida. **Quim. Nova**, 35, 1, 132-137, 2012.

SUAVE, J.; Dall'agnol, E. C.; Pezzin, A. P. T.; Silva, D. A. K.; Meier, M. M.; Soldi, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal**, 7, 2, 12-20, dez. 2006.

TANG, E.; Cheng, G.; Ma, X. Preparation of nano-ZnO/PMMA composite particles via grafting of the copolymer onto the surface of zinc oxide nanoparticles. **Powder Technology**, 161, 209-214, 2006.

TAVARES, V. A. C. D. B. **Matrizes de Policaprolactona e Quitosano para aplicação em Engenharia de Tecidos**. Dissertação de Mestrado, Universidade Nova de Lisboa, 2011.

VIDIGAL, D. S.; Brasileiro, B. G.; Dias, D. C. F. S.; Alvarenga, E. M.; Bhering, M. C. Germinação e morfologia do desenvolvimento pós-seminal de sementes de nim-indiano (*Azadirachta indica* A. Juss. – MELIACEAE). **Revista Brasileira de Sementes**, 29, 3, 39-46, 2007.

YAMADA, T.; CASTRO, P. R. C. Efeitos do Glifosato nas Plantas: Implicações Fisiológicas e Agronômicas. Encarte técnico. International Plant Nutrition Institute. Informações Agronômicas Nº 119 – Setembro, 2007.

<http://www.marchioro.eng.br/faseinicial.htm> (acesso em agosto de 2016)

## ANEXOS

Anexo A. Teste de Germinação (plântulas normais, anormais, sementes duras, dormentes e mortas).

Percentagem média		Tolerância	Percentagem média		Tolerância
Mais que 50%	Menos que 50%		Mais que 50%	Menos que 50%	
A	B	C	A	B	C
99	2	2	82 – 86	15 – 19	7
97 – 98	3 – 4	3	76 – 81	20 – 25	8
94 – 96	5 – 7	4	70 – 75	26 – 31	9
91 – 93	8 – 10	5	60 – 69	32 – 41	10
87 – 90	11 – 14	6	51 – 59	42 – 50	11

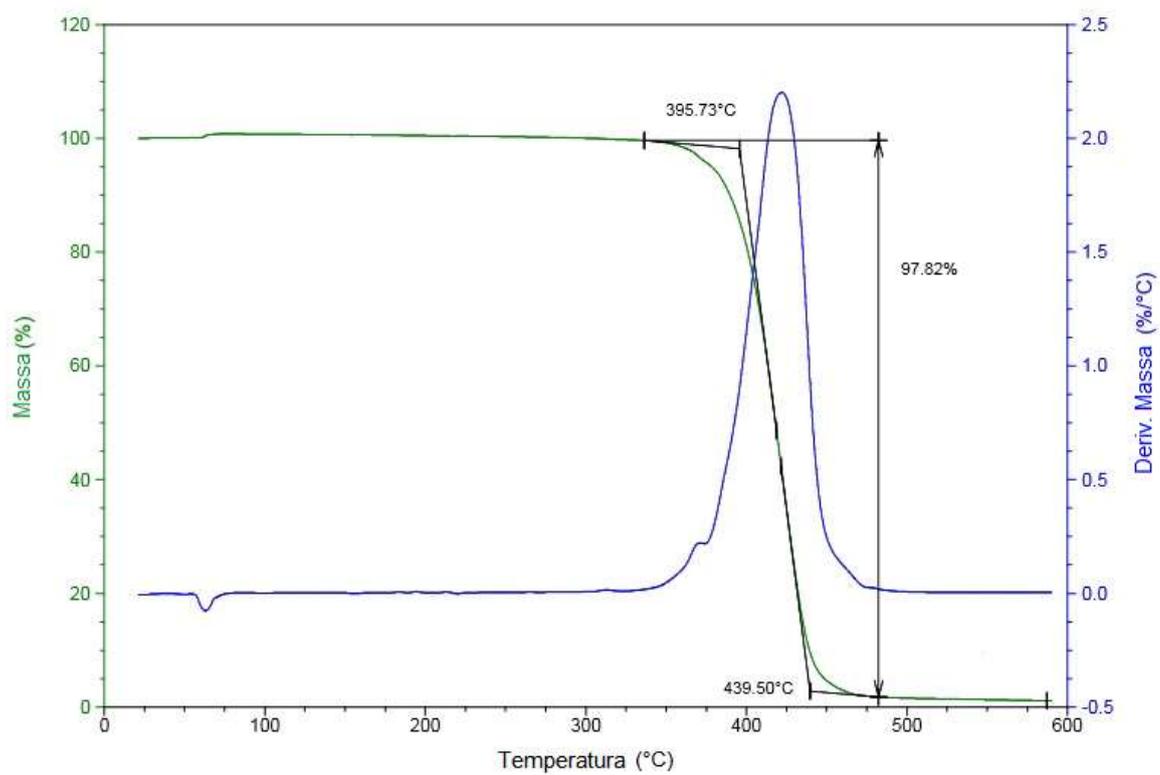
Fonte: Brasil, 2009

## Anexo B. Teste de Germinação (plântulas normais) e Tetrázólio (sementes viáveis).

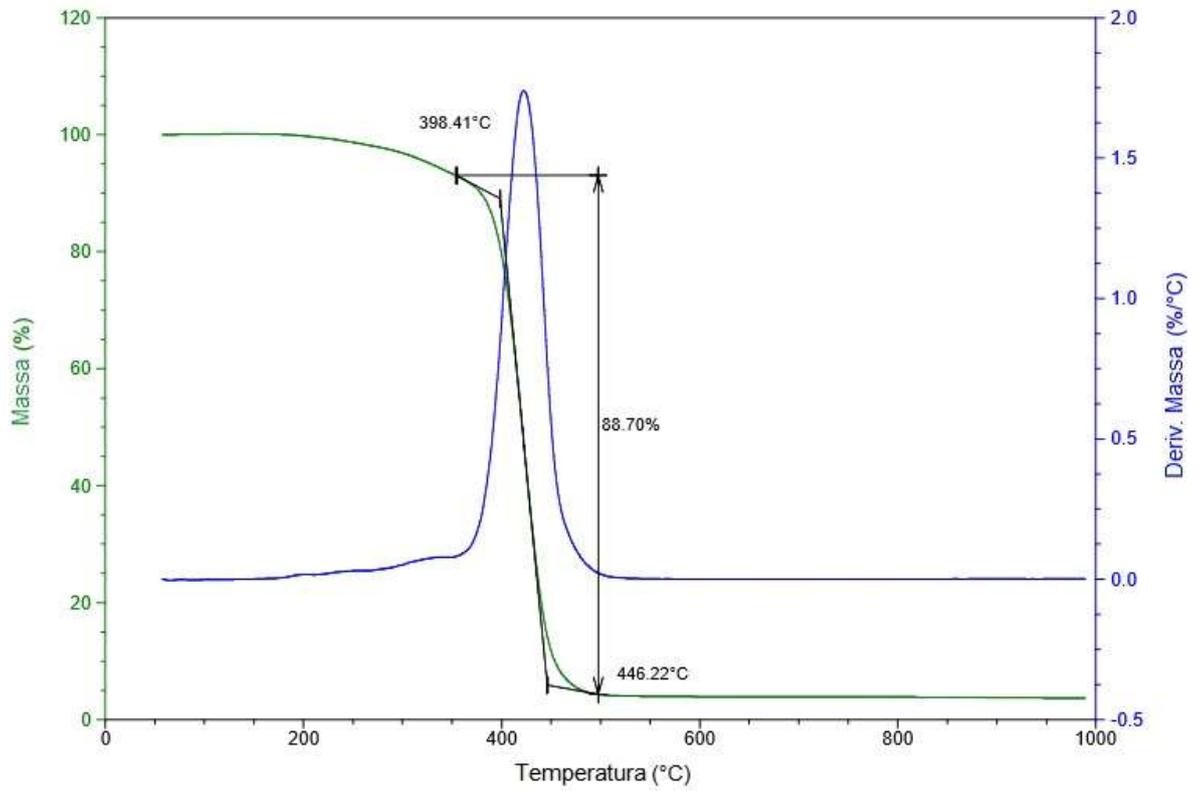
Padrão (%)		Tolerância			
A (51 – 99)	B (menor que 51)	400 sementes		200 sementes	
		C	D	E	F
		Probabilidade (%)		Probabilidade (%)	
		5	1	5	1
99	2	1	2	2	3
98	3	2	3	3	4
97	4	2	3	3	4
96	5	2	4	4	5
95	6	3	4	4	6
94	7	3	4	4	6
93	8	3	5	5	7
92	9	3	5	5	7
91	10	4	5	5	8
90	11	4	6	6	8
89	12	4	6	6	8
88	13	4	6	6	9
87	14	4	6	6	9
86	15	5	7	7	9
85	16	5	7	7	10
84	17	5	7	7	10
83	18	5	7	7	10
82	19	5	7	7	11
81	20	5	8	8	11
80	21	5	8	8	11
79	22	6	8	8	11
78	23	6	8	8	12
77	24	6	8	8	12
76	25	6	8	8	12
75	26	6	9	9	12
74	27	6	9	9	12
73	28	6	9	9	13
72	29	6	9	9	13
71	30	6	9	9	13
70	31	7	9	9	13
69	32	7	9	10	14
68	33	7	10	10	14
67	34	7	10	10	14
66	35	7	10	10	14
65	36	7	10	10	14
64	37	7	10	10	14
63	38	7	10	10	15
62	39	7	10	10	15
61	40	7	10	10	15
60	41	7	0	10	15
59	42	7	11	11	15
58	43	7	11	11	15
57	44	8	11	11	15
56	45	8	11	11	15
55	46	8	11	11	15
54	47	8	11	11	16
53	48	8	11	11	16
52	49	8	11	11	16
51	50	8	11	11	16

Fonte: Brasil, 2009.

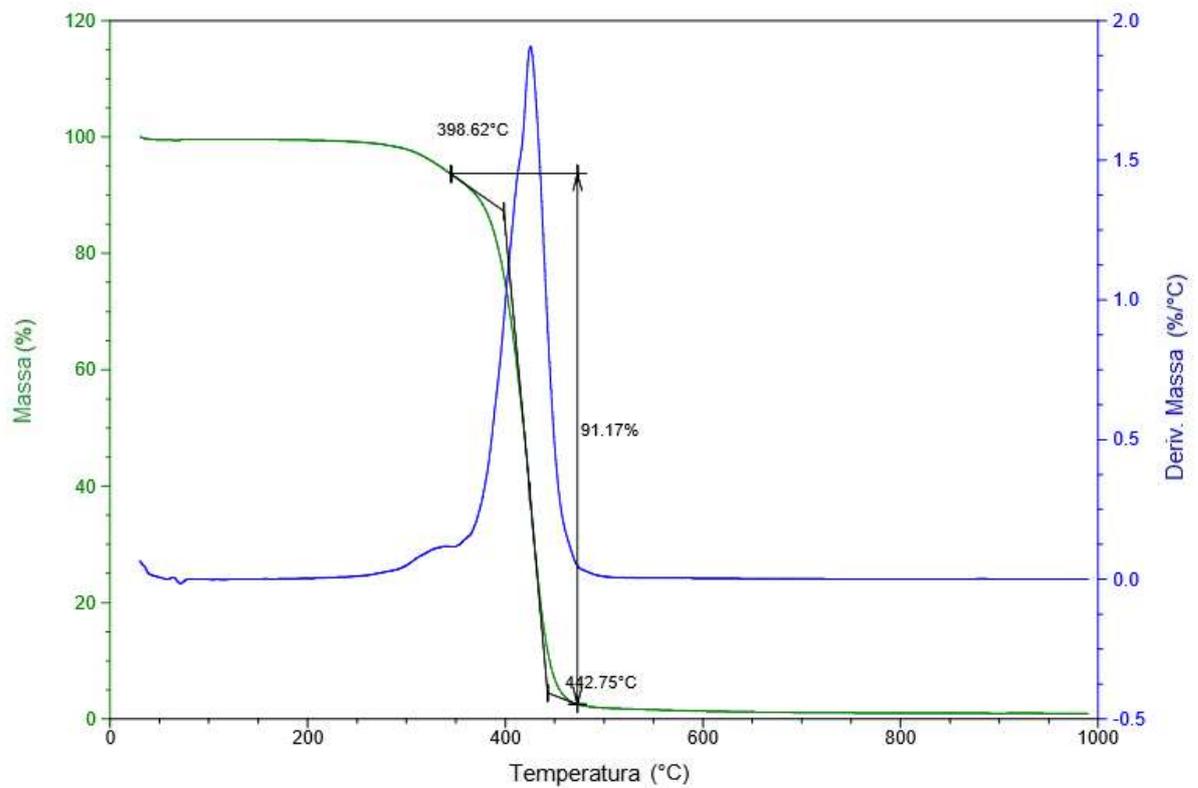
## APÊNDICES



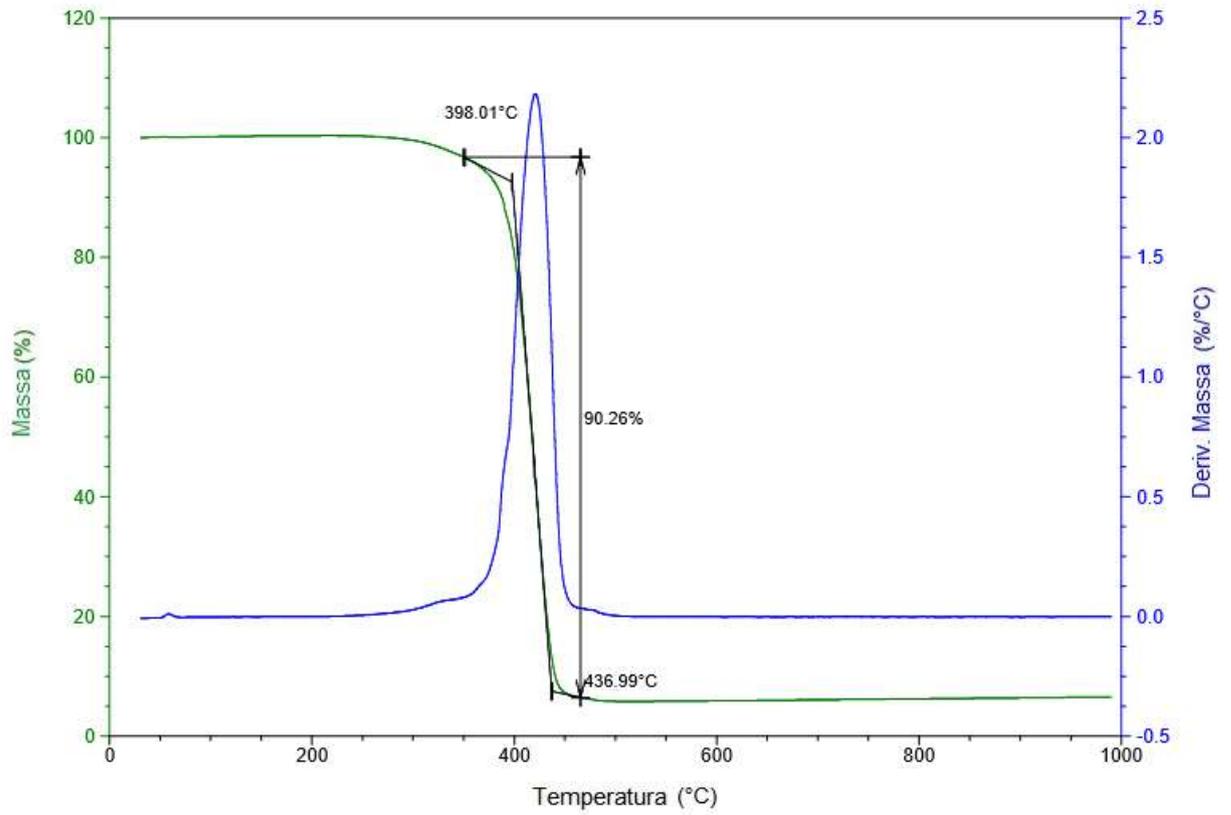
Apêndice A. Termograma do PCL.



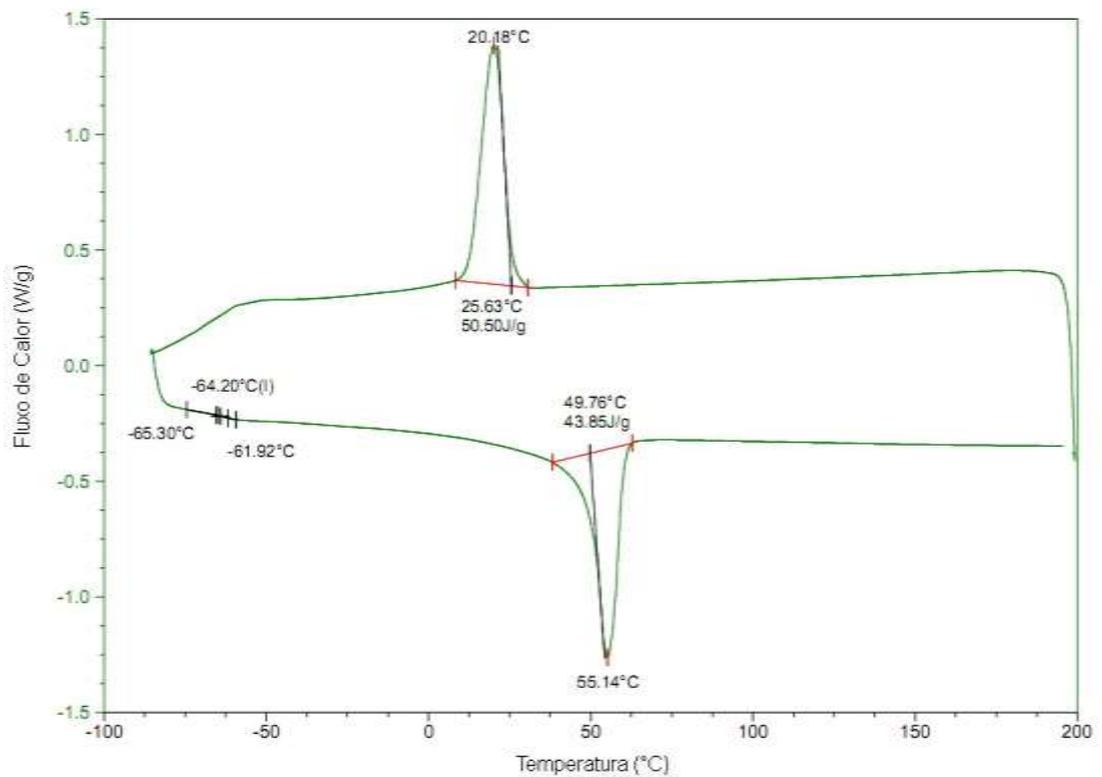
Apêndice B. Termograma das microsferas (ME3).



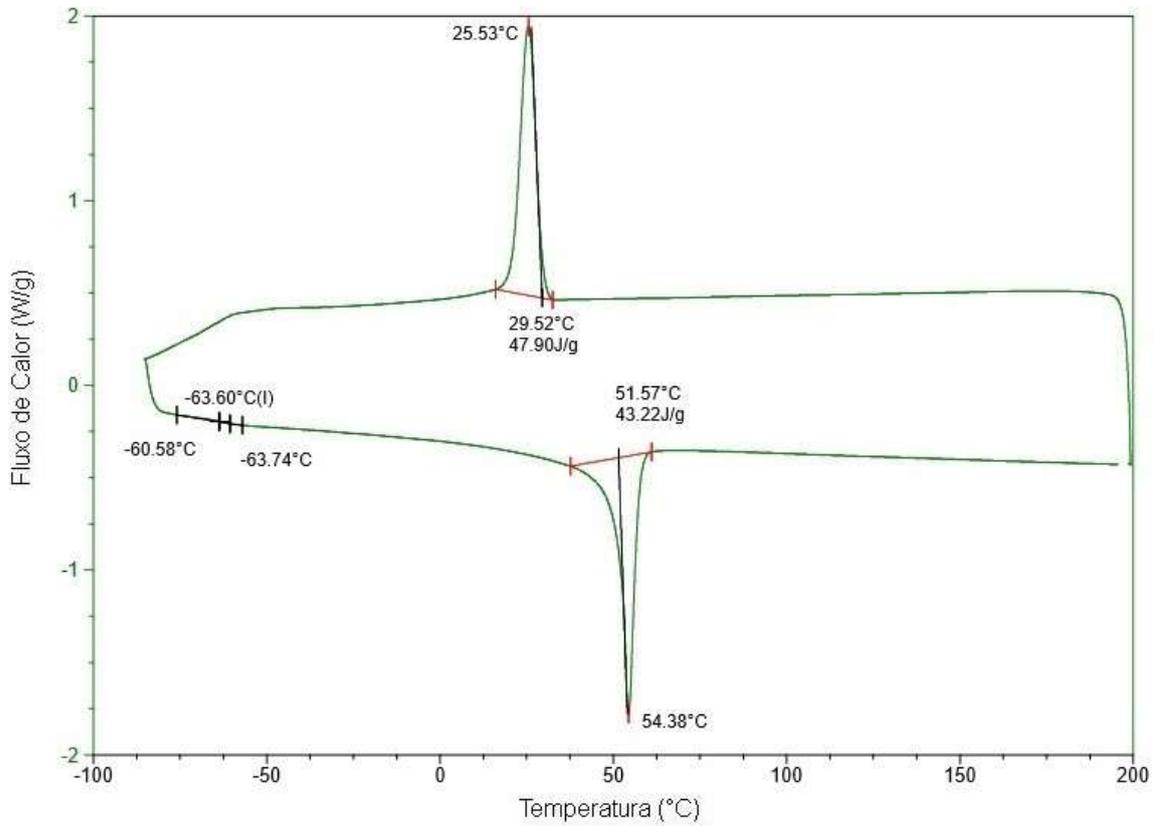
Apêndice C. Termograma das microsferas (ME1).



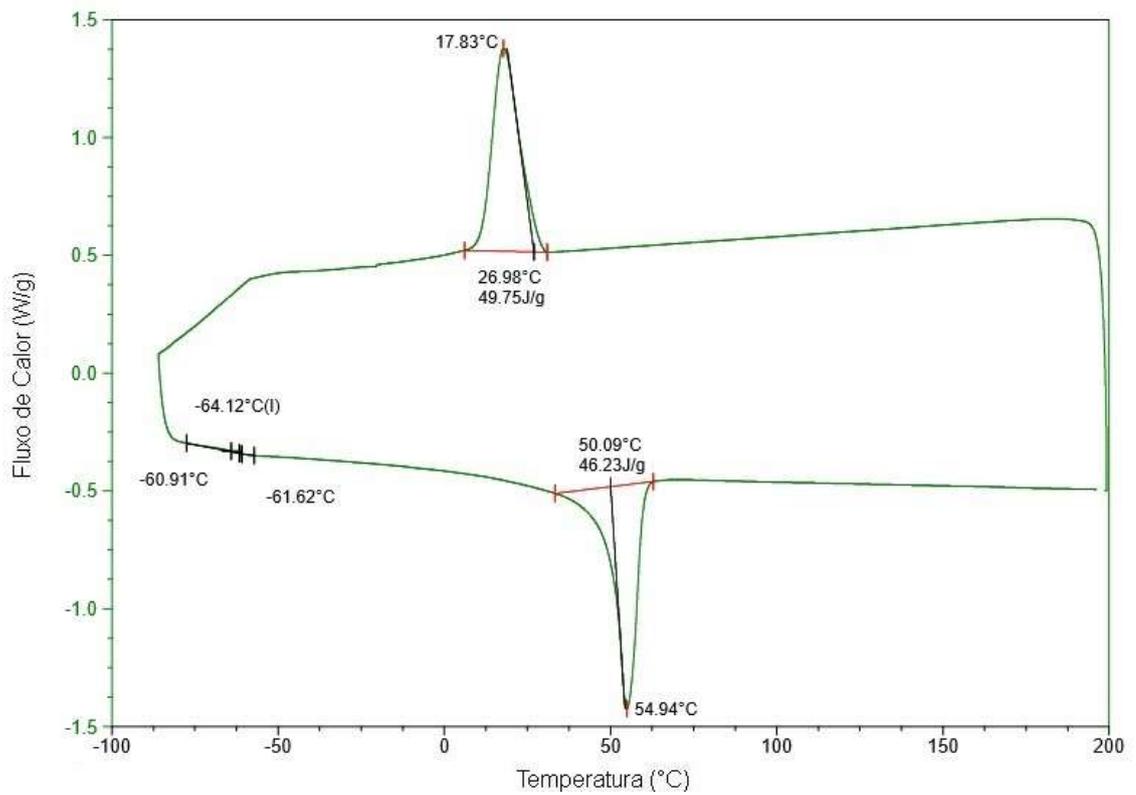
Apêndice D. Termograma das microesferas (ME2).



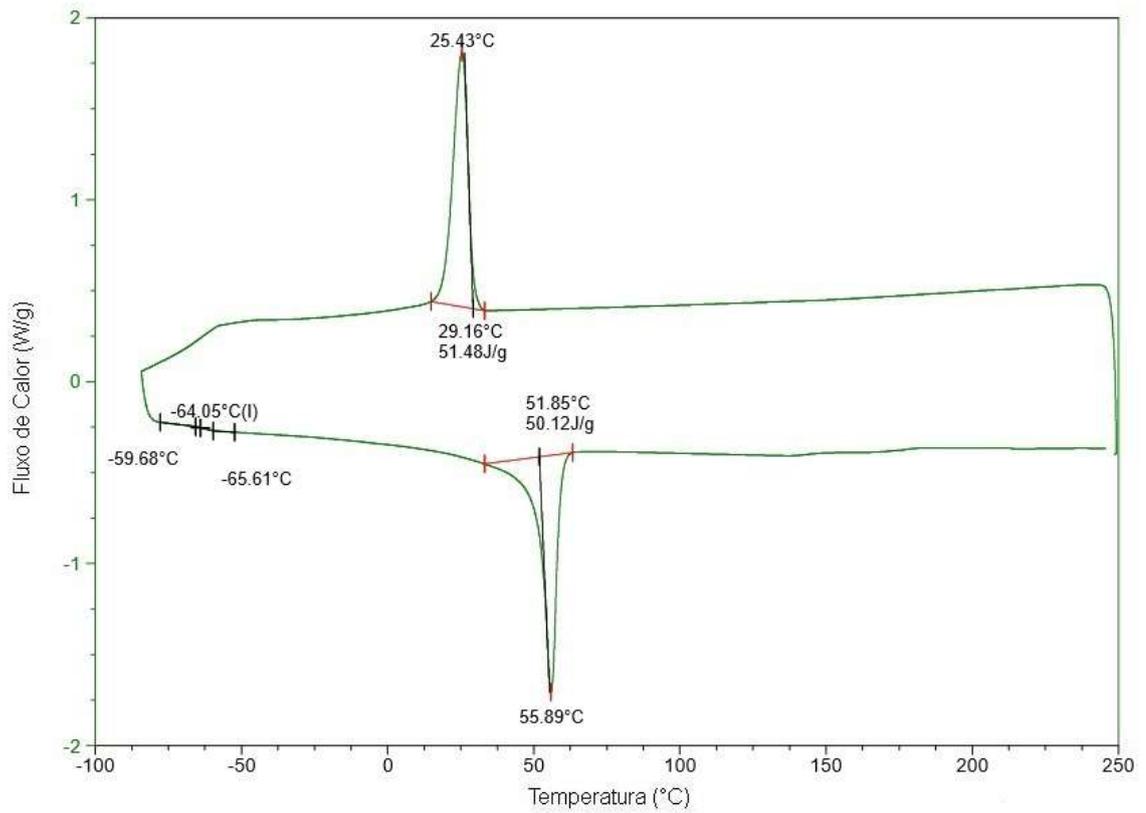
Apêndice E. Curva de DSC do PCL.



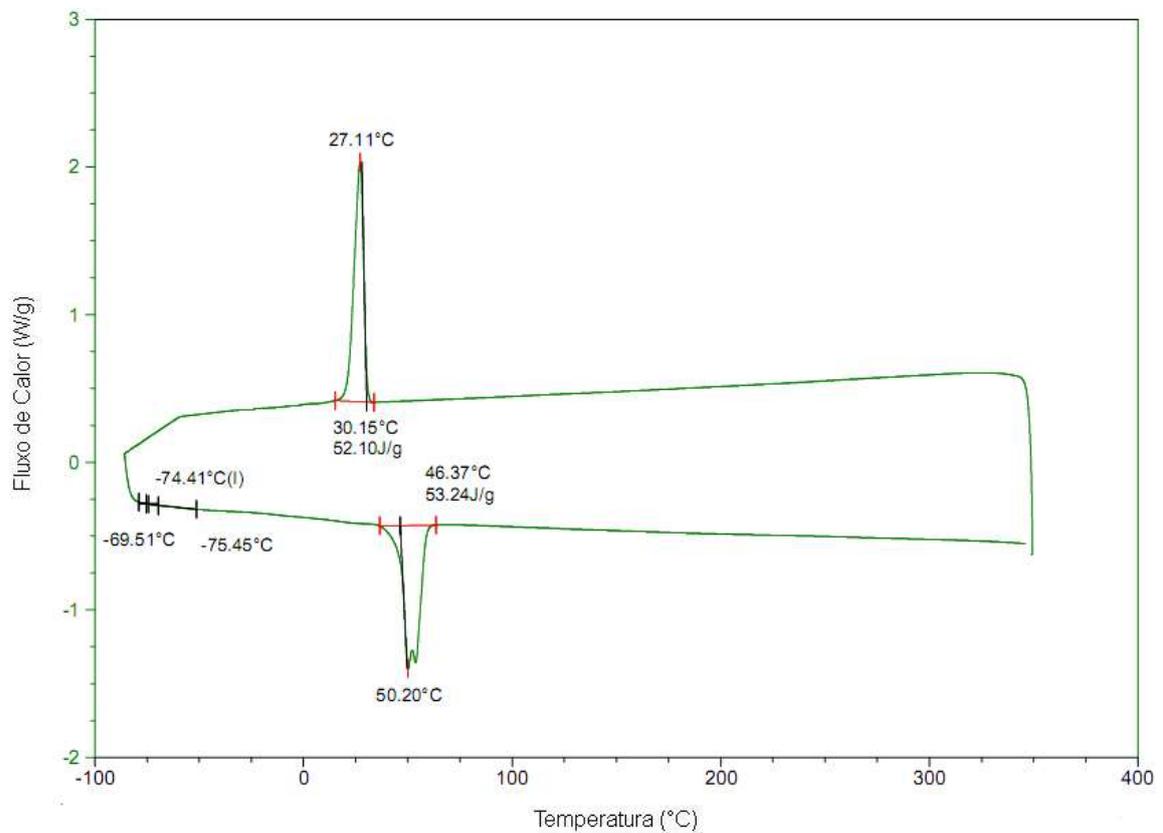
Apêndice F. Curva de DSC das ME.



Apêndice G. Curva de DSC das ME1.



Apêndice H. Curva de DSC das ME2.



Apêndice I. Curva de DSC das ME3.