

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Desenvolvimento de um compósito inseticida-fertilizante
microencapsulado para promover o aumento de
produtividade agrícola**

Luis Guillermo Cuadrado Durango*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA,
área de Concentração: QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientador: Moacir Rossi Forim

*** bolsista OEA/CAPES - Código de Financiamento 001**

São Carlos - SP

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Luis Guillermo Cuadrado Durango, realizada em 29/09/2017.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Moacir Rossi Forim (UFSCar)

Prof. Dr. João Batista Fernandes (UFSCar)

Prof. Dr. Bruno Henrique Sardinha de Souza (UFLA)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

Dedico este trabalho primeiramente a Deus e minha mãe, Marina Del Carmen Durango Reyes, que com seus conselhos fizeram que me tornasse persistente a cada dia e lutasse para voar para longe sem olhar para trás, e com compreensão e paciência me permitiram chegar onde estou.

“You never fail until you stop trying”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não seria realizado sem o apoio de diversas pessoas, as quais cabem aqui os meus sinceros reconhecimentos e agradecimentos.

Ao Prof. Dr. Moacir Rossi Forim, por ter me aceito e me acolhido em seu grupo durante o período de realização deste projeto, apostando em meu trabalho e me orientando com muita paciência e confiança, sempre disposto a ajudar em todos os aspectos.

Ao Eng. Gean Carlos Silva Matias, gerente de pesquisa e desenvolvimento da empresa AgroLatino Condicionadores de Solos & Fertilizantes Especiais. Baraúna Comercio Indústria Ltda., pelo apoio e envio de amostras específicas para a realização dos experimentos.

À Coordenação de Pós-Graduação, ao Programa de Excelência Acadêmica e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Ao Prof. Dr. João Batista Fernandes, Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira, Prof. Dr. Moacir Rossi Forim e a Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva pela utilização do espaço físico e da instrumentação do Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

Ao Dr. Bruno Perlatti e à Dra. Michelli Massaroli da Silva, pelas contribuições e conselhos dados no exame de qualificação.

A todos os professores do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, em especial ao Prof. Dr. João Batista Fernandes, Profa. Dra. Arlene Gonçalves Correa, Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva e Profa. Dra. Quézia Bezerra Cass, pelas disciplinas de excelente conteúdo ministradas com maestria.

A todos os colegas do Laboratório de Produtos Naturais pelo apoio não só profissional como também pessoal. Agradeço em especial aos alunos de pós-graduação: Michelli Massaroli, Clara Aguiar, Marília Pires, Luíze Ramin, Bárbara Denadae, Isabella Barichello, Deyvid Porto, Jessica Amaral, Ana Carolina Santos, Marina Zequin, Waleria Robelo, Eliane May, Julia Lima, Ueleton Rocha, Dorai, e Alana

Pereira, pelos laços de amizade e profissionalismo construídos sob um olhar de ajuda e companheirismo, na formação de um grupo de pesquisa forte e produtivo.

Ao empresas Nanomed Inovação em Nanotecnologia na contribuição pelas análises de Potencial zeta e Diâmetro de partículas.

Aos funcionários do Departamento de Química e da Secretária de Pós-Graduação, que atuam por trás dos bastidores para que a pesquisa esteja sempre em primeiro plano para os estudantes e pesquisadores do Departamento de Química.

Aos amigos do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, por tornar os dois últimos anos repletos de alegria e diversão, pois nem só de trabalho vive o homem.

Aos meus familiares, em especial aos meus pais, irmãos, sobrinhos, por completarem minha vida pessoal e apoiarem cegamente minhas decisões.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACN	Acetonitrila
Aza	Azadirachtina
CLAE-UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - Ultravioleta
CV	Coeficiente de variação
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DP	Diâmetro de partícula
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EHL	Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
LD_{50}	Dose letal mediana
MeOH	Metanol
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MEV-FEG	Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo
NIDDS	Nanoemulsão/Interfacial Deposição/Deslocamento do Solvente
NPPT	Nanoprecipitação
NE	Nanoemulsões
NC	Nanocápsulas
NS	Nanoesféras
PCL	poli(ϵ -caprolactona)
pH	Potencial Hidrogeniônico
m/z	Razão massa/carga
RMN	Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear
SPE-CN	Extração em fase sólida com fase estacionária: CN (Cianopropil)
SDBS	Base de dados espectral para compostos orgânicos
UV	Radiação ultravioleta

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 - Classificação dos pesticidas.....	2
TABELA 1.2 - Propriedades melhoradas de pesticidas e biocidas comerciais nanoencapsulados..	14
TABELA 1.3 – Exemplos mais comuns de inseticidas a base de neem produzidos comercialmente.....	17
TABELA 1.4 - Algumas atividades identificadas de <i>Azadirachtina indica</i> A. Juss. para o controle de insetos pragas	19
TABELA 1.5 - Alguns polímeros usados na encapsulação dos componentes ativos de neem e suas potenciais aplicações agrícolas..	22
TABELA 4.1 – Composição das suspensões coloidais preparadas pelo método de NPPT.....	34
TABELA 4.2 - Composição das suspensões coloidais a serem preparadas pelo método de NIDDS	36
TABELA 4.3 - Parâmetros operacionais para aspersão de produtos formulados mediante o Mini <i>Spray-Dryed</i> Büchi® B-290	39
TABELA 5.1 - Áreas absolutas obtidas na determinação da curva de calibração de aza-A por CLAE-UV	49
TABELA 5.2 - Parâmetros relativos à reta de calibração do método analítico para quantificação da aza-A.....	50
TABELA 5.3 - Valores dos tratamentos estatísticos da regressão linear da curva de calibração de aza-A mediante CLAE.....	50
TABELA 5.4 – Resultados de precisão e exatidão intra e inter dias para três concentrações diferentes de soluções padrão de aza-A.....	51
TABELA 5.5 -Parâmetros relativos à curva de calibração do método analítico ...	52
TABELA 5.6 - Quantificação teor de aza-A no extrato metanólico e óleo de neem por CLAE-UV.....	54
TABELA 5.7 - Composição das suspensões preparadas pelo método de NPPT.	56
TABELA 5.8 - Composição das suspensões preparadas pelo método de NIDDS	57
TABELA 5.9 - Medição do <i>pH</i> das suspensões coloidais de aza-A	58
TABELA 5.10 - Caracterização das suspensões coloidais e os produtos secos por aspersão carregados com neem	61

TABELA 5.11 - Determinação do teor total de azadirachtina na suspensão coloidal pelo método NPPT	67
TABELA 5.12 - Determinação do teor total de azadirachtina na suspensão coloidal pelo método NIDDS	67
TABELA 5.13 - Determinação do teor de azadirachtina livre na suspensão coloidal pelo método NPPT	68
TABELA 5.14 - Determinação do teor de azadirachtina livre na suspensão coloidal pelo método NIDDS	68
TABELA 5.15 - Determinação dos rendimentos de secagem das nanocápsulas obtidos por aspersão.....	70
TABELA 5.16 - Determinação dos rendimentos de secagem das nanoesferas obtidos por aspersão.....	70
TABELA 5.17 - Quantificação do teor aza-A nos produtos secos por aspersão utilizando o equipamento Mini <i>Spray-dryed Büchi</i> ® B-290	72

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – Ciclo de pesticidas no ambiente.	4
FIGURA 1.2 - Estruturas de alguns pesticidas comuns.	4
FIGURA 1.3 - Constituintes ativos de alguns inseticidas botânicos de várias fontes vegetais.....	8
FIGURA 1.4 - Potenciais aplicações da nanotecnologia na agricultura. a) nanopesticidas e nanofertilizantes, b) nanozeolitas e hidrogéis, c) nanomateriais (SiO ₂ , TiO ₂ e nanotubes de carbono), e d) nanosensores por dispositivos de comunicação sem fio.....	11
FIGURA 1.5 - Diferentes métodos de síntese de nanocápsulas poliméricas..	12
FIGURA 1.6 - Representação morfológica de diferentes nanopartículas.	16
FIGURA 1.7 - Distribuição das áreas naturais e plantadas de neem no mundo..	16
FIGURA 1.8 - Constituintes ativos de alguns inseticidas botânicos de neem..	18
FIGURA 1.9 - Principais constituintes isolados das sementes do neem.	20
FIGURA 4.1 - Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência Agilent 1200 Series com detector de ultravioleta (CLAE-UV).	30
FIGURA 4.2 - Representação do método de nanoprecipitação para a preparação das nanopartículas em suspensões coloidais pelo método NPPT.	34
FIGURA 4.3 - Representação do método de nanoprecipitação para a preparação de nanocápsulas em suspensões coloidais pelo método NIDDS.....	35
FIGURA 4.4 – Funções e características do <i>Spray-Dryer</i> . a) diagrama esquemático de pulverização por <i>Spray-Dryer</i> , b) Mini <i>Spray-Dryer Büchi B-290</i> (Büchi Laboratories, Switzerland).....	38
FIGURA 4.5 - Microscópio de varredura eletrônica Philips XL30 MEV-FEG.....	41
FIGURA 4.6 - Câmara de envelhecimento acelerado por luz ultravioleta	42
FIGURA 5.1 - Cromatograma de análises de azadirachtina. Solução de aza-A de 100 µg mL ⁻¹ e extratos de neem.....	48
FIGURA 5.2 - Sobreposição dos cromatogramas da curva analítica de aza-A....	48
FIGURA 5.3 - Curva analítica das soluções padrões de aza-A.....	49
FIGURA 5.4 - Cromatograma de quantificação de aza-A no extrato de neem obtido por CLAE-UV.....	53

FIGURA 5.5 - Cromatograma de quantificação de aza-A no óleo de neem obtido por CLAE-UV.....	54
FIGURA 5.6 - Determinação do <i>pH</i> das suspensões coloidais das nanopartículas de aza-A.....	59
FIGURA 5.7 - Curva de degradação fotoquímica das suspensões coloidais formuladas com ácidos húmicos	62
FIGURA 5.8 - Curvas de degradação térmica das suspensões coloidais	63
FIGURA 5.9 - Imagens de MEV das suspensões coloidais. a) nanocápsulas NC3, b) nanocápsulas NC4, c) nanoesferas NS3, e d) nanoesferas NS4 nas aproximações de 40000x.	64
FIGURA 5.10 - Imagens de maior aproximação MEV das suspensões coloidais. a) NC3 em 50000x, b) NC4 em 50000x, c) NS3 em 10000x e d) NS4 em 50000x. .	65
FIGURA 5.11 - Gráfico da avaliação da cinética de liberação de aza-A das suspensões coloidais (<i>n</i> =3).....	66
FIGURA 5.12 - Produtos secos por aspersão utilizando o Mini <i>Spray-dried</i> B-290: a) NC com PCL, b) NC com lignina, c) NC com ác. húmicos, d) NC com ác. húmicos concentrada, e) NS com PCL, f) NS com lignina, g) NS com ác. húmicos, e h) NS com maior aplicação de ác. húmicos.	71
FIGURA 5.13 - Curva de degradação fotoquímica dos produtos secos por aspersão.	73
FIGURA 5.14 - Curvas de degradação térmica de azadirachtina presente nos produtos secos por aspersão	74
FIGURA 5.15 – Análises da morfologia dos produtos secos por aspersão em 10000x: a) NC3, b) NC4, c) NS3, e d) NS4	75
FIGURA 5.16 - Mortalidade de <i>S. frugiperda</i> em fase larval alimentadas com dieta artificial e tratada com produtos.	77
FIGURA 5.17 - Larvas <i>S. frugiperda</i> afetadas após ingerir a dieta artificial com produtos e extratos de neem: a) produto NC3 (15 mg), b) NC3 (45 mg), c) NC4 (15 mg), c) NC4 (45 mg), e) neem não formulado, e f) controle (dieta sem neem)	78
FIGURA 5.18 - Desenvolvimento larval de <i>S. frugiperda</i> durante o ensaio: a) e b) pupas com diminuição no tamanho; c) fase adulta desenvolvida no controle (Dieta sem produtos formulados); e d) ovos de <i>S. frugiperda</i> no controle	79
FIGURA 5.19 - Mortalidade da fase larval de <i>S. frugiperda</i> após pulverização dos produtos em culturas de milho.	80

FIGURA 5.20 - Avaliação dos produtos sobre plantas de milho com *S. frugiperda*:
a) aplicação de lagarta em folhas, e b) avaliação isolada (Simulação ambiental).81

FIGURA 5.21 - Capacidade fertilizante dos produtos: a) dia inicial (0), b) 3 dias de
ensaio, c) fertilização de plantas de milho (9 dias), e d) 14 dias de ensaio..... 82

FIGURA 5.22 - Avaliação fertilizante dos produtos microencapsulados: a) parte
aérea, b) raiz, c) planta, e d) % Germinação..... 82

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE UM COMPÓSITO INSETICIDA-FERTILIZANTE MICROENCAPSULADO PARA PROMOVER AUMENTO DE PRODUTIVIDADE AGRÍCOLA. O presente trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento de um bioinseticida-fertilizante modelo para controle de insetos-pragas, formulado com extrato de *Azadirachta indica* A. Juss. e ácidos húmicos como matriz polimérica e agente fertilizante. Foram desenvolvidos métodos de formulações com matrizes poliméricas naturais diferentes como ligninas e poli(ϵ -caprolactona) para comparação de rendimento, custo, vantagens ambientais e eficácia. Entre os métodos de nano/microencapsulamento propostos o principal foi a precipitação do polímero pré-formado. Os extratos e produtos foram quantificados mediante a validação de um método analítico para quantificação do teor da azadirachtina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Posteriormente, foram empregados diferentes métodos de nano/micro caracterização para a avaliação da estabilidade das nano/micropartículas em suspensão coloidal, investigando a estabilidade e propriedades do produto natural nanoencapsulado, o tamanho de partícula, o potencial zeta, a distribuição da massa molar do polímero, o teor do composto ativo antes e depois do processo de encapsulamento, o pH do meio de dispersão. A formulação promoveu ganhos de estabilidade fotoquímica, térmica e de aproximadamente 50% de azadirachtina nano/microencapsulada, mantendo uma ação inseticida eficiente na avaliação com *Spodoptera frugiperda*. Os dados obtidos nos bioensaios biológicos apresentaram um índice de mortalidade superiores a 50% nos produtos formulados em comparação ao extrato de neem não nano/microencapsulado como controle na avaliação média de 10 dias. Finalmente, a avaliação da dualidade da função dos ácidos húmicos no processo de encapsulamento e ação fertilizante foram significativamente relevantes, proporcionando germinação média nas plantas de milho de $89,1 \pm 0,1\%$, e na função de polimérica com rendimentos acima do $70,3 \pm 0,1\%$. Os resultados promoveram um produto micro/nanoencapsulado formulado com ácidos húmicos como matriz polimérica biodegradável e com aplicabilidade fertilizante, obtendo um produto final promissório, mantendo a estabilidade do princípio ativo e ação inseticida eficiente frente *Spodoptera frugiperda*, incursionando no desenvolvimento de novas estratégias micro/nanotecnológicas para o controle de insetos pragas, diminuindo o impacto negativo ao médio ambiente.

ABSTRACT

MICROENCAPSULATED INSECTICIDE-FERTILIZER COMPOSITE DEVELOPMENT TO PROMOTE INCREASED AGRICULTURAL PRODUCTIVITY.

The main objective of this work was to develop a bioinsecticide-fertilizer model for pest insect control, formulated with extract of *Azadirachta indica* A. Juss. and humic acids as polymer matrix and fertilizer agent. Formulation methods with different natural polymeric matrices such as lignin and poly(ϵ -caprolactone) were developed to compare yield, cost, environmental advantages and efficacy. Among the proposed nano/microencapsulation methods, the main one was the precipitation of the preformed polymer. The extracts and products were quantified by validating an analytical method to quantify the azadirachtin content by High Efficiency Liquid Chromatography (HPLC). Subsequently, different nano/micro characterization methods were used to evaluate the stability of nano/microparticles in colloidal suspension, investigating the stability and properties of the natural nano/microencapsulated product, particle size, zeta potential, distribution of polymer molar mass, the content of the active compound before and after the encapsulation process, and the pH from dispersion medium. The formulation promoted gains in UV-light and thermal stability of approximately 50% to nano/microencapsulated azadirachtin, maintaining the efficient insecticide action to *Spodoptera frugiperda*. The data obtained in biological bioassays showed a mortality rate higher than 50% to the formulated products compared to the nonencapsulated *Azadirachta indica* A. Juss extract as control in the mean evaluation of 10 days. Finally, the evaluation of the duality of the function of humic acids in the encapsulation process and fertilizer action were significantly relevant, providing average germination in corn plants of $89.1 \pm 0.1\%$, and in the function of polymeric with yields above $70.3 \pm 0.1\%$. The results promoted a micro/nanoencapsulated product formulated with humic acids as a biodegradable polymer matrix and with fertilizer applicability, obtaining a final product, maintaining the stability of the active ingredient and efficient insecticide action against *Spodoptera frugiperda*, incursion at the development of new micro/nanotechnological strategies for the control of insect pests, reducing the negative impact on the environment medium.

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - Usos dos pesticidas sintéticos convencionais na agricultura	1
1.2 - Tipos de pesticidas eo impacto no meio ambiente.....	2
1.3 - Desenvolvimento de biopesticidas	5
1.4 - Produtos naturais para o controle de insetos pragas	6
1.5 - Formulações de biopesticidas.....	9
1.6 - Nanotecnologia e nanoencapsulação de pesticidas	10
1.7 - <i>Azadirachta indica</i> A. Juss.	16
1.7.1 - Propriedades inseticidas do neem.....	17
1.7.2 - Azadirachtina como principal componente ativo.....	19
1.7.3 - Estabilidade da azadirachtina.....	20
1.8 - Nanoencapsulação dos constituintes de neem para aplicação na agricultura.....	21
1.9 - Insetos pragas.....	23
1.9.1 - <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera: Noctuidae).....	23
1.10 - Fertilizantes.....	24
1.10.1 - Ácidos húmicos (AH)	25
2 - OBJETIVOS	26
2.1 - Objetivo geral.....	26
2.2 - Objetivos específicos	26
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 - Equipamentos	27
3.2 - Soluções e Reagentes	28
3.2.1 - Solventes.....	28
3.2.2 - Padrões analíticos	28
3.3 - Materiais.....	28
4 - PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	29
4.1 - Obtenção do Material Vegetal.....	29
4.2 - Preparação do extrato das sementes de <i>Azadirachta indica</i> A. Juss.....	29
4.3 - Validação do método analítico para quantificação de azadirachtina por CLAE-UV.....	30
4.4 - Preparação das soluções padrão para construção da curva de calibração .	31
4.4.1 - Análises estatísticos	32
4.4.2 - Preparo de amostras para análise quantitativa por CLAE-UV.....	32
4.5 - Preparação das nanopartículas em suspensão coloidal	33
4.5.1 - Preparo de nanopartículas por nanoprecipitação (NPPT).....	33
4.5.2 - Preparo de nanopartículas por Nanoemulsão Interfacial Deposição Deslocamento do Solvente (NIDDS)	35
4.6 - Etapas de preparo das amostras	36
4.6.1 - Quantificação total da Azadirachtina na suspensão coloidal.....	36

4.6.2 - Quantificação do teor da Azadirachtina nos produtos nanoencapsulados	37
4.7 - Preparações de nano/micropartículas em pó secas por aspersão	37
4.7.1 - Preparação de Nanocápsulas e Nanoesferas em pó	37
4.8 - Caracterização das formulações	39
4.8.1 - Doseamento de azadirachtina nos produtos secos por aspersão	39
4.8.2 - Determinação do <i>pH</i> das soluções coloidais	40
4.8.3 - Análise morfológica das soluções coloidais e dos produtos secos por aspersão	40
4.8.4 - Estudo da fotodegradação das nanopartículas em suspensões coloidais e dos produtos secos por aspersão	41
4.8.5 - Determinação do potencial Zeta e diâmetro de partículas	42
5.1.1 - Estudos de liberação <i>in vitro</i> para nanopartículas em suspensão coloidal	43
4.9 - <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	43
4.10 - Avaliação dos ácidos húmicos como agente fertilizante	44
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1 - Obtenção do extrato das sementes de <i>Azadirachta indica</i> A. Juss.	45
5.2 - Validação do método analítico para quantificação de aza-A por CLAE-UV	46
5.3 - Validação do método	47
5.3.1 - Seletividade	47
5.3.2 - Faixa dinâmica de trabalho	48
5.3.3 - Exatidão e precisão do método analítico	50
5.3.4 - Limite de detecção e limite de quantificação	52
5.4 - Quantificação do teor de aza-A no extrato e óleo de neem por CLAE-UV	53
5.5 - Preparo das nanopartículas em suspensão coloidal	55
5.5.1 - Obtenção das nanopartículas por NPPT	55
5.5.2 - Obtenção das nanopartículas por NIDDS	57
5.6 - Caracterização das nanopartículas biopoliméricas em Suspensão coloidal	58
5.6.1 - Determinação do <i>pH</i> das suspensões coloidais	58
5.6.2 - Determinação do Potencial zeta e diâmetro de partícula (DP) das suspensões coloidais	60
5.6.3 - Determinação da degradação fotoquímica das suspensões coloidais	61
5.6.4 - Avaliação da degradação térmica das suspensões coloidais	63
5.6.5 - Análise morfológica das nanopartículas em suspensão coloidal	64
5.6.6 - Estudos da cinética de liberação	65
5.7 - Quantificação do teor total de azadirachtina nas suspensões coloidais por CLAE-UV	66
5.8 - Obtenções das nano/micropartículas em pó secas por <i>Spray-Dryer</i>	69
5.9 - Caracterização dos produtos secos por aspersão	72
5.9.1 - Doseamento quantitativo de aza-A nos produtos secos por <i>Spray-Dryer</i>	72
5.9.2 - Estabilidade fotoquímica dos produtos secos por aspersão	72
5.9.3 - Degradação térmica dos produtos secos por aspersão	74
5.9.4 - Análise da morfologia do micro/nanopartículas por microscopia eletrônica de varredura	75
5.10 - Bioensaios	76

5.10.1 - Avaliação dos produtos formulados em dieta artificial sobre <i>Spodoptera frugiperda</i>	76
5.10.2 - Avaliação dos produtos formulados em pó pulverizados sobre <i>S. frugiperda</i> simulando aplicação de campo	79
5.11 - Determinação da capacidade fertilizante dos produtos formulados em pó	81
6 - CONCLUSÃO.....	83
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Usos dos pesticidas sintéticos convencionais na agricultura

O uso de substâncias sintéticas na proteção de cultivos contra os insetos pragas têm sido considerado indispensável nos últimos anos, criando uma dependência pelo uso de inseticidas. Devido à alta demanda por essas substâncias na agricultura necessária para aumentar a produção de alimentos, os pesticidas sintéticos se encontram presentes em níveis baixos em muitos alimentos produzidos pelo consumo humano (CARVALHO, 2017). De acordo com o National Institutes of Health (NIH), os efeitos dos pesticidas ainda não são bem compreendidas, além dos problemas provocados na saúde humana, a aplicação excessiva dos pesticidas sintéticos na agricultura pode causar consequências ambientais tais como resistência genética dos insetos pragas, acumulação nas cadeias tróficas, biomagnificando os fatores negativo e gerando alterações no ecossistema, entre outras difíceis de restaurar (PESTICIDES, 10 February 2017).

Nos últimos anos tem condensado que as práticas agrícolas enfrentam uma crise ambiental (SHIVA, 2016). Algumas pesquisas abordam a sustentabilidade a longo prazo em sistemas de produção agrícola. É evidente que o sistema agrícola vigente aplica de forma intensiva capital e tecnologia, para ser altamente produtivo e competitivo, mas também traz uma série de problemas entre estes estão o econômico, social e ambiental, envolvendo elevados custos na biorremediação do ar, solo e a água, assim como o saneamento do meio ambiente e dos efeitos produzidos pela bioacumulação de substâncias sintéticas tradicionais (CONWAY *et al.*, 2013).

Atualmente, uma das principais estratégias para o manejo de insetos pragas para garantir o abastecimento de alimentos no mundo é o uso de pesticidas. O Brasil é um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo (REBELO *et al.*, 2010) e mais de 90% dos agricultores dependem de pesticidas para controle de pragas, só em 2011 o país ultrapassou a marca de 1 milhão de toneladas, o que equivale a um consumo médio de 5,2 kg de agrotóxico ao ano por pessoa (LONDRES, 2011). Os pesticidas são amplamente empregados na produção agrícola, atingindo cerca de 30% na maioria das culturas. No entanto, o custo indireto do uso de pesticidas por danos ao meio ambiente e à saúde pública deve ser equilibrado contra os benefícios obtidos no aumento da produção agrícola.

1.2 - Tipos de pesticidas eo impacto no meio ambiente

Os pesticidas podem ser de diferente tipos ou classificados por vários critérios, tais como classificações químicas, grupos funcionais, modos de ação e toxicidade (GARCIA *et al.*, 2012). A Tabela 1.1 fornece a classificação de pesticidas com base em diferentes critérios. Os princípios ativos da maioria dos pesticidas comuns são orgânicos (contêm carbono) ou inorgânicos (sulfato de cobre, sulfato ferroso, cobre, cal, enxofre, etc.) (GUNNELL *et al.*, 2007). Os produtos químicos em pesticidas orgânicos tendem a ser mais complexos e menos solúveis em água do que os dos pesticidas inorgânicos (DEBOST-LEGRAND *et al.*, 2016). Os pesticidas orgânicos podem ser adicionalmente subdivididos em dois grupos: natural, produzido a partir de fontes naturais e sintético, artificialmente produzido por síntese química.

TABELA 1.1 - Classificação dos pesticidas.

(a) Com base nos critérios de toxicidade. Adaptado de WHO (2009)			
Tipo	Nível de toxicidade	LD ₅₀ ^a para o tratamento (mg/kg peso corporal)	
		Oral	Dermal
Ia	Extremadamente perigoso	<5	<5
IB	Muito perigoso	5-50	50-200
II	Moderadamente perigoso	50-2000	200-2000
U	Improvável apresentar perigo agudo	5000 ou superior	
(b) Com base na praga alvo. Adaptado de AKTAR <i>et al.</i> (2009).			
Tipo de pesticida		Alvo biológico	
Algicida		Algas	
Avicida		Aves	
Bactericida		Bactéria	
Fungicidas		Fungos	
Herbicidas		Ervas daninhas	
Inseticida		Insetos	
Acaricidas		Ácaros	
Molluscicida		Caracóis, lesmas	
Nematicidas		Nematoides	
Piscicidas		Peixes	
Rodenticida		Roedores	
(c) Com base no modo de formulação. Adaptado de MASCARELLI (2013)			
Estado físico		Características	
Concentrados emulsionáveis		Não requerer agitação constante antes de cada aplicação	
Pós molháveis		Requer agitação constante antes de cada aplicação	
Grânulos		Obtido por mistura do ingrediente ativo com argila	
Isclas		Obtido por mistura do ingrediente ativo com alimentos	
Pós		Os pós não podem ser misturadas com água e devem ser aplicadas secas	

^aLD₅₀ é a quantidade de substância necessária para matar 50% da população avaliada.

Embora os pesticidas sejam desenvolvidos para serem tóxicos para grupos específicos de organismos, eles podem ter efeitos ambientais adversos consideráveis

sobre outros organismos, bem como meios diversos, incluindo ar, solo ou água (AKTAR *et al.*, 2009). A Figura 1.2 exibe estruturas de alguns pesticidas comuns. Alguns pesticidas como, por exemplo, aldrin, clordano, diclorodifeniltricloroetano (DDT), dieldrin, endrin, heptacloro e hexaclorobenzeno são considerados poluentes orgânicos persistentes (POPs) pois resistem à degradação e permanecem no ambiente durante anos (YADAV *et al.*, 2015). Além disso, como tais compostos têm a capacidade de bioacumulação e biomagnificação (Figura 1.1), podem ser bioconcentrados até 70 mil vezes em relação à concentração inicial (KIM *et al.*, 2017). A aplicação excessiva de pesticidas leva à perda da biodiversidade e ao aumento da resistência das pragas, enquanto que seus efeitos em outras espécies facilitam a ressurgência de pragas (DAMALAS *et al.*, 2011). Estima-se que ~95% dos pesticidas aplicados apresentam potencial de impactar organismos não-alvo e se tornarem amplamente dispersos no ambiente (SIMEONOV *et al.*, 2014).

A poluição atmosférica dos pesticidas pode ocorrer através da deriva e devido a pulverização aérea e volatilização pós-aplicação (RULL *et al.*, 2003). Mesmo em ambientes internos, as correntes de ar criadas pelos sistemas de aquecimento, resfriamento e ventilação podem ser um mecanismo para a disseminação de pesticidas quando aplicados nesses ambientes, em ambientes externos o uso dos pesticidas representam cerca de um ~6,0% do nível total de ozônio troposférico (COXALL, 2014).

Em um estudo, as concentrações de pesticidas no ar ambiente foram medidas a partir de três locais de cultivos de batata na ilha de Prince Edward, Canadá (WHITE *et al.*, 2006). A presença do fungicida clorotalonil foi encontrada ubiquamente em concentrações relativamente elevadas, refletindo o efeito do seu uso repetido em culturas de batata. Em outro estudo realizado em lavouras de batata em Prince Edward, as concentrações no solo de carbofurano e metamidofos no ar foram medidas como 219 e 637 ng m⁻³, respectivamente. As concentrações desses pesticidas foram identificadas como altamente preocupantes em termos de exposição potencial à vida selvagem.

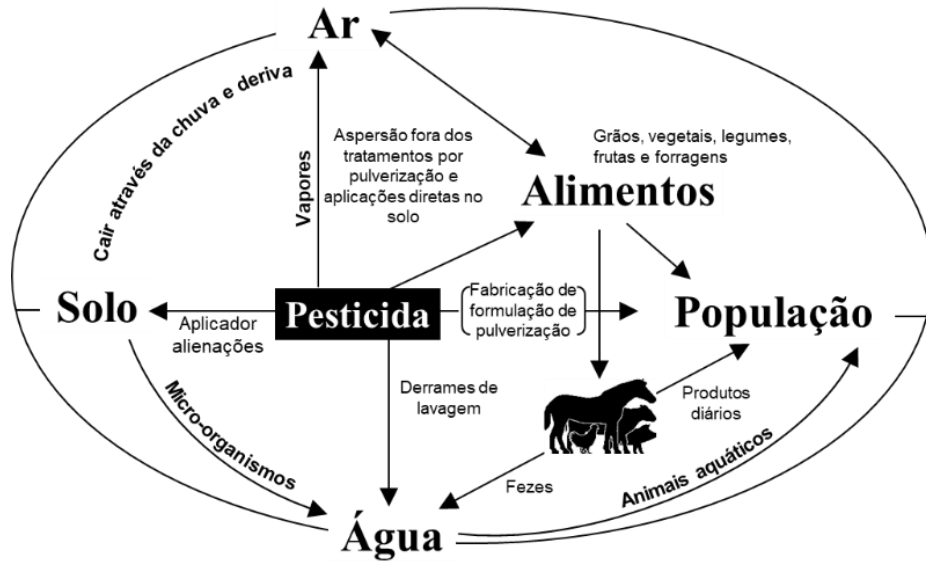
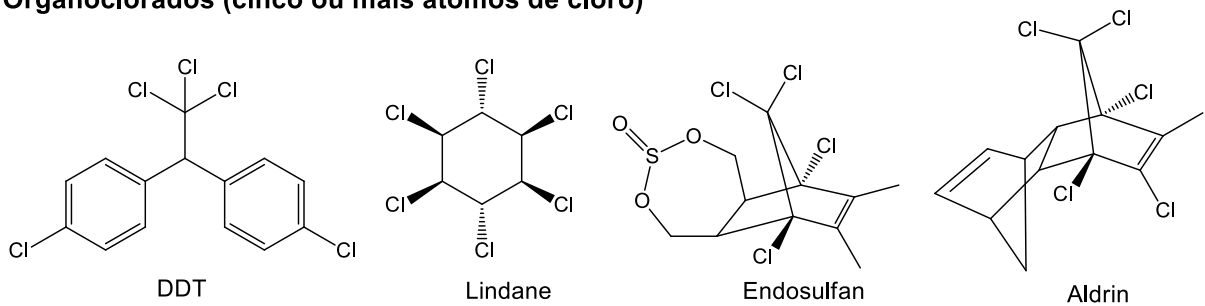
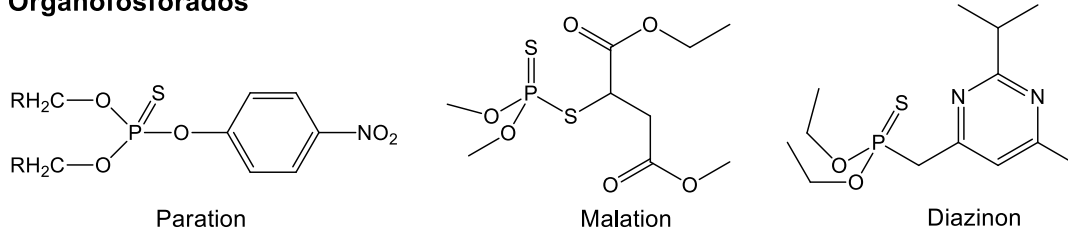


FIGURA 1.1 – Ciclo de pesticidas no ambiente. Adaptado de KAILASA *et al.* (2013)

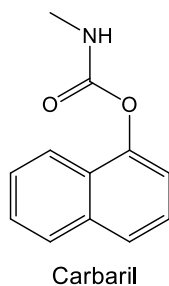
Organoclorados (cinco ou mais átomos de cloro)



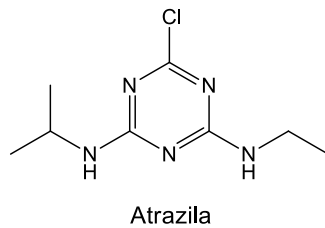
Organofosforados



Carbamatos



Com base de nitrogênio



Ftalimidas

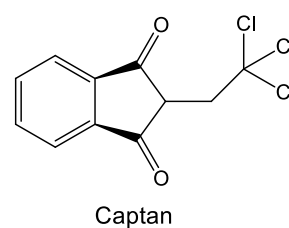


FIGURA 1.2 - Estruturas de alguns pesticidas comuns. Fonte: ANJUM *et al.* (2012).

Por outro lado, na região do Lago Taihu, na China, as concentrações de pesticidas organoclorados tais como *p,p'*-DDT, diclorodifenildicloroetileno (*p,p'*-DDE),

diclorodifenildicloroetano (*p,p'*-DDD) e *O,p'*-DDT, no ar apresentavam média de 1.24, 2.12, 0.36 e 7.67 ng m⁻³, respectivamente (QIU *et al.*, 2004). No reservatório de Kaweah, CA, EUA, as concentrações de clorpirifós foram mais altas em junho (17,5 ng m⁻³), enquanto as de clorpirifós atingiram o pico em maio (30,4 ng m⁻³) (LENOIR *et al.*, 1999).

Resíduos de pesticidas também foram encontrados na chuva e em águas subterrâneas. Em um estudo realizado na Hungria, os contaminantes mais comuns na água foram a atrazina (6%), o acetocloro (4%), o propisocloro (1.5%), o metolacloro (1.5%), o diazinon (1%,) e o 2,4-D (1%) (SZÉKÁCS *et al.*, 2015). Em um estudo na Turquia, as concentrações de beta-hexaclorociclo-hexano (β -HCH), 4,4'-DDT, endrin cetona e metoxiclor foram encontradas de 0.281, 0.138, 0.120 e 0.102 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, em água potável (KIM *et al.*, 2017).

No caso do Brasil, a aquisição de 3000 toneladas de DDT no início da década de 1900 para o controle do vetor da transição da malária, deixou grandes afetações e doenças nas áreas de aplicação (D AMATO *et al.*, 2002; DE ALCÂNTARA *et al.*, 2016). Mesmo após a maioria dos organoclorados terem sido banidos, estes ainda são encontrados na natureza, e em alguns casos metabólitos como DDD e dieldrin (derivados de DDT e aldrin) foram relatados. A presença de DDT foi detectada em peixes da costa brasileira (E SILVA *et al.*, 2007), em leite materno na região amazônica (AZEREDO *et al.*, 2008), e em solo contaminado no Mato Grosso (DALLA VILLA *et al.*, 2006). A presença de organoclorados também está associada a resíduos industriais no processor de produção ou descartes inadequados como ocorridos com o PCP em Cubatão (ALMEIDA *et al.*, 2007), e com dieldrin e endrin em Paulínia, no estado de São Paulo (SUASSUNA, 2001). A degradação e sorção são ambos fatores que influenciam a persistência de pesticidas no solo. Os impactos de alguns pesticidas podem durar décadas, afetando adversamente a conservação do solo e reduzindo a biodiversidade e qualidade da mesma (JACOBSEN *et al.*, 2014).

1.3 - Desenvolvimento de biopesticidas

O controle de pragas é um dos fatores vitais para intensificar a produção agrícola. Durante as últimas décadas, a aplicação de pesticidas sintéticos para o controle de pragas na agricultura tem sido uma prática padrão. No entanto, com as evidências crescentes sobre os efeitos prejudiciais de muitos pesticidas convencionais

sobre a saúde eo ambiente, a necessidade de métodos mais seguros de manejo de pragas torna crucial. Assim, há uma necessidade e demanda urgente para o desenvolvimento de novas estratégias de controle de pragas (BERTOLOTE *et al.*, 2006).

Nos últimos anos, os consumidores tem tomado cada vez mais consciência sobre o impacto potencial dos produtos químicos sintéticos convencionais na produção de alimentos (MÜLLER *et al.*, 2014). O interesse nos problemas relacionados com a segurança alimentar tem gerado uma pressão considerável, não apenas por parte dos consumidores, mas também por vários comitês e organizações ambientais, para reduzir os níveis de resíduos de pesticidas nos alimentos. Desde 2009, foram introduzidas novas regras, fortalecendo os requisitos para substâncias químicas utilizadas como pesticidas (CZAJA *et al.*, 2015; VILLAVERDE, 2014).

A introdução de novos regulamentos no domínio da segurança alimentar resultou na retirada de muitas substâncias sintéticas do mercado, à luz de seus danos inaceitáveis ao ambiente e à saúde. Um elemento adicional que impulsiona a busca de novas ferramentas para o controle de insetos pragas é o aumento da evolução de resistência de populações dos insetos aos pesticidas usados atualmente. Outro fator que apoia o desenvolvimento comercial de produtos agrícolas é o aumento da demanda dos chamados produtos naturais que têm fornecido alternativas aos pesticidas sintéticos deslocados na forma de produtos naturais, ou seja, biopesticidas (DAYAN *et al.*, 2009; S MANN *et al.*, 2012). As implementações de novos métodos de proteção natural das culturas agrícolas acrescentaram a abordagem sistemática na descoberta de produtos derivados das plantas. Assim, a busca de biopesticidas ou substâncias bioativas implicam o rastreio de substâncias em plantas de origem vegetal (ISMAN, 2006).

1.4 - Produtos naturais para o controle de insetos pragas

O uso de produtos naturais para o controle de pragas agrícolas não é uma estratégia nova de controle, sendo bastante utilizada mesmo antes do advento dos inseticidas sintéticos convencionais que se mostravam mais eficientes e baratos, principalmente após a Segunda Guerra Mundial. Entre os principais inseticidas botânicos utilizados merece destaque a nicotina, extraída do fumo *Nicotiana tabacum* L., a piretrina, extraída do pireto *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis., a rotenona (timbó) extraída de *Derris* spp., azadirachtina extraída de *Azadirachta indica* A. Juss,

e *Lochocarpus* spp., a sabadila, extraída de *Schoenocaulon officinale* (Schltdl. & Cham.) e a rianodina, extraída da planta *Rhynchospora speciosa* (SILVA *et al.*, 2002). Os principais grupos de compostos ativos compõem os fenilpropanoides e fenólicos, terpenoides e esteroides, alcaloides, entre outros, Figura 1.3.

Destaca-se ainda, que o uso de produtos naturais é uma tática para o controle compatível com o Manejo Integrado de Pragas (MIP), pois apresentam normalmente baixos efeitos ao meio ambiente, ao homem e a outros animais, visto serem menos agressivos quando comparados aos inseticidas sintéticos que apresentam uma relativa eficiência contra diversos insetos-pragas. Esses produtos têm sido alvo de estudos para o controle de diversos insetos de importância agrícola, dentre os quais, destacam-se os extratos vegetais de espécies da família Meliaceae, como *Melia azedarach* L. (cinamomo), *Trichilia pallida* Swartz (catinguá) e *Azadirachta indica* A. Juss. (neem). Entre eles se destaca o neem, planta inseticida utilizada em vários países, incluindo o Brasil. Essa árvore tem sido estudada para fornecer produtos alternativos aos agroquímicos, apresentando ação comprovada contra mais de 400 espécies de pragas, através de extratos de frutos, sementes, ramos e folhas (MARTINEZ, 2002).

Ao contrário dos inseticidas convencionais base de um único princípio ativo, inseticidas derivados de plantas incluem uma série de vários compostos que diminuem a probabilidade de pragas em evoluir resistência (KOUL *et al.*, 2009). Outra vantagem do uso dos produtos naturais é a eficiência a baixas concentrações e sua rápida biodegradação, resultando menor exposição e evitando os problemas de poluição causados por pesticidas convencionais (KAGNE, 2017).

É importante salientar que mesmo sendo os produtos naturais menos agressivos ao meio ambiente quando comparados aos inseticidas sintéticos, eles apresentam efeitos adversos sobre insetos benéficos, como predadores, parasitoides e polinizadores (FONTES *et al.*, 2002; NDAKIDEMI *et al.*, 2016). Dessa forma, sempre são necessários estudos sobre o uso de produtos naturais e seus efeitos colaterais em insetos não alvos e demais animais do meio ambiente. Acrescenta-se ainda que o uso de produtos naturais em determinadas formulações e concentrações podem causar fitotoxicidade, necessitando de estudos prévios.

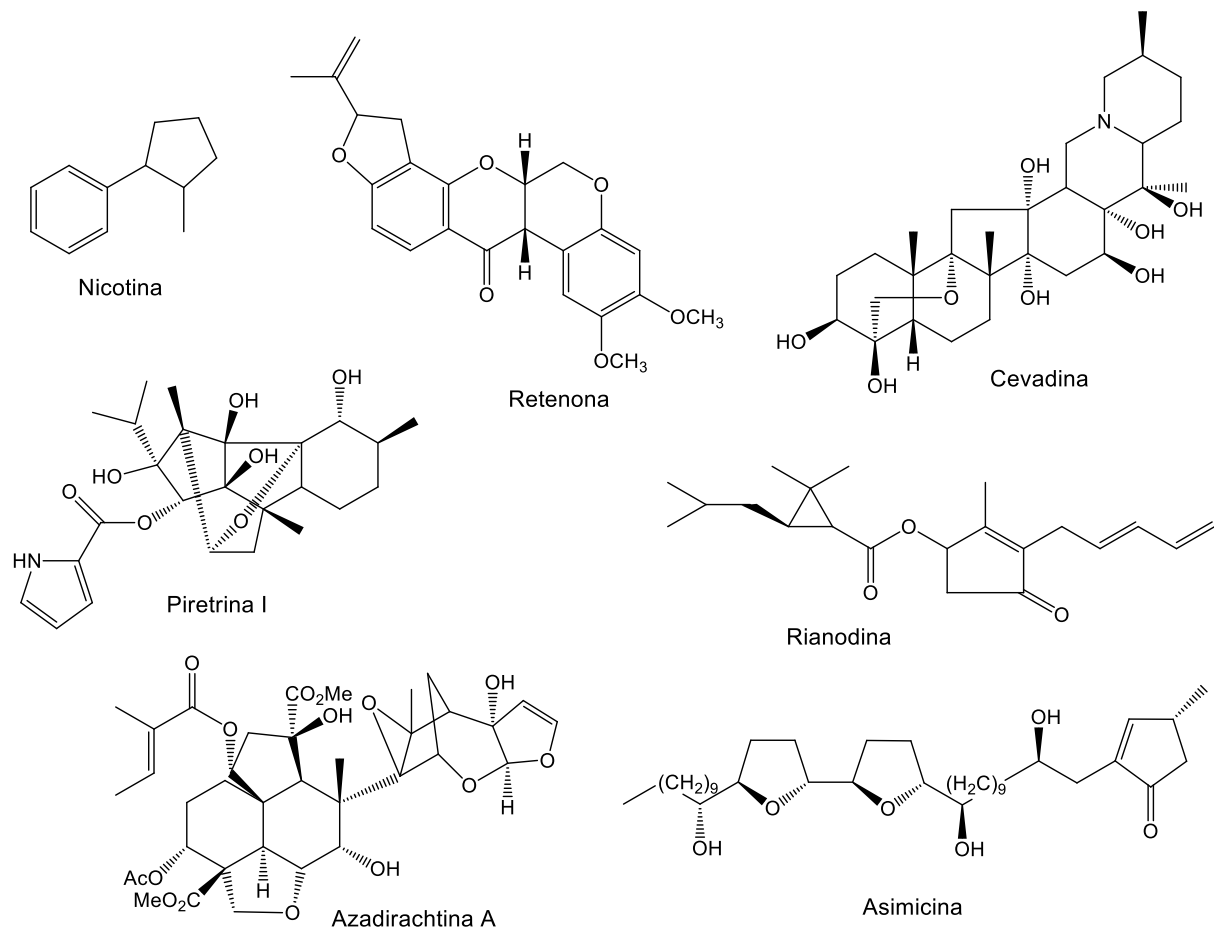


FIGURA 1.3 - Constituintes ativos de alguns inseticidas botânicos de várias fontes vegetais. Adaptado de ISMAN (2006).

Atualmente no mercado há disponibilidade de produtos naturais para o controle de pragas na agricultura, principalmente para pequenas culturas. No entanto o grande problema para o uso desses produtos em grandes culturas respeito à disponibilidade de matéria-prima em quantidade necessária para produção. Outra desvantagem do uso de produtos naturais é a rápida biodegradação comparado aos produtos sintético convencionais, o que demanda novas aplicações em um curto espaço de tempo; embora a rápida biodegradação seja uma vantagem ambiental, também uma desvantagem econômica, o que implica em aumento de uso. Esses problemas são entraves para a adoção dessa tática de controle. Além disso, podem ser citados outros fatores tais como: variação na concentração dos princípios ativos nos diversos órgãos vegetais e ao longo do ciclo de desenvolvimento da planta; técnica mais adequada na extração e conservação dos extratos; fase do inseto mais suscetível e a concentração a ser utilizada; assim como a estabilidade após a aplicação que constituem outros

pontos negativos para adoção dos produtos naturais, principalmente para grandes culturas como soja, milho, arroz, trigo, feijão, entre outras.

1.5 - Formulações de biopesticidas

O principal alvo das formulações químicas é desenvolver uma formulação que proporcione o desempenho biológico necessário e que tenha um tempo satisfatório de duração. Durante o processo de avaliação, quando os candidatos à princípios ativos estão sob avaliação, a formulação química tem influência na extensão da estabilidade dos produtos químicos. No entanto, a seleção final baseia-se no melhor equilíbrio das propriedades para o desempenho biológico, toxicológico, assim como no impacto ambiental e custo (SEAMAN, 1990).

As propriedades físicas e químicas dos princípios ativos nas formulações mais simples são dos produtos contendo apenas o biopesticida. As formulações mais comuns são ainda concentrados solúveis (SL) para os produtos químicos solúveis em água, concentrados emulsionáveis (CE) para os produtos químicos e solventes solúveis, pós molháveis (PM), concentrados em suspensão e (SC) para os sólidos insolúveis (PALUCKI *et al.*, 2010).

O desempenho biológico de um biopesticida é frequentemente afetado pela escolha da formulação. Uma formulação com o produto químico em uma solução, como nas formulações SL e CE, é geralmente mais ativo biologicamente do que as formulações WP ou SC. Também há casos em que um SC é mais ativo do que um WP como resultado de um menor tamanho que faz que o pesticida seja mais biodisponível. Além de considerar as propriedades físico-químicas e biológicas do pesticida na formulação, a formulação química também deve proporcionar um produto que seja conveniente para o agricultor, assim como na utilização segura e eficaz a um custo aceitável (CHANDLER *et al.*, 2011).

As tendências relacionadas com os tipos de formulação de biopesticida provavelmente vão dos pós molháveis e os concentrados em suspensão, os granulados dispersíveis em água, por razões de segurança, e de formulações de um componente a multiplex componentes. Além disso, se pode esperar um maior número de formulações de liberação controlada para otimizar seus efeitos biológico, tais como nanoemulsão, nanosuspensão, nanocápsulas em suspensão, etc. (GHORMADE *et al.*, 2011; GLARE *et al.*, 2012).

1.6 - Nanotecnologia e nanoencapsulação de pesticidas

Especificamente as nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores com um princípio ativo que apresentam diâmetro inferior a 1 μm . As propriedades e os efeitos das partículas e os materiais em nanoescala diferem consideravelmente das partículas maiores com a mesma composição química. As nanopartículas podem ter maior reatividade química, e são mais bioativas que partículas maiores. Devido a seu tamanho, as nanopartículas têm maior área de contato e melhor acesso a qualquer corpo e têm probabilidade de penetração celular, tecidos e órgãos. Estas propriedades proporcionam novas aplicações em quase todos os setores industriais (MEDINA *et al.*, 2010).

Empresas agroquímicas têm reduzido o tamanho das partículas de emulsões de produtos químicos existentes, levando-os a dimensões em escala nano, ou ter encapsulados os princípios ativos em nanocápsulas desenhadas para abrir sob certas condições tais, como respostas à luz solar, calor ou condições alcalinas no tubo digestivo de um inseto. Algumas empresas produzem formulações contendo nanopartículas na escala de 100 a 250 nm que podem ser dispersas em água aumentando assim a facilidade de aplicação de substâncias orgânicas insolúveis resultando com ótima atividade biológica. Outras suspensões de nanopartículas utilizadas (nanoemulsões) que pode ser em água ou à base de óleo, contêm suspensões uniformes de pesticidas ou herbicidas, em nanopartículas na faixa entre de 200 a 400 nm (GIONGO *et al.*, 2016; JOSEPH *et al.*, 2006).

Uma ampla gama de aplicações potenciais da nanotecnologia na agricultura está atualmente disponível, o que leva a uma intensa pesquisa a nível acadêmico quanto industrial por seus desenvolvimentos apropriados (DASGUPTA *et al.*, 2015; PARISI *et al.*, 2015). De fato, as propriedades únicas de materiais em nanoescala tornam-se candidatos ideais para a concepção e desenvolvimento de novas ferramentas de apoio à agricultura sustentável. Algumas das principais aplicações dessas nanotecnologias na agricultura são descritas esquematicamente na Figura 1.4.

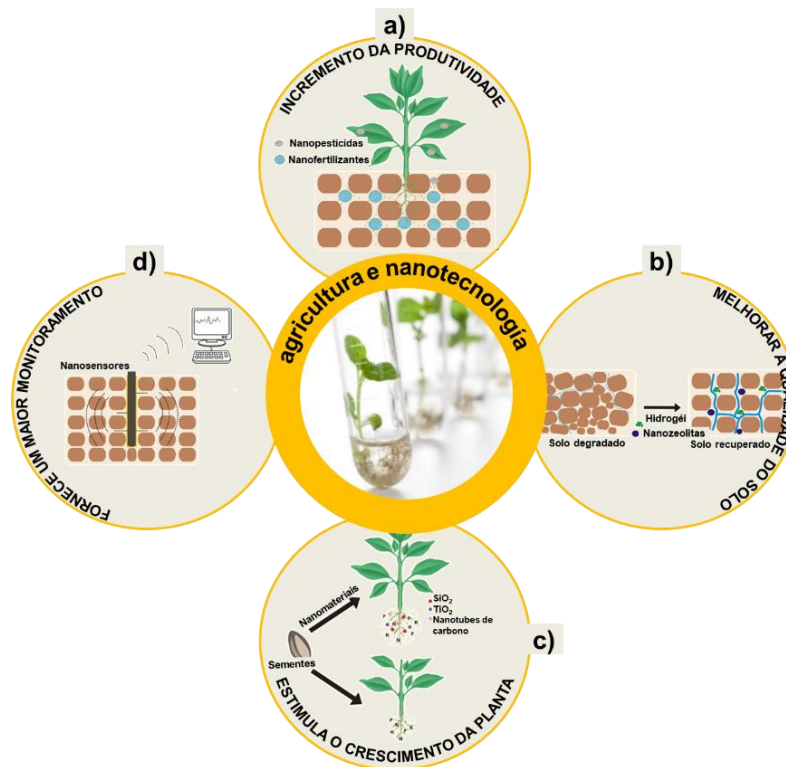


FIGURA 1.4 - Potenciais aplicações da nanotecnologia na agricultura. a) nanopesticidas e nanofertilizantes, b) nanozeolitas e hidrogéis, c) nanomateriais (SiO₂, TiO₂ e nanotubes de carbono), e d) nanosensores por dispositivos de comunicação sem fio. Adaptado de FRACETO *et al.* (2016).

O emprego de nanomateriais poliméricos para o fornecimento de pesticidas tem sido desenvolvido recentemente. Geralmente, os pesticidas estão encapsulados com um biopolímero, já que os nanocompositos poliméricos (PNC) consistem em um polímero contendo nanopartículas carregadas e dispersas dentro da matriz polimérica (KANGO *et al.*, 2013). Os biopolímeros não são prejudiciais para o ambiente, biodegradáveis, diminuindo a produção de subproduto de degradação tóxicos e comparativamente de baixo custo. Como resultado dessas propriedades, provaram ser materiais de encapsulamento adequados para princípios ativos (NURUZZAMAN *et al.*, 2016).

Esses biopolímeros têm sido selecionados pois apresentam diferentes polissacarídeos (amido, alginato e quitosana), algumas proteínas como colágeno e aquelas originadas da soja e da seda, assim como os poliésteres biodegradáveis como os polilactídeos (PLAs), a poli- ϵ -caprolactona (PCL), o poli-ácido glicólico (PGA), o poli-hidroxi octanoato (PHO), o poli-hidroxi butirato (PHB) para a síntese de partículas carregadas com inseticida (PEREIRA *et al.*, 2014). A disponibilidade de diferentes

polímeros e suas propriedades inerentes proporcionam aos pesquisadores a opção de sintetizar nanocápsulas através de diferentes métodos. As estratégias mais comumente desenvolvidas são nanoprecipitação, difusão de emulsão, evaporação de solventes, emulsão dupla, coacervação em emulsão e deposição camada por camada. No entanto, outros métodos são encontrados com modificações dos métodos acima mencionados, por exemplo, dispersão por fusão, polimerização em emulsão, polimerização interfacial, método de deposição interfacial, técnica de deslocamento de solvente, evaporação de emulsão, etc., Figura 1.5 (REIS *et al.*, 2006).

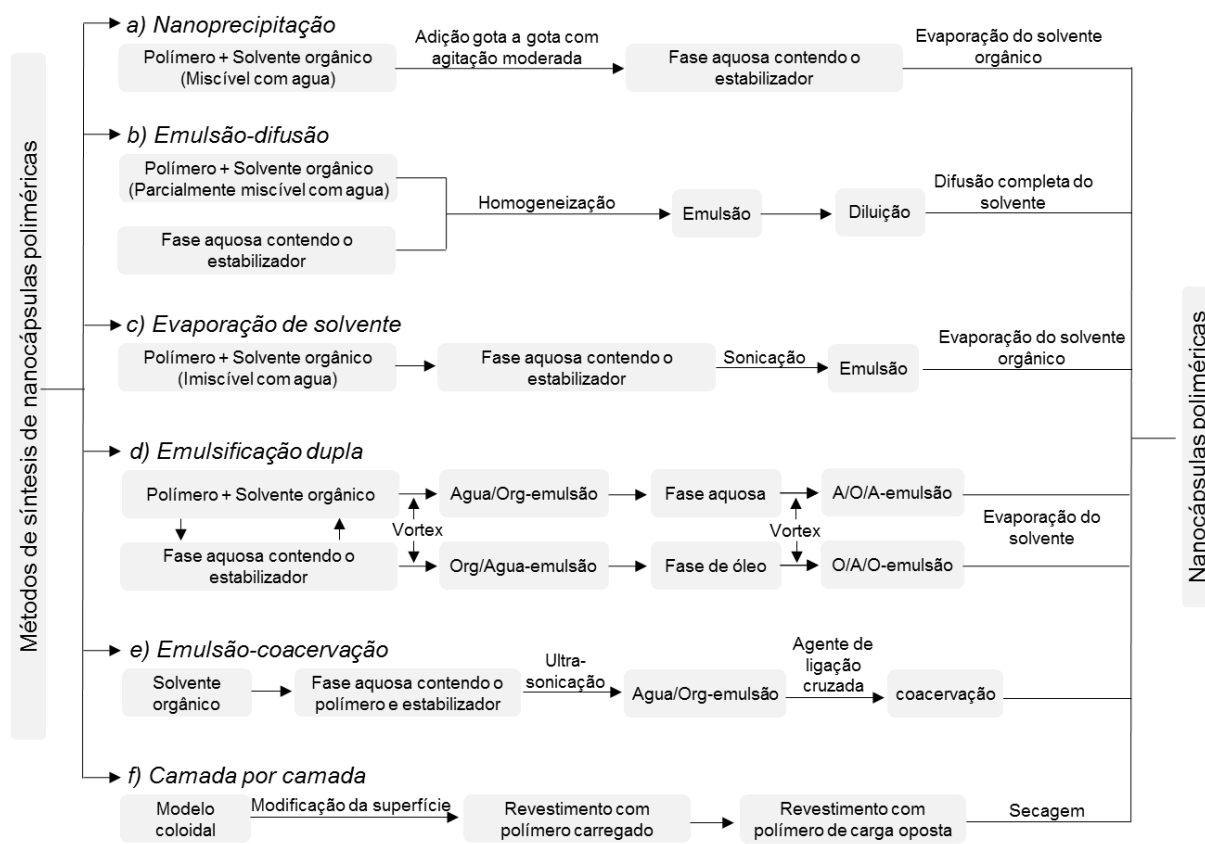


FIGURA 1.5 - Diferentes métodos de síntese de nanocápsulas poliméricas. Adaptado de MORA-HUERTAS *et al.* (2010).

Entre os métodos com maior implementação pela obtenção de nanopartículas e micropartículas polímeras se encontra a nanoprecipitação, também conhecida como precipitação antissolvente, dessolvatação, deslocamento do solvente e mudança de solvente (AUBRY *et al.*, 2009), descrita por FESSI *et al.* (1989). Esta técnica tem várias vantagens em comparação com outros métodos, dentre as quais destacam-se as facilidades para desenvolver as nanopartículas em uma etapa, baixo custo envolvido,

requerimento de baixa energia elétrica e rápido desenvolvimento (BILATI *et al.*, 2005; SHAKERI *et al.*, 2014). A técnica de nanoprecipitação geralmente produz nanopartículas na faixa de 50 a 300 nm, o que é uma vantagem porque o tamanho de partícula menor gera maior área de contato. Esta característica é importante para a sua aplicação em sistemas de adsorção e dessorção (BECK-BROICHSITTER *et al.*, 2010; MUGHEIRBI *et al.*, 2014). O tamanho das nanopartículas depende da matéria-prima, polímero utilizado, miscibilidade do solvente, tipo de agitação e, em termos gerais, da metodologia aplicada (BECK-BROICHSITTER *et al.*, 2010). Além disso, de acordo com BILATI *et al.* (2005) não deve usar uma quantidade excessiva do princípio ativo ou uma agitação proeminente, altas temperaturas e não criar interfaces óleo-água (CHIDAMBARAM *et al.*, 2014).

O avanço nas últimas décadas nas formulações contendo um biocida na matriz de um polímero biodegradável tem levado ao desenvolvimento de nanopartículas poliméricas com aumento das propriedades controladas, maior solubilidade de princípio ativos, proteção contra degradação prematura e maior estabilidade do inseticida. A Tabela 1.2 ilustra a eficiência de alguns pesticidas e biocidas após do nanoencapsulamento.

A crescente tendência de escolha das nanoformulações poliméricas por parte dos pesquisadores pode estar relacionada com a manifestação de uma maior eficiência na propriedade inseticida do composto encapsulado em comparação com as formulações comerciais. A liberação lenta, a proteção contra a degradação térmica e ultravioleta, assim como a baixa solubilidade do inseticida encapsulado são as características mais importantes das nanoformulações poliméricas, o que os torna a primeira escolha para o nanoencapsulamento. As nanoformulações poliméricas podem ser classificadas quanto sua estrutura em nanoesferas, nanocápsulas ou nanoemulsões para encapsulamento de inseticidas (Figura 1.6). Entre eles, as nanocápsulas são as mais utilizadas para o controle de inseticidas (DAS *et al.*, 2014). No caso das nanoemulsões, estes são bons candidatos pela administração de substâncias ativas pouco solúveis em água. Assim, tanto os inseticidas hidrófilos, como hidrofóbicos podem ser dispersos e encapsulados por formulações de nanoemulsão, aumentando a biodisponibilidade dos ingredientes ativos (NURUZZAMAN *et al.*, 2016).

TABELA 1.2 - Propriedades melhoradas de pesticidas e biocidas comerciais nanoencapsulados. Adaptado de NURUZZAMAN *et al.* (2016).

Material de encapsulamento	Pesticida biocida	Material/forma de nanoencapsulação	Recursos aprimorados alcançados devido à nanoencapsulação	Referencias
Pesticidas comerciais				
Polímeros naturais/polissacarídeos				
Chitosan-co-(D,L-lactide)	Imidacloprid	Nanomicelas	A liberação sustentada de imidacloprida foi alcançada	(ZHANG <i>et al.</i> , 2013)
alginato/quitosano	Paraquat	Nanopartículas	O perfil de liberação do herbicida foi alterado, assim como sua interação com o solo, indicando que esse sistema poderia efetivamente minimizar os problemas causados pelo paraquat	(DOS SANTOS SILVA <i>et al.</i> , 2011)
Alginato de sódio	Imidacloprid	Nanopartículas	Exibiram menos citotoxicidade, mas mantêm uma melhor eficácia imidacloprida sobre pragas simples	(GUAN <i>et al.</i> , 2008)
Biocopolímeros de azidobenzaldeído e carboximetil-quitosano	Metomil	Nanopartículas	A atividade inseticida de nanocápsulas carregadas com metomil contra larvas foi significativamente superior ao original, mesmo de 100% ao longo de 7 dias	(YIN <i>et al.</i> , 2010)
Biocidas				
Polímero sintético/poliésteres				
Polietileno glicol (PEG)	Óleo essencial de alho	Nanocápsulas	Materiais de encapsulamento reduzem a volatilização de óleos essenciais e conservaram a eficácia de controle de pragas de 80% ao longo de 5 meses	(YANG <i>et al.</i> , 2009)
	Azadirachtina A	Nanomicelas	Na água, a taxa de libertação de azadirachtina A encapsulada a partir de agregados nanomicelares é reduzida aumentando o peso molecular de PEG, controlando o tempo de semi-liberação ($t_{1/2}$) de 3,05 a 42,80 dias	(KUMAR <i>et al.</i> , 2010)
	Lansiumamida B	Nanocápsulas	A lansiumamida B nanoencapsulada apresentou maior atividade nematicida em comparação com apenas a lansiumamida B, onde os valores de LC_{50} foram de 2.1407 e 19.3608 mgL ⁻¹ , respectivamente, observados após 24 h de tratamento	(YIN <i>et al.</i> , 2012)
Polímeros/polissacarídeos naturais				
Derivados de quitosano anfifílico	Rotenona	Nanomicelas	A solubilidade da rotenona aumentou (até 26,0 mgmL ⁻¹), que foi cerca de 13000 vezes maior do que a rotenona livre na água (cerca de 0,002 mgmL ⁻¹)	(LAO <i>et al.</i> , 2010)
	Azadirachtina	Nanomicelas	A azadirachtina foi protegida pelo biopolímero de uma rápida degradação e liberada ao longo de 11 dias no meio ambiente.	(FENG <i>et al.</i> , 2012)

Continuação TABELA 1.2				
Quitosana e goma de caju	Óleo de <i>Lippia sidoides</i>	Nanogels	A liberação mais lenta e sustentada do óleo de <i>Lippia sidoides</i> foi observada em perfis de libertação <i>in vitro</i> , obtendo eficiências larvicidas efetivas em comparação com o óleo puro de <i>L. sidoides</i>	(ABREU <i>et al.</i> , 2012)
Gelador	Metil eugenol (feromônio)	Nanogels	A evaporação do feromônio diminuiu significativamente e manteve-se estável em condições de ambiente aberto	(BHAGAT <i>et al.</i> , 2013)
Ácido mirístico e quitosano	Óleo de <i>Carum Copticum</i>	Nanogels	Exibiram mais toxicidade fumegante do que o óleo livre durante um período de tempo mais longo para controlar a praga de grãos da loja	(ZIAEE <i>et al.</i> , 2014)
Nanopartículas baseados em lipídios				
Compritol 888 ATO (lipídico)	Artemisia	Nanopartículas lipídicas sólidas	A estabilidade física foi obtida à medida que as nanopartículas lipídicas sólidas reduziram a rápida evaporação dos óleos essenciais	(LAI <i>et al.</i> , 2006)
Argila e hidróxido duplo em camadas				
Hidróxido duplo em camadas	Cinnamato	Hidróxidos duplos em camadas de carbonato calcinados	Considerado um pesticida verde devido às suas propriedades de compatibilidade controlada e de compatibilidade natural	(PARK <i>et al.</i> , 2010)
Microemulsões				
Tween 80 e SDBS	Óleo de neem	Microemulsão	A atividade acaricida demonstrada pela micro emulsão de óleo de neem foi efetiva contra <i>Sarcoptes scabiei var. cuniculi</i> larvas <i>in vitro</i>	(XU <i>et al.</i> , 2010)
Nanoemulsões				
Alginato de sódio e quitosano	capcicina	Nanoemulsão	Melhorou a estabilidade da nanoemulsão carregada com capcicina devido às interações eletrostáticas dos polímeros	(CHOI <i>et al.</i> , 2011)
Surfactante nionico Tween 20 e água	Óleo de neem	Nanoemulsão	A eficácia larvicida aumentou quando o tamanho da gota diminuiu	(ANJALI <i>et al.</i> , 2012)
Tween 80 e água	óleo de eucalipto	Nanoemulsão	Eficácia larvicida superior em relação ao óleo a granel	(SUGUMAR <i>et al.</i> , 2014)

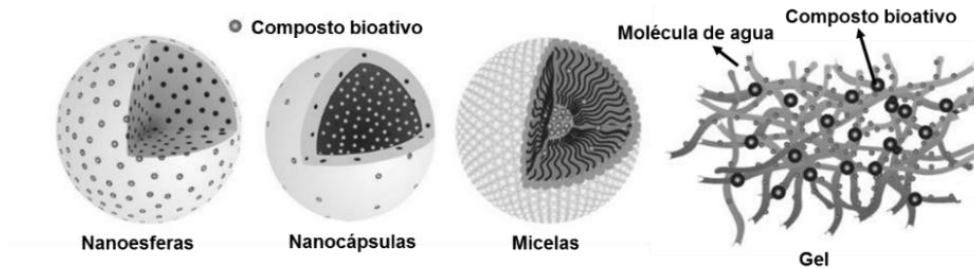


FIGURA 1.6 - Representação morfológica de diferentes nanopartículas. Adaptado de PERLATTI *et al.* (2013)

O termo nanopartículas inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre a composição e organização estrutural; as nanocápsulas são constituídas por uma camada polimérica disposta ao redor de um núcleo oleoso, deixando o princípio ativo incorporado nesse núcleo e/ou adsorvido na parede polimérica. Por outro lado, as nanoesferas, não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica uniforme, onde o princípio ativo pode ficar retido ou adsorvido na superfície, Figura 1.6 (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

1.7 - *Azadirachta indica* A. Juss.

A árvore do neem (*Azadirachta indica* A. Juss) pertence à família Meliaceae e é nativo da Índia. É amplamente distribuída no Sul e Sudeste da Ásia e na maioria das regiões tropicais e subtropicais ao redor do globo (BENGE, 1989), A Figura 1.7 mostra a distribuição geográfica das áreas naturais e plantadas de neem no mundo. A palavra "neem" vem do sânscrito, a origem de todas as línguas indo-europeias, e se traduz em "cura e calmante da doença". Há relatos históricos desde 1.500 A.C. mencionando o uso dessa árvore em escritos religiosos (NORTEN *et al.*, 1999).



● Ocorrência natural ● Plantações (introduzida) ● Ocorrência natural e plantações.

FIGURA 1.7 - Distribuição das áreas naturais e plantadas de neem no mundo. Adaptado de BITTENCOURT (2006).

As comunidades populares e as tribos indígenas têm utilizado as diferentes partes da árvore do neem por muito tempo para o tratamento de dentais, curas de doenças e principalmente no controle de insetos pragas (SUBAPRIYA *et al.*, 2005). Os extratos aquosos de folhas de neem em pó têm sido utilizados para controle de insetos durante séculos. Embora esta prática tenha sido abandonada com o advento de poderosos pesticidas sintéticos, seu uso tem se tornado mais comum após a observação dos efeitos nocivos desses pesticidas, Tabela 1.3 (GOVINDACHARI *et al.*, 1998). Hoje, a árvore de neem é amplamente distribuída na Ásia tropical, subtropical, África, Austrália e América do Sul (BLACKWELL, 1997).

TABELA 1.3 – Exemplos mais comuns de inseticidas a base de neem produzidos comercialmente. Adaptado de PAVELA (2016).

Produto comercial	Composto ativo	Modo de ação
Azamax (UPL, Brasil)	Azadirachtina ¹	Atua como repelente e como inseticida através da inibição de alimentação e de crescimento nos insetos nas diferentes fases de estágios
Margosom® (Agri Life, Índia)	Azadirachtina Óleo de neem	Gera interferência no sistema neuroendócrino que controla a ecdisseona e a síntese de hormônio juvenil.
Molt-X® (BioWorks, Inc., USA)	Azadirachtina	Controla no estágio larval, pupal e ninfa, interferindo no metabolismo da ecdisseona. Normalmente, os insetos morrem entre larvas e pupas, ninfas ou durante a eclosão adulta.
NeemAzal T/S (Trifolio-M, Germany)	Aza-A	Após do tratamento as larvas reagem inibindo o crescimento e morrendo; O adulto mostra a inibição da alimentação, a infertilidade e a mortalidade. Como resultado de ação o tratamento atua de 7 a 10 dias após a aplicação
Azera™ (MGK®, USA)	Azadirachtina piretrinas	Erradica as pragas alvo rapidamente por contato ou ingestão; também interfere no processo da muda e interferindo na fase adulta, sendo efetivo em todos os estágios, larval, pupal e adultos.

¹Grupo de tetranortriterpenóides (aza A-K)

1.7.1 - Propriedades inseticidas do neem

Durante os últimos anos, um grande número de instituições, universidades, centros de pesquisa e indústrias tem focado na busca de novos biocidas e têm concentrado sua atenção na árvore de neem pelo potencial inseticida. Entre as diferentes partes da árvore de neem, as sementes constituem a maior fonte dos compostos inseticidas, não subestimando o potencial das folhas e frutos. A árvore de neem apresenta mais de 300 compostos caracterizados a partir só das sementes

(GUPTA *et al.*, 2017; NICOLETTI *et al.*, 2012). Mais de um terço dos compostos são nortriterpenoides, que são divididos em dois grupos principalmente: limonoides e quasinoïdes (C20 e C19). No caso dos triterpenoides possuem um baixo número de átomos de carbonos, em alguns casos, apresentam perda parcial da cadeia lateral, alguns dos nortriterpenoides são apresentados na Figura 1.8 (BENELLI *et al.*, 2017).

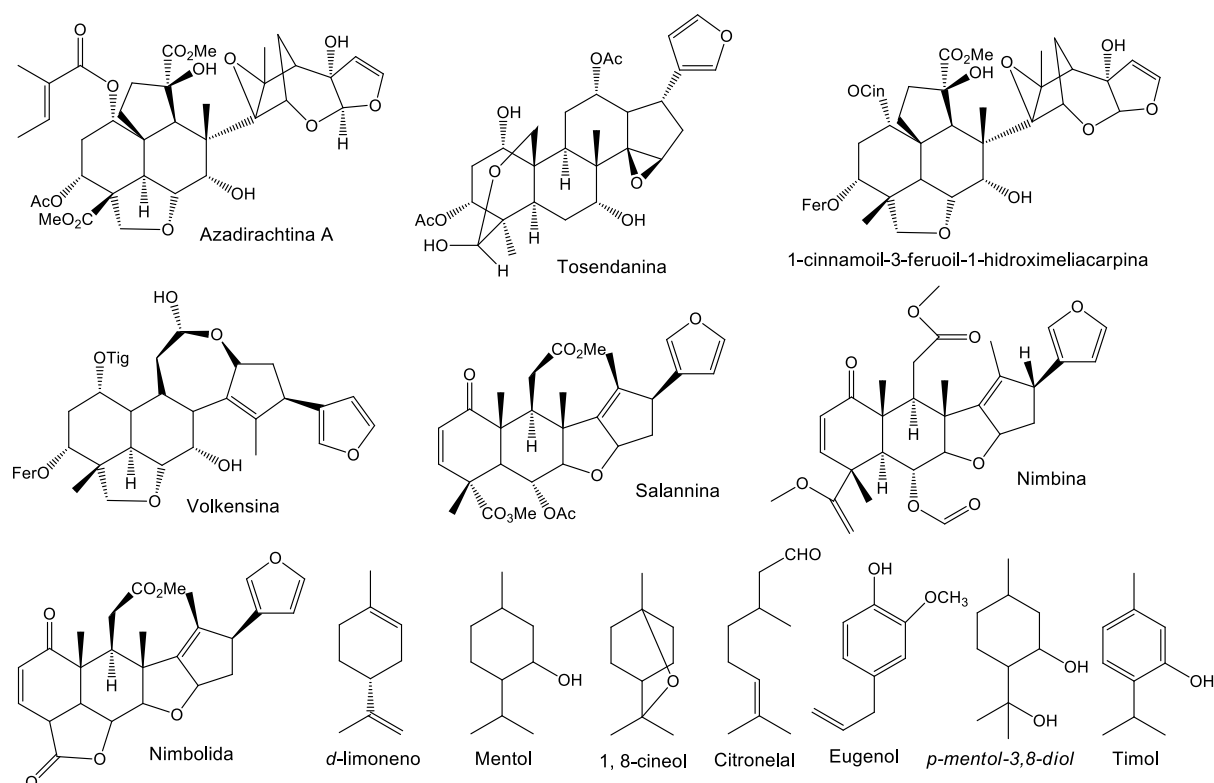


FIGURA 1.8 - Constituintes ativos de alguns inseticidas botânicos de neem. Adaptado de ISMAN (2006), NICOLETTI *et al.* (2012) e NICOLETTI *et al.* (2016).

Dos limonoides característicos isolados de neem se encontra a azadirachtina, que é uma mistura de sete compostos isoméricos conhecidos como aza A-K, outros compostos encontrados que também apresentam potencial biológico é a salannina, óleos voláteis, nimbina e meliantriol (VERMA, 2016). Embora estes compostos sejam muito abundantes nas sementes de neem, o limonoide mais polar encontrado em todas as partes da planta é a azadirachtina, seguido da salannina (MORGAN, 2009). Estes compostos têm um grande potencial inseticida e antialimentar, sendo umas das propriedades mais relatadas dessa planta, Tabela 1.4.

TABELA 1.4 - Algumas atividades identificadas de *Azadirachtina indica* A. Juss. para o controle de insetos pragas

Extrato botânico	Inseto alvo	Atividade observada	Referencia
Óleo das sementes	<i>Ceraeochrysa claveri</i>	Toxicidade	(SCUDELER <i>et al.</i> , 2016)
Ext. aquoso das folhas	<i>Eutyphoeus orientalis</i>	Inseticida	(KUMAR <i>et al.</i> , 2015)
Óleo das sementes	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Inseticida	(TAVARES <i>et al.</i> , 2010)
Ext. oleoso, aquoso, e metanólico das sementes	<i>Aphis gossypii</i> Glover <i>Ixora coccinea</i> L.	Inseticida e fitotoxicidade	(ESPARZA-DÍAZ <i>et al.</i> , 2010)
Ext. etanolico das folhas	<i>Staphylococcus</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp.	Efeito biocida	(REYES DE FUENTES <i>et al.</i> , 2013)
Extratos de neem/Óleo	<i>Sarcoptes scabiei</i>	Acaricida	(DU <i>et al.</i> , 2008)
Óleo das sementes	<i>Muscidifurax raptor</i>	Parasitocida	(RUIU <i>et al.</i> , 2008)
Extrato metanólico	<i>Plutella xylostella</i>	Antialimentar	(YAN <i>et al.</i> , 2015)
Extratos de folhagem	<i>Plutella xylostella</i>	Efeito toxico	(SHARMA <i>et al.</i> , 2014)
Extrato aquoso das folhas	<i>Meloidogyne</i> spp	Nematicida	(NWANKWO <i>et al.</i> , 2016)
Extrato metanólico das folhas/Óleo das sementes	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> <i>Trichophyton rubrum</i> <i>Microsporum canis</i> <i>Epidermophyton floccosum</i>	Fungicida	(OSPINA SALAZAR <i>et al.</i> , 2015)
Extratos das folhas	<i>Pomacea Canaliculata</i>	Moluscicida	(HARUN <i>et al.</i> , 2016)
Óleo das sementes	<i>Brevicoryne brassicae</i> <i>Lipaphis Plutella xylostella</i>	Inseticida	(DJOMAHA <i>et al.</i> , 2016)
Extratos das sementes	<i>Meloidogyne</i> spp	Nematicida	(GALADIMA <i>et al.</i> , 2015)
Extrato aquoso das folhas	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Efeitos na oviposição	(DENARDI <i>et al.</i> , 2010)
Extratos das sementes e folhas/Óleo	<i>Papilio demoleus</i> L.	Antialimentar	(VATTIKONDA <i>et al.</i> , 2016)

1.7.2 - Azadirachtina como principal componente ativo

A azadirachtina, é um tetranortriterpenoide com maior presença nas sementes da árvore de neem, e um dos principais biopesticidas comerciais, assim como uns dos pesticidas botânicos mais efetivos e com maior sucesso na agricultura (OULHACI *et al.*, 2017). Embora alguns isômeros de azadirachtina, aza-A a aza-K, tenham sido reportados na literatura, sendo aza-A o mais importante e com maior uso de referência nas atividades com extratos de neem e suas formulações (DE PAULA *et al.*, 2016). A aza-A possui propriedades proeminentes como inseticida, incluindo o potencial antialimentar, regulador de crescimento e efeitoesterilizante, conseguindo assim o controle de mais de 200 espécies de insetos pragas agrícolas. Além disso, é notavelmente não tóxico para os vertebrados (BOURSIER *et al.*, 2011). O 3-tigloyazadirachtol, também conhecido como aza-B está presente em concentrações de até 20% de aza-A; outras azadirachtinas são produzidas pela planta em concentrações muito mais baixas, alguns delas são apresentadas na Figura 1.9 (SALEHZADEH, 2002).

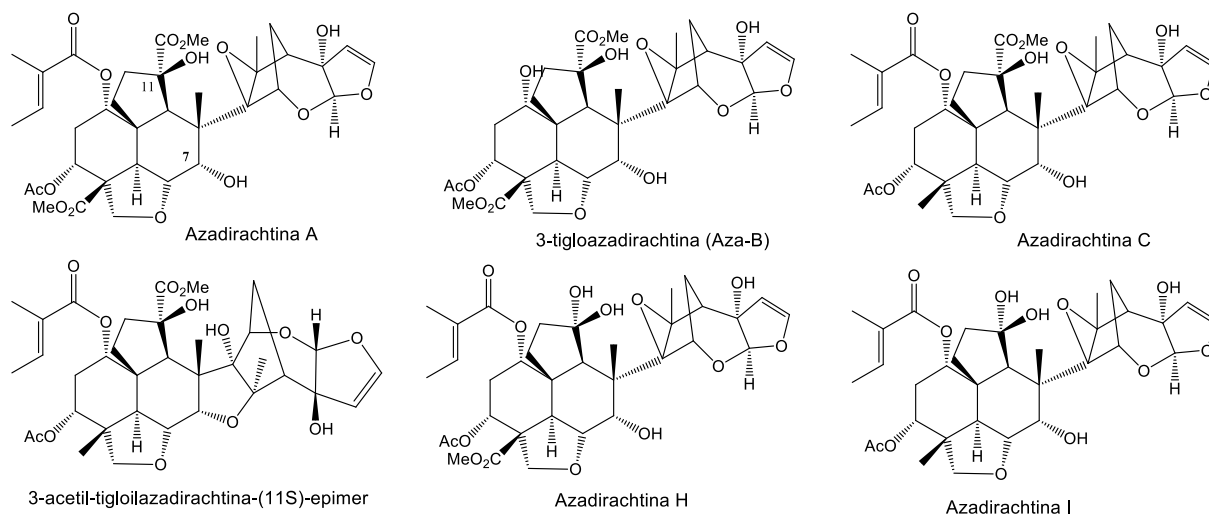


FIGURA 1.9 - Principais constituintes isolados das sementes do neem. Fonte: (DAHIYA *et al.*, 2016; JOHNSON *et al.*, 1997)

A azadirachtina apresenta uma estrutura com grupos funcionais associados ao oxigênio, o que torna difícil determinar que parte da molécula é responsável dos diversos efeitos biológicos. Alguns estudos sobre relações estrutura-atividade sugerem que a funcionalidade na posição 7 e 11 da azadirachtina (Figura 1.9, Aza-A) pode desempenhar um papel importante nos efeitos biológicos (GROSSMAN *et al.*, 1994). A azadirachtina atua geralmente como regulador de crescimento no estágio larval, assim como na alteração da muda, inibição do crescimento, e malformação que podem contribuir com a mortalidade dos insetos (ARCHANA *et al.*, 2017). Isto é atribuído à interrupção no sistema endócrino, na regulação negativa dos níveis de hematófagos, gerando hemofilia por bloqueio da liberação do hormônio protoracicotrópico (PTTH), do complexo corpo cardíaco do cérebro ou atraso na aparição do ecdisteroide, inibindo completamente a muda (RAIZADA *et al.*, 2001).

1.7.3 - Estabilidade da azadirachtina

O uso comercial dos produtos à base do neem estão limitados pela sensibilidade da azadirachtina à luz, umidade, temperatura e aos meios ácidos ou alcalinos (FORIM *et al.*, 2013). A exposição à luz ultravioleta (UV) é a responsável pela foto-oxidação da azadirachtina, tendo que manter as preparações protegidas da luz solar para reduzir os problemas são implementadas algumas substâncias como filtros solares ou absorventes UV, tais como o ácido *p*-aminobenzóico, antraquinona ou a epiclорhidrina, reduzindo a foto-oxidação e prolongando a estabilidade da ação da

azadirachtina nas formulações comerciais (OROZCO-SÁNCHEZ *et al.*, 2007). Geralmente, a azadirachtina é de natureza instável; quanto maior é a concentração da azadirachtina nos produtos, maior a instabilidade. Apesar disso, existem patentes sobre métodos e composições destinadas a conferir estabilidade à azadirachtina (ARCHANA *et al.*, 2017).

O rendimento da azadirachtina varia muito com o solo, o clima, a maturidade da semente e a vida útil. Portanto, para os produtos à base de neem serem comercialmente efetivos, seus constituintes como azadirachtina devem ser estabilizados com o desenvolvimento de novas formulações.

1.8 - Nanoencapsulação dos constituintes de neem para aplicação na agricultura

Um dos problemas na aplicação dos produtos à base de neem em grande escala é a alta fotosensibilidade da azadirachtina, que degrada ou isomeriza sob a luz solar; tendo um efeito residual em condições de campo. Além disso, a falta de padronização e controle de qualidade nas formulações à base de neem afetam a reprodutibilidade da ação esperada (FORIM *et al.*, 2010). O avanço da nanotecnologia na agricultura tem desenvolvido nos últimos anos formulações de liberação controlada de inseticidas por encapsulação polimérica.

A nanoencapsulação polimérica proporciona liberação lenta, controlada e cíclica, facilitando a libertação dos princípios ativos que podem ser controlados no local de ação, minimizando os efeitos tóxicos não visados. Além disso, a nanoencapsulação polimérica evita a perda de componentes voláteis, aumentando assim a estabilidade dos fitoquímicos (CHAUDHARY *et al.*, 2017). As vantagens das nanopartículas poliméricas incluem a biocompatibilidade, biodegradabilidade, capacidade para modificar e funcionalizar a superfície, a incorporação do princípio ativo sem reações químicas e a possibilidade de modulação da degradação e liberação do agente ativo, selecionando os materiais utilizados para o preparo das nanopartículas (PASQUOTO-STIGLIANI *et al.*, 2017). A implementação de polímeros como poli-(ϵ -caprolactona) (PCL), poli-(β -hidroxibutirato) (PHB), poli [β (1,4)-2-amino-2-desoxi-*D*-glucosa] e poli(metacrilato de metilo) (PMMA) (TABELA 1.5), são utilizados geralmente como encapsulantes pela velocidade de degradação, por exemplo, as variações na composição, peso molecular do polímero e métodos de

preparação das nanopartículas (GIONGO *et al.*, 2016). Forim *et al.*, (2013) conseguiram mediante o uso de poli-(ϵ -caprolactona) nanocápsulas e nanoesferas de extratos de neem em altas concentrações de azadirachtina e com diâmetros médios de 150,0 e 250,0 nm, respectivamente. A azadirachtina utilizada como referência nas nanoformulações apresentou uma alta eficiência de aprisionamento (> 95%) deste composto e uma estabilidade UV de pelo menos 30 vezes mais em comparação com os produtos comerciais (FORIM *et al.*, 2011).

TABELA 1.5 - Alguns polímeros usados na encapsulação dos componentes ativos de neem e suas potenciais aplicações agrícolas. Fonte: (CHAUDHARY *et al.*, 2017).

Componente de neem	Princípio ativo	Polímero	Tamanho de nanopartículas	Potencial de aplicação	Referencia
Neem	Azadirachtina	Carboximetil chitosan com ácido ricinoléico (R-CM-chitosan)	200-500 nm	Pesticida botânico	(FENG <i>et al.</i> , 2012)
Sementes de neem	Azadirachtina	Nanoemulsão	1-5 μ m	Eficiente biopesticida causante de alta mortalidade contra uma praga de armazenamento <i>Zabrotes subfasciatus</i>	(DA COSTA <i>et al.</i> , 2014)
Óleo de neem	Azadirachtina	β -ciclodextrina e PCL	PCL: 4 μ m β -ciclodextrina: 83.2 nm	Exibe alta eficácia contra ninfas e ovos de <i>Bemisia tabaci</i>	(CARVALHO <i>et al.</i> , 2012)
Ext./Óleo de neem (Núcleo das sementes)	Azadirachtina	PCL	230–245 nm	Exibe 100% de mortalidade da larval de <i>Plutella xylostella</i>	(FORIM <i>et al.</i> , 2013)
Óleo de neem	Azadirachtina	Nanopartículas de sílica NPs	20 nm	Mostra efeito significativo como inseticida contra <i>Tuta absoluta</i>	(EL-SAMAHY <i>et al.</i> , 2014)
Folhas de neem	Azadirachtina	Nanopartículas de prata	100 nm	As nanopartículas de neem revestidas em prata apresentaram fortes propriedades antifúngicas contra <i>Aspergillus terreus</i>	(CHOUDHURY <i>et al.</i> , 2016)

No entanto, a maioria dos polímeros utilizados na encapsulação polimérica são de origem sintética e/ou não biodegradáveis. No contexto das formulações de biopesticidas, os polímeros de origem natural devem ser implementados na encapsulação dos inseticidas de modo a preparar biopesticidas completamente naturais e diminuir o impacto ao meio ambiente (PERLATTI *et al.*, 2013). Um exemplo, é o trabalho desenvolvido por COSTA *et al.* (2017), que obteve uma alta eficiência de encapsulação da azadirachtina utilizando como biopolímero a lignina, este é um exemplo de um método de preparação bem sucedida gerando micropartículas que

melhoraram a estabilidade térmica e fotodegradativa do componente ativo. Consecutivamente, as formulações mostraram aumento na eficácia da azadirachtina frente aos insetos pragas *Spodoptera frugiperda* e *Diatraea saccharalis* em um maior tempo de ação (COSTA *et al.*, 2017).

A aplicação dos biopolímeros projetados às formulações de biopesticidas se encontram ainda na sua fase inicial de exploração. As micropartículas e nanopartículas desenvolvidas com biopolímeros estão sendo focadas em quanto a sua capacidade de proteção, direcionamento e fornecimento dos princípios bioativos e/ou a projeção dos biopesticidas com novos atributos físico-químicos.

1.9 - Insetos pragas

Os insetos pragas são os principais competidores com os seres humanos pelos recursos gerados na agricultura, e são favorecidos pelas monoculturas em extensas áreas de cultivo intensivo de fertilizantes (OERKE *et al.*, 2004). Os danos causados pelos insetos pragas é um dos fatores mais importantes na redução da produtividade de qualquer espécie de planta, gerando perdas que podem ocorrer no campo antes da colheita e durante o armazenamento após a colheita (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Dentro dos cultivos de maior afetação está o milho, que ocupa o terceiro lugar dos produtos agrícolas do mundo e um dos cultivos com maior área cultivada no Brasil, em torno de 12 milhões de hectares (PAULA, 2017). Apesar da cultura possuir um alto potencial de produtividade, esta é afetada principalmente pelo ataque de insetos como *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) provocando quedas significativas no rendimento desde o plantio até a sua utilização, seja para alimentação humana ou animal (SILVA *et al.*, 2017). No período “safrinha” do cultivo do milho esta praga apresenta condições ótimas de desenvolvimento, conseguindo resistência e um alto custo dos defensivos utilizados, os principais problemas encontrados para o seu controle (LIMA *et al.*, 2009).

1.9.1 - *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

A lagarta-do-mato ou lagarta do cartucho, *S. frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) é capaz de causar danos substanciais às culturas de milho, sorgo, forragem, capim, arroz, algodão, amendoim, entre outras (PEREZ-ZUBIRI *et al.*, 2016). Aproximadamente 3.000 toneladas de ingrediente ativo por ano são usadas para o

controle deste único inseto praga (BLANCO *et al.*, 2008). Em várias regiões do mundo, o uso excessivo de inseticidas resultou no desenvolvimento de populações altamente resistentes a esses produtos químicos. Conseqüentemente, também ocorrem efeitos colaterais, tais como impactos negativos em organismos não alvos destes produtos (DA SILVA *et al.*, 2016). Na sua fase larval, o inseto *S. frugiperda* é considerado a principal praga do milho no Brasil e nas Américas (DA SILVA *et al.*, 2013).

Os prejuízos ocasionados pelo inseto *S. frugiperda* à cultura do milho principalmente não estão relacionados à ausência de tratamento fitossanitário, pois o número de aplicações de agroquímicos para o controle da praga tem aumentado consideravelmente no decorrer dos anos. No entanto, há uma preocupação crescente com o aumento da ocorrência de populações resistentes aos produtos fitossanitários (CARVALHO *et al.*, 2013), bem como com a diminuição da diversidade dos inimigos naturais em consequência do uso indiscriminado de inseticidas (CLOYD *et al.*, 2011). FORIM *et al.* (2010) relataram que extratos de neem com teor de azadirachtina superior a 3,0 µg.kg⁻¹ de dieta causaram 100% de mortalidade. Os ensaios biológicos visaram verificar se a atividade inseticida já conhecida do neem sobre *S. frugiperda* se manteria após o processo de encapsulação utilizando o polímero natural extraído do bagaço de cana-de-açúcar, a lignina criando alternativas naturais para o controle da praga (COSTA *et al.*, 2017; FORIM *et al.*, 2013).

1.10 - Fertilizantes

Com o desenvolvimento da produção agrícola, a fertilização tem sido amplamente utilizada como uma prática de manejo comum para manter a fertilidade do solo e rendimento das culturas (SHEN *et al.*, 2010). Experimentos de campo de longo prazo, utilizando diferentes métodos de manejo, podem fornecer observações diretas das mudanças na qualidade e fertilidade do solo, promovendo previsões de produtividade futura do solo e interações do ambiente do solo. Ao longo das últimas décadas, um grande número de experimentos de longo prazo foram iniciados para examinar os efeitos da fertilização na fertilidade do solo no mundo (DONG *et al.*, 2012).

O uso de fertilizantes orgânicos é um componente importante das práticas na agricultura. O estrume orgânico pode fornecer os nutrientes essenciais das plantas e aumentar a produtividade da cultura, além de deixar um efeito residual benéfico nas culturas sucessivas. Diversos tipos de materiais orgânicos, tais como adubos, lamas

de esgoto e resíduos de culturas, são aplicados ao solo para melhorar o teor de matéria orgânica do solo e, conseqüentemente, as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo tendem a melhorar (JANNOURA *et al.*, 2014).

1.10.1 - Ácidos húmicos (AH)

As substâncias húmicas são os principais constituintes da matéria orgânica do solo, correspondendo genericamente ao produto final da decomposição de resíduos orgânicos na natureza. Eles apresentam alta estabilidade, reatividade e persistência no solo, além de serem considerados recalcitrantes à biodegradação (Santos *et al.*, 2008). No que se refere à sua natureza química, apresentam uma grande complexidade e diversidade estrutural, e são compostos de humina, bem como ácidos húmicos e fúlvicos (PRIMO *et al.*, 2011).

As substâncias húmicas melhoram a produção e a qualidade de uma variedade de plantas, incluindo grãos. O rendimento das culturas com materiais orgânicos poderia ser alcançado igualmente em comparação com o da aplicação de fertilizantes NPK (TAHIR *et al.*, 2011). Por exemplo, os ácidos húmicos aplicados a taxas de 50-300 mg kg⁻¹, mostrou aumento significativo da biomassa de raiz e de broto em milho, com as taxas de 50-100 mg kg⁻¹ resultando na maior resposta de crescimento com respeito a fertilizantes NPK (SHARIF *et al.*, 2002). As substâncias húmicas melhoram a fertilidade do solo modificando suas condições físicas, químicas e biológicas do solo. Os ácidos húmicos são polímeros naturais com grande complexidade estrutural e variabilidade devido a sua polifuncionalidade, apresentando propriedades físicas, químicas e biológicas úteis que podem-se considerar características funcionais em formulações agroquímicas aproveitando a dupla funcionalidade fertilizante/matriz polimérica.

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo geral

A dissertação teve como objetivo o preparo de um compósito inseticida-fertilizante para uso agrícola que atenda simultaneamente as expectativas de produtores para o controle de insetos praga e aumento de índices de produtividade.

2.2 - Objetivos específicos

- Desenvolvimento de compósitos formulados com inseticidas e fertilizantes de origem natural que sejam compatíveis durante etapas de formulação;
- Melhorar a dispersão em meio aquoso e a biodisponibilidade de extratos de origem natural e do metabólito secundário azadirachtina;
- Preparo de extratos vegetais e sua caracterização quantitativa;
- Estabilizar a azadirachtina contra ações ambientais de fotodegradação, termodegradação e hidrólise;
- Preparar nanopartículas poliméricas em suspensão coloidal pela técnica de nanoemulsão/deposição-interfacial/deslocamento do solvente e nanoprecipitação de polímeros pré-formados;
- Desenvolver protocolos de secagem por *Spray-Drying* para produção de micropartículas em pó;
- Caracterizar as propriedades físico-químicas, morfológicas, estabilidades, cinética de liberação e atividade biológica das nanopartículas em suspensão coloidal e em pó;
- Identificar o balanço de massas dos compostos envolvidos no processo e desenvolver métodos de controle de qualidade por CLAE;
- Avaliar o uso de ácidos húmicos como biopolímero e, simultaneamente, como um agente fertilizante.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

Os equipamentos, reagentes e procedimentos adotados para a execução do trabalho estão relacionados a seguir:

3.1 - Equipamentos

- Autoclave vertical, Primatec, modelo CS;
- Agitador de tubos do tipo vortex da Phoenix AP56;
- Bomba Peristáltica; Watson-Marlow, Ing. Pump pro TPM 600 55RPM
- Balança analítica – Bel Engineering Mod. Mark 210A;
- Balança semi-analítica – Bel Engineering Mod. Mark 500;
- Câmara de envelhecimento acelerado com quatro Actinica Philips - 450mm, 15W (380-280nm);
- Centrífuga Eppendorf, modelo 5810;
- Chapa de aquecimento com sistema de agitação magnética da Marconi, modelo MA 471;
- Cromatógrafo à líquido Agilent Technologies série 1200 modulado com um desgaseificador G1322A, bomba quaternária G1311A, auto-injetor ALS G1329A, forno da coluna G1316A e detector UV-Vis G1314B;
- Diâmetro BI-FOQELS (Fiber Optic Quase Elastic Light Scattering) Brookhaven Instruments Corporation;
- Espectrofotômetro Bomem MB-102 Fourier Transform Infrared;
- Estufa Nova Ética;
- Medidor de pH Metrohm, modelo 827, eletrodo Pt 1000;
- Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) Philips XL 30 FEG, 30 KV, resolução máxima de 2nm; Estufa de fotoperíodo, Eletrolab, modelo 122FC.
- Mini *Spray Dryer*, Büchi Labortechnik AG, B-290;
- Moinho IKA11 basic;
- Potenciômetro – Qualxtron Mod. 8010;
- Rota evaporador Büchi R-215 com controle de Vacuum V-850
- Termo balança Shimadzu TGA-50;
- Ultra-turrax IKA, T10 basic;
- Ultrassom Unique;

- ZetaPlus, Zeta Potencial Analyzer – Brookhaven Instruments Corporation.

3.2 - Soluções e Reagentes

3.2.1 - Solventes

- Água deionizada ultrapura (18 Ω) foi obtida através de um equipamento Milli-Q[®] da marca Millipore, utilizada para o preparo e soluções e como fase móvel para cromatografia líquida;
- Hexano e etanol grau P.A. J.T. Baker, foi utilizado para a obtenção do extrato de *Azadirachta indica*;
- Acetona grau HPLC da marca J.T. Baker foi usado para o preparo das soluções coloidais no sistema de encapsulamento;
- Acetonitrila e Metanol grau HPLC da marca J.T. Baker e Tedia foram degaseificados e usados como fase móvel cromatográfica.

3.2.2 - Padrões analíticos

Azadirachtina A da Sigma-Aldrich foi utilizado em soluções padrões para preparo de amostras para construção da curva de calibração por CLAE.

3.3 - Materiais

- Cartuchos de SPE, marca Chromabond[®], empacotados com 10mg de sílica derivatizada com grupos cianopropil;
- Etilenodiaminotetraacetato de cálcio e dissódico (EDTA);
- Filtro com membrana de PVDF com 0,22 μ m e 0,15mm de diâmetro;
- Membrana Teflon 0,45 μ m (Millipore[®]);
- Membrana Teflon 0,20 μ m (Millipore[®]);
- Membrana de Celulose para diálise, 10 mm largura – Sigma-Aldrich;
- Monoleato de polioxietilenosorbitano (Tween[®] 80);
- Reagentes para preparo solução tampão PBS;
- Seringa descartável de 3 mL;
- Tinogard TL[®], Styleze[®] e silicone;
- Tubo para centrifuga Spin (2,0 mL) com filtro acetato de celulose 0,22 μ m;
- Tubos Falcon de 15 e 50 mL.

4 - PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.1 - Obtenção do Material Vegetal

As sementes de *Azadirachta indica* A. Juss. (neem) foram cedidas pela empresa Baraúna Comercio Indústria Ltda. Os frutos foram lavados, despolidos e secos em estufa. Em seguida foi removido a palha das sementes e as amêndoas foram trituradas em um moinho IKA A11 Basic por aproximadamente 30 segundos para a obtenção do pó.

4.2 - Preparação do extrato das sementes de *Azadirachta indica* A. Juss.

O extrato vegetal de neem foi obtido macerando 500,0 ± 0,1 g de amêndoas moídas em solventes orgânicos. A maceração foi realizada primeiramente com *n*-hexano por 60 min em 5,0 L do solvente com ajuda de um agitador mecânico, e repouso de 12 horas aproximadamente sendo, após o período de repouso a solução filtrada, e o filtrado rotaevaporado para concentração do extrato. O sólido retido no filtro (torta) foi novamente conduzido ao processo de extração com *n*-hexano repetindo o processo até a exaustão. O *n*-hexano foi empregado para a remoção do óleo de neem e outros componentes apolares. No final do processo foi obtido 1,3 L de óleo de neem.

O resíduo não extraído foi então macerado com outros 5,0 L de metanol para extração dos principais limonoides da espécie vegetal como, por exemplo, a azadirachtina (analito de interesse). Em cada extração com metanol o material vegetal foi agitado por 60 min e mantido em repouso por 12 h. Após completar este período o material foi filtrado e o solvente rotoevaporado para concentração do analito de interesse. O processo foi repetido até completa exaustão a extração com o propósito de se obter um extrato com maiores teores de azadirachtina. Ao fim do processo foram obtidos 150 g de extrato seco de neem.

4.3 - Validação do método analítico para quantificação de azadirachtina por CLAE-UV

Para o controle de qualidade dos produtos de neem em desenvolvimento foi necessário a seleção de um método de análises, sendo escolhida a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Este método foi desenvolvido usando um equipamento modulado com um cromatógrafo Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) configurado com desgaseificador G1322A, bomba quaternária G1311A, auto-injetor G1329A, forno de coluna G1316A e detector de ultravioleta G1314B (Figura 4.1). Para a separação cromatográfica foi utilizada uma coluna C18 Xtimate™ (4,6 x 150mm, 5 µm da Welch Materials, Inc., Shanghai, China).



FIGURA 4.1 - Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência Agilent 1200 Series com detector de ultravioleta (CLAE-UV).

As análises cromatográficas foram realizadas no modo isocrático de eluição. A fase móvel consistiu de uma mistura de água: acetonitrila (65:35, v/v) com vazão de 1,0 mL.min⁻¹ e tempo de eluição de 15 min, a temperatura da coluna foi mantida em 35°C e o volume de injeção de azadirachtina foi de 10,0 µL e comprimento de onda de detecção fixado em 217 nm ($\lambda_{\text{máx}}$ absorção). O controle do equipamento CLAE-UV, aquisição e processamento dos dados foram realizados pelo *software Analyst*® 1.5.1 (Applied Biosystems).

4.4 - Preparação das soluções padrão para construção da curva de calibração

A validação do método foi realizada seguindo as instruções da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003), observando parâmetros como estabilidade da amostra, seletividade do método, recuperação, efeito da matriz, limites de detecção e quantificação (LOQ), linearidade, precisão.

Para a quantificação da aza-A foi preparada uma solução estoque, dissolvendo com precisão $10,0 \pm 0,1$ mg do padrão de azadirachtina em 10,0 mL de MeOH (J.T. Baker, grau LC-MS) em um balão volumétrico de 10,0 mL (Pyrex®) e armazenado a -5°C . A solução estoque preparada apresentou concentração nominal de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. A faixa linear de trabalho foi estabelecida entre 1,00 e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (valor nominal).

A partir da solução padrão foram preparadas soluções para a construção da curva de calibração. As soluções da curva de calibração foram preparadas por diluição da solução padrão nas seguintes concentrações: 1,00; 5,00; 10,0; 20,0; 40,0; 60,0; 80,0 e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Todas as soluções foram preparadas em triplicata. Essas soluções foram utilizadas para avaliar a curva de calibração, linearidade, intervalo dinâmico linear, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) do método. Outras três soluções padrões de azadirachtina (1,20; 60,0 e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram preparadas independentemente em quintuplicata, a partir da solução de trabalho de azadirachtina ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$), seguindo o procedimento descrito anteriormente para representação do controle a baixa, média e alta qualidade (LQC, MQC e HQC, respectivamente), para avaliar a exatidão e precisão do método.

A linearidade da curva de calibração foi obtida através do cálculo de análise da regressão linear, usando a área do gráfico obtido mediante a integração dos picos dos cromatogramas da azadirachtina nas diferentes concentrações das soluções versus a concentração nominais usando a metodologia linear de mínimos quadrados. Foram utilizadas oito concentrações diferentes de 1,00 a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, com três repetições para cada valor. A regressão linear ponderada (1/x) foi aplicada para minimizar a variância desigual dos valores mais elevados. A linearidade foi avaliada por meio do coeficiente linear de correlação (R^2) e mediante as análises dos respectivos fatores de resposta (ou seja, área de pico dividida pela concentração de cada amostra padrão).

O limite de quantificação foi obtido diluindo sucessivamente a solução estoque de azadirachtina ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) até observar uma relação sinal/ruído (S/N) de 10. Por outro lado, no limite de detecção (LOD), foi utilizada uma proporção de três vezes a relação S/N. A precisão foi avaliada como intra-dia (repetibilidade) e inter-dia (precisão intermediária). Quintuplicata das soluções de azadirachtina em concentrações baixas, médias e altas (1,20; 60,0 e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente), com relação à curva de calibração, foram preparadas e utilizadas como padrões para avaliação. O desvio padrão relativo (RSD) foi utilizado para avaliar a precisão, com um dia de resultados utilizados pela repetibilidade e três dias consecutivos utilizados pela precisão intermediária. A exatidão foi medida aplicando o método de quantificação às amostras e avaliando a porcentagem de viés ou tendência. As concentrações das amostras foram as mesmas usadas na determinação da precisão.

4.4.1 - Análises estatísticas

Para confirmação da validação do método analítico, foi realizada análise de variância de um único fator (ANOVA) com os dados da regressão linear para avaliar o significado do método de proposta. A significância estatística foi definida em p -valor $<0,05$, indicando que o modelo é explicado pela regressão proposta em um intervalo de confiança de 95%.

4.4.2 - Preparo de amostras para análise quantitativa por CLAE-UV

O extrato metanólico e óleo das sementes de neem obtido foram submetidos a processos de pré-tratamento por extração em fase sólida usando cartucho SPE para garantir à manutenção da sensibilidade, seletividade e robustez do método analítico, bem como a preservação do equipamento e colunas cromatográficas. As amostras dos extratos metanólicos e óleos de neem foram submetidos aos procedimentos de limpeza para eliminação das impurezas conforme FORIM *et al.* (2010). Um cartucho Chromabond® Cyano de 100 mg e leito de 1,00 mL foi condicionado em 5,00 mL de *n*-hexano sem deixá-lo secar. Dissolveu-se 25,0 mg de cada amostra em 1000 μL de *n*-hexano, aplicando-o ao cartucho. O tubo que continha a amostra, foi lavado com mais 1000 μL de *n*-hexano, o qual também foi aplicado ao cartucho. Após aplicar a

amostra no cartucho, elui-se o cartucho completamente retirando os interferentes mais apolares (lavagem). Após a lavagem do cartucho com *n*-hexano, lavou-se o tubo da amostra com 1000 µL de MeOH o qual foi transferido para o cartucho. Elui-se o cartucho com o MeOH sendo, em seguida, novamente eluído com mais 1000 µL de MeOH. O MeOH foi usado para a remoção dos analitos de interesse do cartucho. Foi usada a câmara a vácuo (Manifold-Varian) acoplada a uma bomba de vácuo, trabalhando a uma pressão próxima a 70 mmHg onde os cartuchos eram incorporados e o fluxo de lavagem e eluição mantidos constantes. As frações metanólicas foram secas em *Speed Vac* Labconco (Bomba de vácuo, centrífuga, e “*Cold Trap*”) a 48°C durante 60 min sendo, então, reconstituídas em 1,00 mL de MeOH.

Estando as amostras prontas, foram analisadas por CLAE-UV no método desenvolvido e os dados posteriormente processados no *software* Analyst[®] 1.5.1 (*Applied Biosystems*).

4.5 - Preparação das nanopartículas em suspensão coloidal

As nanocápsulas e nanoesferas em suspensão coloidal foram formuladas por duas técnicas principais: (a) Nanoprecipitação do polímero pré-formado (NPPT) e (b) Nanoemulsão/Interfacial Deposição/Deslocamento do Solvente (NIDDS) conforme Fessi et al. (1989) e Forim et al. (2013). Ambas técnicas empregaram polímeros pré-formados.

4.5.1 - Preparo de nanopartículas por nanoprecipitação (NPPT)

Uma fase orgânica contendo o biopolímero, um tensoativo de baixo equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL), os extratos de neem (substância ativa) a encapsular e óleo de neem, foram vertidos lentamente pelo uso de uma bomba peristáltica (Watson-Marlow/TPM 600 55RPM) operada a 3% de sua capacidade máxima, sob agitação constante num agitador magnético (RT10P/IKA[®]) sobre uma fase aquosa, composta de água aquecida a 40°C e um tensoativo de elevado EHL, conduzindo a formação imediata das nanopartículas. A Figura 4.2 ilustra o processo de NPPT.

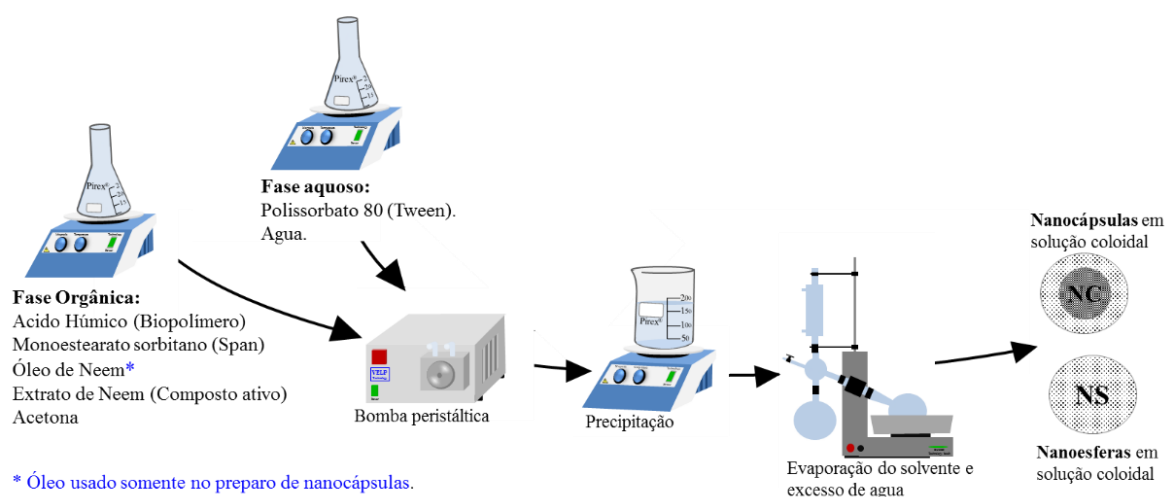


FIGURA 4.2 - Representação do método de nanoprecipitação para a preparação das nanopartículas em suspensões coloidais pelo método NPPT.

A suspensão resultante foi mantida sob agitação por 10 min à temperatura ambiente. Para a formulação de nanoesferas, o processo ocorreu nas mesmas condições, com exceção da presença do óleo na fase orgânica. A solubilização do polímero no solvente utilizou-se um banho a $45 \pm 2^\circ\text{C}$ e agitação magnética por 30 min. Após da formação das nanopartículas, o solvente e a parte da fase aquosa foram eliminados num evaporador rotativo, ajustando-se o volume a 100 mL. A composição qualitativa e quantitativa padrão das formulações são apresentadas na Tabela 4.1.

TABELA 4.1 – Composição das suspensões coloidais preparadas pelo método de NPPT

Composição	Formulação	
	NC	NS
Fase orgânica		
Pol.-Ácido Húmico	250 mg	250 mg
Span [®] 60	195 mg	195 mg
Óleo de Neem	775 mg	∅
Extrato de Neem*	60,0 mg	60,0 mg
Acetona/Etanol	65,0 mL	65,0mL
Fase aquosa		
Tween [®] 80	195 g	195 g
Água destilada	135 mL	135 mL

∅ Ausência de óleo de neem (Só pela formação de nanoesferas)

NC: Nanocápsulas; NS: Nanoesferas

4.5.2 - Preparo de nanopartículas por Nanoemulsão Interfacial Deposição Deslocamento do Solvente (NIDDS)

O método NIDDS é baseado na espontânea emulsificação de uma fase interna orgânica contendo o polímero dissolvido em uma fase aquosa externa (FORIM *et al.*, 2013). Este método foi desenvolvido no grupo de pesquisa de Produtos Naturais do DQ/UFSCar. Contudo, o método permite só a formação de nanocápsulas. O esquema geral pode ser observado na Figura 4.3.

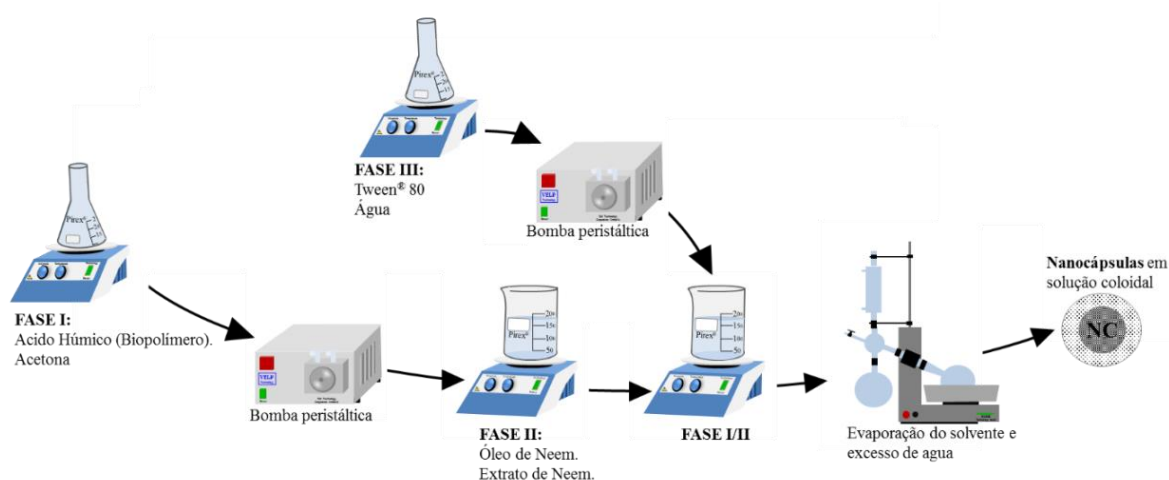


FIGURA 4.3 - Representação do método de nanoprecipitação para a preparação de nanocápsulas em suspensões coloidais pelo método NIDDS

Inicialmente, há formação de uma nanoemulsão óleo/água (FASE III) obtida sob vigorosa agitação por 5 min do óleo vegetal e o produto natural a ser nanoencapsulados (IKA® T10 basic Ultra-turrax®), contendo o tensoativo de baixo equilíbrio hidrofílico-lipofílico no meio de dispersão aquosa. Em seguida, uma solução (FASE I) de acetona contendo o biopolímero previamente dissolvido a $45 \pm 2^\circ\text{C}$ foi vertida lentamente com o auxílio de uma bomba peristáltica (Watson-Marlow/TPM 600 55RPM) operada a 3% de sua capacidade máxima na nanoemulsão (FASE II) sob agitação. Após 10 min de estabilização ao sistema FASE I + FASE II foi vertido sob agitação (RT10P/ IKA®) uma terceira fase aquosa (FASE III), contendo um tensoativo de elevado equilíbrio hidrofílico-lipofílico para garantir a estabilidade da dispersão coloidal.

Após a junção das três fases, o sistema permaneceu por um período de 10 min, sob agitação moderada (480 rpm/RT10P/IKA®), e mais 30 min em repouso.

Finalmente o solvente e parte da água foi retirada do sistema sob vácuo ajustando o volume final da dispersão coloidal em 100 mL. A composição qualitativa e quantitativa padrão da formulação são apresentadas na Tabela 4.2.

TABELA 4.2 - Composição das suspensões coloidais a serem preparadas pelo método de NIDDS

Composição	Quantidade	Solvente
FASE I		
Biopolímero – Ácido Húmico	250 mg	Acetona – 65,0 mL
FASE II		
Óleo de Neem	775 mg	Água – 75,0mL
Extrato de Neem	60,0 mg	
FASE III		
Tween® 80	195 mg	Água – 60,0 mL

Após o desenvolvimento das suspensões coloidais NC e NS na ausência do composto ativo (extratos de neem) foram preparadas também através dos mesmos métodos (NC-branco, NS-branco), com a finalidade de serem utilizadas como controles na avaliação da atividade biológica.

4.6 - Etapas de preparo das amostras

4.6.1 - Quantificação total da Azadirachtina na suspensão coloidal

As suspensões coloidais (100 µL) foram tratadas com acetona (900 µL) para promover a dissolução das nanopartículas. Após homogeneização em agitador (Vortex) e repouso por 60 min, uma alíquota de 500 µL foi retirada da solução, transferida para tubo eppendorf e centrifugada por 30 min a 14.000 rpm. Após término da centrifugação, uma alíquota de 200 µL do sobrenadante foi retirada e seca. O material seco foi então resuspenso em 200 µL de MeOH e analisado por CLAE-UV. A determinação do teor total de azadirachtina das suspensões coloidais foram determinadas após o cálculo da área do gráfico obtido mediante a integração dos picos cromatográficos na quantificação da azadirachtina através da curva de calibração e atendendo a seguinte equação:

$$C = [(C_0 \times V_{ress} \times V_{dil}) / (V_{seco} \times V_{amost})] = mgL^{-1}$$

Onde: C_o é a concentração da amostra em solução, V_{ress} o volume de ressuspensão para análises por CLAE, V_{dil} o volume final após a diluição para pré-tratamento, V_{seco} o volume de amostra seca após centrifugação, e V_{amost} alíquota da suspensão coloidal submetida a análise.

4.6.2 - Quantificação do teor da Azadirachtina nos produtos nanoencapsulados

Para avaliar o teor do composto bioativo encapsulados, foi necessário quantificar o teor do composto bioativo livre, não encapsulada no meio de dispersão (meio aquoso). Através da técnica de centrifugação, foi promovida a separação do material disperso (nanopartículas) e do meio de dispersão em duas fases heterogêneas. Assim, após o preparo da suspensão coloidal, transferiu-se uma alíquota de 500 μL para tubo de centrífuga Spin (Costar[®] Spin-X[®], 2,00 mL) com filtro Acetato de celulose 0,22 μm centrifugando por 40 min a 8.000 rpm. Após a separação das fases, uma alíquota de 200 μL da fase aquosa foi seca e ressuspensa com 200 μL metanol e analisado por CLAE-UV. A determinação do teor da azadirachtina nos produtos nanoencapsulados foi determinada mediante a seguinte equação:

$$C_{aquoso} = [(C_o \times V_{ress}) / (V_{seco})] = \text{mgL}^{-1}$$

Onde: C_o é a concentração da amostra em solução, V_{ress} o volume de ressuspensão para análises por CLAE, e V_{seco} o volume de amostra seca após centrifugação.

4.7 - Preparações de nano/micropartículas em pó secas por aspersão

4.7.1 - Preparação de Nanocápsulas e Nanoesferas em pó

Entre as diversas técnicas de encapsulamento, a secagem por pulverização de uma emulsão/suspensão/solução através da técnica de *Spray-Drying* é das mais usadas amplamente na produção do pó, onde o componente ativo é disperso na matriz (SHAHIDI *et al.*, 1993). A Figura 4.4 ilustra o funcionamento de um Spray-Dryer de Büchi (Mini Spray Dryer Büchi B-290, Büchi Laboratories, Switzerland).

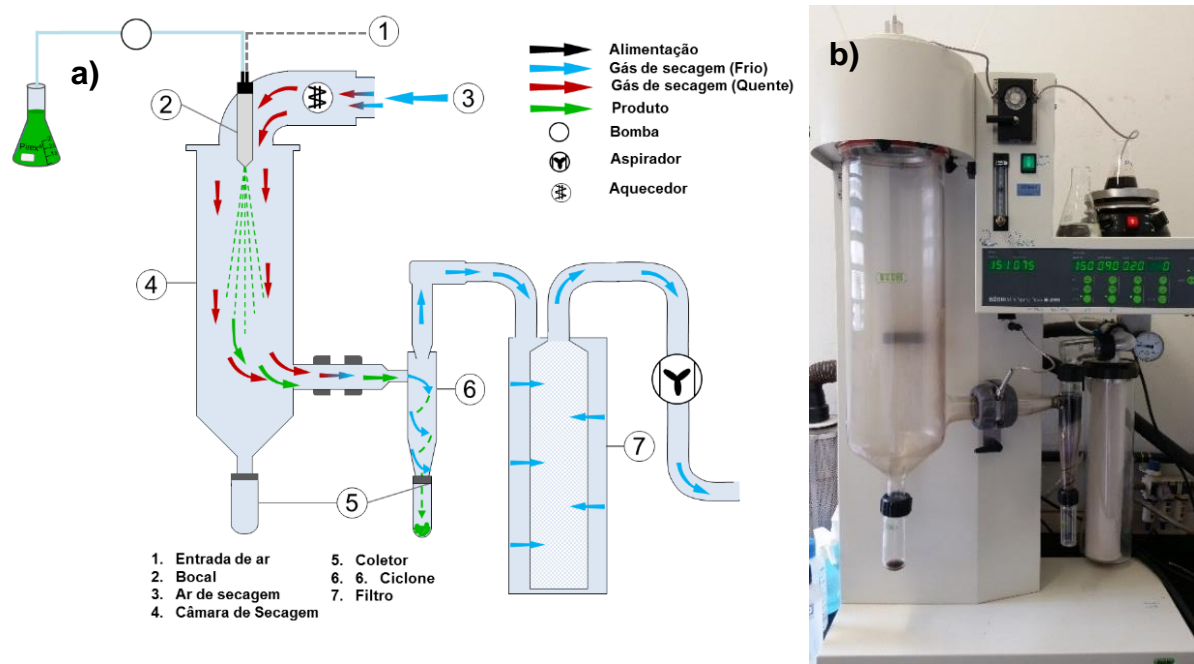


FIGURA 4.4 – Funções e características do *Spray-Dryer*. a) diagrama esquemático de pulverização por *Spray-Dryer*, b) Mini *Spray-Dryer* Büchi B-290 (Büchi Laboratories, Switzerland)

As suspensões coloidais contendo as nanocápsulas e nanoesféricas foram secas num Mini *Spray-Dryer* (B-290/Büchi) pelo método da secagem por aspersão tendo como suporte de avaliação de secagem os ácidos húmicos utilizados inicialmente nas formulações como biopolímeros. Durante o processo foi mantida uma homogeneização constante sob agitação magnética (480 rpm/CERAMAG Midi/IKA®). Os ácidos húmicos foram conduzidos à avaliação durante o processo de secagem em função da qualidade como suporte de secagem frente a polímeros como o poli-(ϵ -caprolactona) (PCL) ou biopolímeros como a lignina, utilizados na obtenção de nanopartículas em pó contendo princípios ativos encapsulados. Também foram avaliados os rendimentos em função do volume (vazão) e viscosidade do meio de dispersão.

O Mini *Spray-Dryer* foi operado no modo contracorrente equipado com duas agulhas de fluídos. Uma agulha atomizadora com orifício de 0,7 mm foi utilizada juntamente com ar comprimido como gás atomizador. Os parâmetros operacionais do *Spray-Dryer* utilizados inicialmente são descritos na Tabela 4.3.

TABELA 4.3 - Parâmetros operacionais para aspersão de produtos formulados mediante o Mini *Spray-Dryed* Büchi® B-290

Parâmetros	Valor
Fluxo de alimentação	7,50 mL/min
Fluxo de ar	530 L/h
Pressão de ar comprimido	0,55 bar
Temperatura de entrada do ar de secagem	125°C ±5°C
Temperatura de saída do ar de secagem	50°C ±5°C
Diâmetro do atomizador	0,7 mm
Sistema de aspiração	95% (38 m ³ /h)

Os rendimentos da operação de secagem foram calculados com base nas massas totais dos sólidos presentes nas suspensões coloidais, massas dos componentes das formulações, e da massa do adjuvante de secagem em comparação com as massas finais obtidas após do processo de secagem. O cálculo de rendimento foi determinado mediante a seguinte equação:

$$Rendimento (\%) = [M_{seco}/M_N] \times 100$$

Onde: M_{seco} é a massa do material seco após do processo de secagem e M_N a massa nominal.

4.8 - Caracterização das formulações

A caracterização dos produtos em suspensão coloidal e secos por aspersão foram avaliadas com o propósito de determinar a estabilidade e propriedades como tamanho de partícula, potencial zeta, teor de azadirachtina nos produtos secos, pH nas suspensões coloidais e a morfologia das nanopartículas formadas, que são geralmente os parâmetros físico-químicos utilizados para monitorar a estabilidade dos produtos formulados (FESSI *et al.*, 1989; GUTERRES *et al.*, 1995; LACOUILONCHE *et al.*, 1999).

4.8.1 - Doseamento de azadirachtina nos produtos secos por aspersão

Todos os nebulizados teve os teores do composto bioativo determinados por CLAE. As amostras foram preparadas tratando os nebulizados com acetona a fim de proceder a dissolução do polímero e liberação do conteúdo do produto natural

presente nas nanopartículas. A metodologia empregada compreende a adição de 5,00 mL de acetona em 25,0 mg de pó nebulizado. Após homogeneização em agitador de tubos (Vortex), a dispersão foi mantida em repouso por 60 min. Após a total dissolução do polímero, uma alíquota de 0,5 mL foi transferida para tubo eppendorf e centrifugada por 30 min a 14.000 rpm (10°C). Após centrifugação, uma alíquota de 200 µL do sobrenadante foi retirada e seca. Por fim, o material seco foi então ressuspensionado em 200 µL de metanol e analisado por CLAE-UV. O doseamento da azadirachtina nos produtos secos por aspersão foram calculados mediante a seguinte equação:

$$C_{NC,NS,pó} = [(C_o \times V_{ress} \times V_{dil}) / (V_{seco} \times V_{amost})] \times 1000 = mgKg^{-1}$$

Onde: $C_{NC, NS, pó}$ é o conteúdo de azadirachtina nos pós de NS e NS, C_o a concentração da amostra em solução, V_{ress} o volume de ressuspensão para análises por CLAE, V_{dil} o volume final após a diluição para pré-tratamento, V_{seco} o volume de amostra seco após centrifugação, e V_{amost} alíquota da suspensão coloidal submetida a análise.

4.8.2 - Determinação do pH das soluções coloidais

Os valores de *pH* das suspensões foram determinados diretamente nas suspensões através do potenciômetro (Modelo 827/Metrohm), previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e pH 7,0. O pH foi medido em triplicata logo após do preparo e em intervalos de dias conhecidos para avaliação da estabilidade das suspensões (10, 20, 30, 40, 50 e 60 dias).

4.8.3 - Análise morfológica das soluções coloidais e dos produtos secos por aspersão

A análise morfológica (superfície e diâmetro de partícula) foi realizada em todas as amostras por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), a fim de avaliar as características morfológicas após o processo de secagem. Para avaliar a homogeneidade das suspensões coloidais e formato das nanopartículas obtidas, 100 µL de cada amostra em suspensão coloidal foram adicionados e secos diretamente em suportes metálicos de alumínio, enquanto aos produtos secos foram utilizados 5 mg, respectivamente. Finalmente, todas as amostras foram metalizadas em ouro e

fotomicrografadas utilizando-se aumentos de 100 a 80.000 vezes. As análises foram realizadas no Laboratório de Caracterização Estrutural do Departamento de Engenharia de Materiais/UFSCar utilizando-se um microscópio Philips XL 30 FEG, Figura 4.5.



FIGURA 4.5 - Microscópio de varredura eletrônica Philips XL30 MEV-FEG

4.8.4 - Estudo da fotodegradação das nanopartículas em suspensões coloidais e dos produtos secos por aspersão

Foi realizado um estudo de fotodegradação acelerado com as suspensões de nanopartículas contendo o padrão de aza-A e seus produtos secos por aspersão correspondente, em câmara de fotoradiação controlada simulando parâmetros ambientais. A câmara foi constituída por um conjunto de 4 lâmpadas ultravioleta Actinica Philips 450 mm, 15W (380-480 nm) que simulam a radiação no espectro do UV-A e UV-B. A câmara é toda revestida com espelhos para maior aproveitamento da radiação. Os espelhos apresentam uma superfície altamente refletora com perdas mínimas de luminosidade. O sistema foi mantido com temperatura controlada a $30,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ por um sistema de circulação de ar termostaticado, Figura 4.6.



FIGURA 4.6 - Câmara de envelhecimento acelerado por luz ultravioleta

As amostras sólidas foram colocadas em vidro relógio e as amostras líquidas em béquer sendo periodicamente homogeneizadas. Foram realizadas coletas após 24, 36, 48 e 72 h de exposição à radiação para as amostras em pó e 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, e 72 h de exposição à radiação para as suspensões coloidais. Um controle foi analisado colocando uma amostra líquida e outra sólida na câmara envoltas em papel alumínio ao abrigo da radiação para verificar possíveis influências da temperatura sobre a degradação. Todas as amostras foram analisadas por CLAE-UV.

4.8.5 - Determinação do potencial Zeta e diâmetro de partículas

As Análises de determinação do diâmetro de partícula (DP) em nanômetros foram obtidas mediante as análises de difusão dinâmica da luz num NanoZen 3600 da Malver na temperatura ambiente num ângulo fixo de 90° após de diluir cada amostra em quintuplicara das suspensões coloidais e produtos secos por aspensão em relação a 1:8, 1:100, 1:1000 e 1:10000 de água Milli-Q. Esta técnica possibilitou obter o diâmetro hidrodinâmico médio das nanopartículas e o índice de polidispersividade.

A avaliação do potencial zeta (ζ) em milivoltz foi realizada no equipamento citado pela determinação do diâmetro de partícula. As amostras foram preparadas em relação a 1:8, 1:100, 1:1000 e 1:10000 em água Milli-Q. Todos os valores foram reportados pela média \pm desvio padrão da quintuplicata das diferentes medidas.

5.1.1 - Estudos de liberação *in vitro* para nanopartículas em suspensão coloidal

Os estudos de liberação *in vitro* das nanopartículas em suspensão coloidal foram realizados pela técnica de difusão de bolsas de diálise proposta por Levy e colaboradores (LEVY *et al.*, 1990). Bolsas de diálise (*Dialysis tubing cellulose membrane*, 0.4 de *Sigma Aldrich*) com 1,00 mL da suspensão coloidal foram seladas e adicionadas em água ultrapura com agitação constante. O sistema foi mantido a 30°C com uma vazão contínua de 3.00 mL min⁻¹ de solução tampão fosfato isotônico (pH 7,4) controlado com bomba peristáltica (55 rpm/TPM600/PumpPro). Em intervalos de tempo específicos, uma bolsa de diálise era retirada do meio e o conteúdo do composto bioativo remanescente na bolsa analisada por CLAE-UV. Os valores foram reportados em média ± desvio padrão correspondente a três diferentes lotes, (n=3). A cinética de liberação foi determinada após o cálculo do valor de *n* (ordem de cinética) proposto por Korsmeyer *et al.*, (1983) pela seguinte equação empírica:

$$M_t/M_\infty = K \cdot t^n$$

Onde *M_t* representa a quantidade do princípio ativo liberado com respeito ao um determinado tempo *t*, *M_∞* a quantidade do princípio ativo liberado num tempo infinito, *k* é a constante cinética de liberação e *n* o expoente de liberação; O modelo de KORSMEYER *et al.* (1983) é usado geralmente para análises de liberação de um princípio ativo de uma matriz polimérica quando este não é bem conhecido ou quando um ou mais tipos de fenômenos estão envolvidos. A linearização da equação anterior através da construção do gráfico de *ln M_t/M_∞* em função de *ln t*, fornece o expoente de liberação (*n*) e a constante de liberação (*k*, tempo-*n*) (MELO *et al.*, 2010).

4.9 - *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

Com o propósito de avaliar a eficiência do extrato das sementes de *Azadirachtina indica* A. Juss. nano e microencapsulado, diversos ensaios biológicos foram realizados com a espécie *S. frugiperda*. Os bioensaios foram desenvolvidos no Laboratório de Bioensaios do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Campus de São Carlos – SP, à temperatura de 25 ± 1°C, umidade relativa de 70 ± 5% e fotofase de 12 h. Para a realização dos ensaios foi

utilizada uma dieta artificial desenvolvida por KASTEN JR *et al.* (1978), sendo preparada com água destilada (600 mL), ágar (10,3 g), extrato de levedura (25,3 g), gérmen de trigo (39,6 g), ácido sórbico (0,80 g), ácido ascórbico (2,60 g), formaldeído 40% (6,30 mL), tetraciclina (50,0 mL), nipagin (1,10 g) e feijão do tipo carioca cozido (82,5 g).

A dieta artificial recebeu o extrato de neem, os produtos formulado se os controles, quando esta atingiu temperatura de 50°C, sendo devidamente homogeneizado (MATOS *et al.*, 2006; MATOS *et al.*, 2009). Em cada tratamento, foi incorporado uma quantidade de produto formulado à dieta artificial para *S. frugiperda*, na proporção de 20,0 mg para cada 200 g de dieta (100 mg kg⁻¹), que corresponde à massa de 2,00 mg de azadirachtina, substância utilizada para monitoramento entre a atividade do extrato formulado e não formulado. O extrato de Neem não formulado foi analisado para comparação com o extrato formulado com o ácido húmico. Além da dieta correspondente a cada formulação, também foi preparado um experimento controle, isento de extratos de neem ou produtos formulados (testemunha).

Depois de preparadas, as dietas foram vertidas em tubos de vidro (8,5x2,5 cm), previamente esterilizados em estufa a 170°C, por 1 h, e em seguida fechados com algodão hidrófobo. Após inserir a dieta, os tubos foram mantidos em temperatura controlada de 25°C por 24 h, para eliminação do excesso de umidade. A seguir, foi feita a inoculação das lagartas recém-eclodidas de *S. frugiperda*, utilizando-se uma lagarta por tubo. Foram utilizadas 20 lagartas para cada tratamento. Durante o período de análise, os tubos inoculados foram mantidos em estufa com fotofase (122FC/Eletrolab) de 12 h a 25°C.

As pupas obtidas foram pesadas 24 h após a pupação, e transferidas para copos plásticos de 50,0 mL, onde permaneceram até a emergência dos adultos. Os parâmetros avaliados neste experimento foram as durações das fases larval e pupal, massa das pupas e porcentagem de insetos mortos (mortalidade) ao final de cada fase.

4.10 - Avaliação dos ácidos húmicos como agente fertilizante

Os ensaios de avaliação da capacidade fertilizante foram desenvolvidos no Laboratório de Bioensaios do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Campus de São Carlos – SP, à temperatura de 25 ± 1°C, umidade relativa de 70 ± 5% e fotofase de 12 h. Para a realização da avaliação foram

germinadas 12 sementes de milho utilizando substrato de cultivo com adição dos produtos formulados com ácidos húmicos por 15 dias e com aspersão de água a cada 24 h. Para o ensaio foram utilizados de 15 a 45 mg dos produtos formulados com ácidos húmicos, mantendo-se um controle sem alterações (só o substrato) para o monitoramento do ensaio e uma solução dos extratos de neem utilizados na formulação.

Após 15 dias de germinação das plantas de milho foram determinadas as dimensões das diferentes partes da planta, as quais foram pesadas para avaliação comparativa do crescimento dos ensaios. Os dados foram analisados estatisticamente para examinar a relação entre cada ensaio.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Obtenção do extrato das sementes de *Azadirachta indica* A. Juss.

Este trabalho objetivou desenvolver um produto formulando-se nanopartículas biopoliméricas com ácidos húmicos carregadas com uma mistura de substâncias bioativas a partir do extrato das amêndoas das sementes de *Azadirachta indica* A. Juss. para obter um produto natural formulado com ação inseticida-fertilizante. A aza-A é um tetranortriterpeno e uma das principais substâncias biologicamente ativa desta espécie, possuindo propriedades inseticidas diversas (DHIR, 2017). A aza-A é encontrada em altas concentrações nas sementes de *A. indica* A. Juss., assim como outras substâncias que contribuem com a atividade inseticida, como a azadirachtina B (Aza-B), a deacetilnimbina, a acetil-salannina, nimbina, salannina, entre outras (BENELLI *et al.*, 2017; CABONI *et al.*, 2006; HALDAR, 2014).

A Aza-A é um limonoide que interfere no processo normal da metamorfose dos insetos, reduz a fertilidade, crescimento, oviposição e a alimentação dos insetos (SCHMUTTERER, 1990; SCUDELER *et al.*, 2014). Além disso, é encontrada em qualquer parte do vegetal; no entanto em concentrações mais elevadas são obtidas a partir das sementes (DAI *et al.*, 2001). O conteúdo de aza-A nas sementes de *Azadirachta indica* A. Juss. varia de acordo com a localização geográfica (BOURSIER *et al.*, 2011; FAYE, 2010). O conteúdo de aza-A nas sementes pode ter variações entre 1.05-1.54 g kg⁻¹ (TOFEL *et al.*, 2015). No entanto GRUBER (1991), BOURSIER *et al.* (2011) e FAYE (2010) encontraram conteúdos de aza-A nas sementes de *A. indica* A. Juss. cultivadas na

Nicarágua, Mali e Senegal, com conteúdo de 4.0, 3.5 e 2.0 g kg⁻¹ respectivamente. Por tanto, os extratos das sementes de neem foram selecionados para o desenvolvimento deste trabalho visando à resposta biológica esperada para uma formulação inseticida-fertilizante.

Dentro dos diversos métodos de extração sólido-líquido se encontra a maceração, que é uma das técnicas mais utilizadas. Apresenta baixo custo e maior eficiência para a obtenção de extratos de origem vegetal, permitindo por meio de um solvente apolar a remoção inicial dos analitos menos polares para posteriormente utilizar um solvente polar e assim obter a extração do analito de interesse.

A extração por maceração como um dos métodos de extração sólido-líquido mais efetivo na obtenção dos extratos de neem foi selecionada visando uma máxima eficiência e seletividade na extração dos princípios ativos das amêndoas de sementes de neem, indicado para o preparo de extratos sólidos sem a necessidade futura de técnicas de fracionamento e separação (DE PAULA *et al.*, 2016; FORIM *et al.*, 2010). Nesse contexto, foi aplicada a extração permitindo a obtenção de 150 g do extrato metanólico das amêndoas de sementes previamente desengraxado com *n*-hexano, apresentando uma relação de 30% com respeito ao peso das amêndoas de sementes (5000 g) usadas antes da extração. Após a obtenção dos extratos das amêndoas de sementes de neem se procedeu um pré-tratamento mediante extração em fase sólida (SPE), aproveitando o mecanismo de separação da cromatografia líquida de baixa pressão que é usualmente empregada na eliminação dos interferentes da matriz (*clean up*), permitindo a eluição dos analitos e posteriormente a concentração do composto de interesse (aza-A). Assim, os extratos das amêndoas de sementes estariam preparados pelas análises de determinação do conteúdo teor de aza-A através do método analítico desenvolvido previamente.

5.2 - Validação do método analítico para quantificação de aza-A por CLAE-UV.

Pela necessidade de manter um controle de qualidade dos produtos à base em extratos de neem foi indispensável a implementação de uma referência quantitativa biologicamente ativa como aza-A, como principal constituinte inseticida, facilitando a avaliação da qualidade e autenticidade dos produtos. A importância da quantificação de aza-A nos produtos formulados com ação inseticida permitiu o acompanhamento

e avaliação da efetividade de nano/microencapsulamento nos diferentes processos de obtenção, assim como a quantificação na avaliação da estabilidade nos produtos finais de aplicação, permitindo avaliar a variação na concentração de aza-A com respeito ao tempo de ação, considerando fatores como temperatura, fotoestabilidade (ultravioleta), umidade, pH, *etc.* Por isso, se precisa da implementação de um método de validação para a determinação do conteúdo de aza-A nos extratos de neem e produtos formulados.

A validação do método analítico envolve processos através dos quais, estudos foram utilizados para garantir que o método em questão atenda às exigências desejadas, fornecendo evidências de que o método realiza o propósito que é indicado. A validação da eficiência do método analítico foi desenvolvida por FORIM *et al.* (2010) e revalidada no presente trabalho investigando a faixa linear de trabalho, seletividade, sensibilidade, exatidão e precisão, limite de quantificação e de detecção e recuperação.

5.3 - Validação do método

5.3.1 - Seletividade

O método de validação por CLAE-UV apresentou seletividade, pois verificou que no tempo de retenção de aza-A o cromatograma da injeção de uma amostra com fase móvel–controle, manteve a sua linha de base, não apresentando nenhum interferente. Desta forma, trabalhada as variantes oferecidas pela CLAE-UV na construção do método, como a utilização de uma coluna de fase reversa Xtimate™ C18 (4,6 x 150 mm, 5 µm), temperatura de 35°C, a fase móvel de melhor seletividade era constituída de água e acetonitrila (65:35; v/v), vazão 1,0 mL/min, volume de injeção de 10,0 µL e o comprimento de onda de 217 nm ($\lambda_{\text{máx}}$ absorção) na detecção no ultravioleta durante a corrida. O tempo total da eluição foi de 35 min. Obteve-se os cromatogramas com picos de resolução otimizada para o analito e amostras de interesse, como pode ser visualizado na Figura 5.1.

Na Figura 5.1 é possível observar um cromatograma geral ilustrando uma análise de extrato ou de produtos formulados onde se pode visualizar diversas substâncias presentes, além de uma análise do padrão analítico de aza-A e um controle isento de amostra. Através da análise visual da Figura 5.1 é possível observar

uma banda cromatográfica em 9,45 min referente a Aza-A com resolução maior que 1,5 ($R_s > 1.5$).

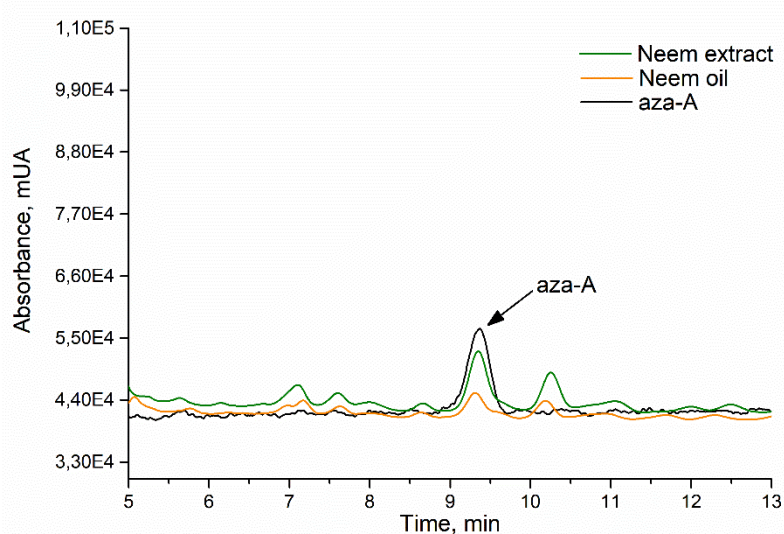


FIGURA 5.1 - Cromatograma de análises de azadirachtina. Solução de aza-A de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e extratos de neem. Condições: Xtimate™ C18 (4,6x150 mm, 5 μm), H₂O/ACN (65:35), 35°C, 1,00 mL/min, vol. inj. 10,0 μL , $\lambda = 217 \text{ nm}$, 35 min

5.3.2 - Faixa dinâmica de trabalho

A determinação da linearidade foi efetuada através da construção de uma curva de calibração da solução padrão de azadirachtina nas faixas de concentração: 1,00; 5,00; 10,0; 20,0; 40,0; 60,0; 80,0 e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, Figura 5.2.

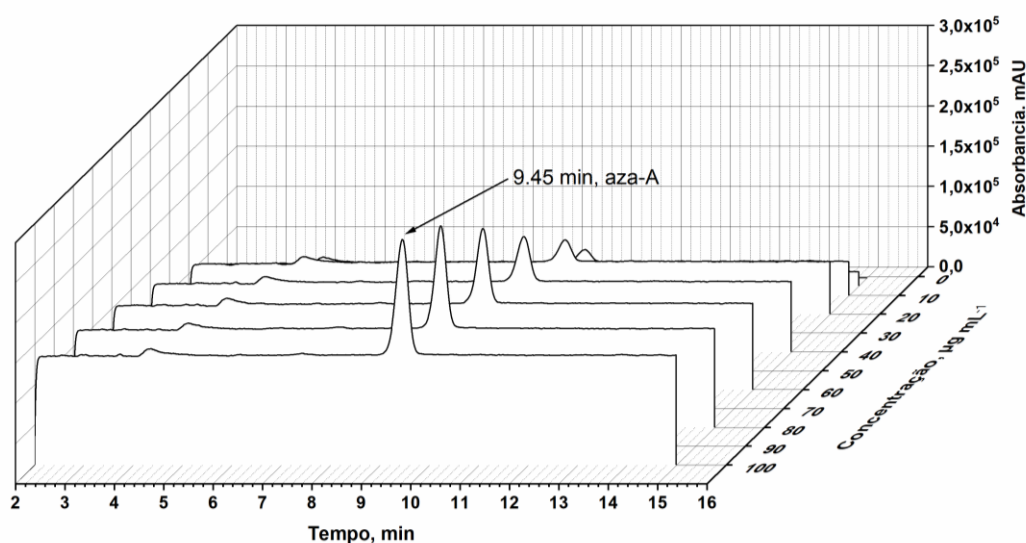


FIGURA 5.2 - Sobreposição dos cromatogramas da curva analítica de aza-A

Os valores experimentais obtidos para a construção da curva de calibração da azadirachtina por CLAE-UV estão apresentados na Tabela 5.1. Os parâmetros faixa de linearidade, equação de calibração, e coeficiente de determinação (R^2) relativos à curva de calibração estão na Tabela 5.2. Os valores dos tratamentos gráficos dos dados experimentais obtidos para curva de calibração estão apresentados na Figura 5.3.

TABELA 5.1 - Áreas absolutas obtidas na determinação da curva de calibração de aza-A por CLAE-UV

Concentração de azadirachtina (μmL)	Média das áreas absolutas			Média	DP	CV (%)
	Curva 1	Curva 2	Curva 3			
1,00	0,13	0,12	0,12	0,12	0,00	2,68
5,00	2,95	2,86	2,92	2,91	0,03	1,48
10,0	6,23	6,15	6,27	6,22	0,04	0,98
20,0	12,60	12,60	12,50	12,60	0,07	0,71
40,0	25,80	25,80	25,60	25,70	0,07	0,38
60,0	38,40	38,20	38,60	38,40	0,15	0,59
80,0	51,80	51,80	52,10	51,90	0,14	0,34
100	65,50	65,60	65,20	65,40	0,14	0,29

DP: Desvio padrão, CV (%): Coeficiente de variação

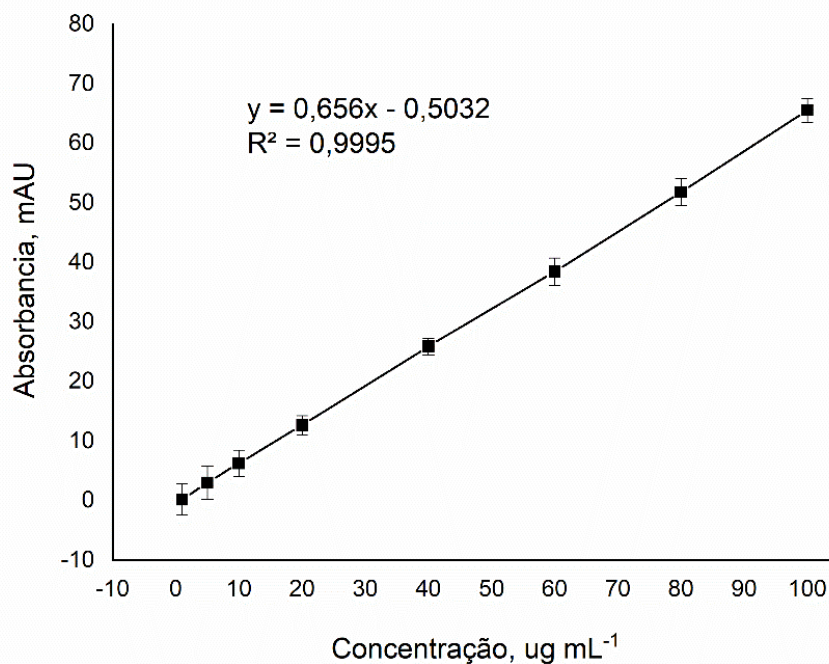


FIGURA 5.3 - Curva analítica das soluções padrões de aza-A

TABELA 5.2 - Parâmetros relativos à reta de calibração do método analítico para quantificação da aza-A

Parâmetro estatístico	aza-A
Faixa de linearidade ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,00 – 100,00
Equação da reta	$Y = (0,656 \pm 0,001)X - 0,503 \pm 0,001$
Desvio Padrão (s)	19,95
Coefficiente de determinação (R^2)	0,9995

TABELA 5.3 - Valores dos tratamentos estatísticos da regressão linear da curva de calibração de aza-A mediante CLAE

Estatísticas da regressão					
Coeficiente de correlação múltipla					0,99995
Coeficiente de determinação R^2					0,99953
R^2 ajustado					0,99959
Erro típico					0,25148
Observações (Amostras)					8
Análise de variância (ANOVA)					
	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Média dos quadrados	Valor crítico de F	Probabilidade
Regressão	1	4149,53	4149,53	$2,4 \times 10^{-13}$	0,0001
Resíduos	6	0,38	0,06		
Total	7	4149,91			

A avaliação da linearidade da curva de calibração de aza-A apresentou uma correlação linear estatística coerente entre a faixa de concentração entre 1,00 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O coeficiente de correlação (r) em 0,99995 mostra a relação dos eixos X e Y com um valor próximo a 1,000, indicando uma notável linearidade. O valor do coeficiente de determinação (R^2) em 0,99991 indicando a confiabilidade do modelo matemático aplicado. As análises de variância, com uma probabilidade ou valor- p de 0,01, onde o valor- p é menor a $p > 0,05$ rechaçando a hipóteses nula das médias iguais das absorbâncias nas concentrações de azadirachtina avaliadas na curva de calibração, assim como indicando que não apresenta diferença significativa entre as três curvas avaliadas, como é representado nas Tabela 5.1, 5.2 e 5.3 e na Figura 5.3, não havendo desvio da linearidade e tendo confiabilidade dos dados obtidos na avaliação.

5.3.3 - Exatidão e precisão do método analítico

A exatidão indica a correlação entre os resultados obtidos e os aceitos como verdadeiros, e pode ser analisado pelo cálculo da porcentagem média de

recuperações para o analito em três concentrações diferentes, assim como o desvio padrão relativo (SARKAR *et al.*, 2006). As três soluções padrão de azadirachtina como controle de qualidade (baixa, média e alta) de 1,20; 60,0 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ preparadas em quintuplicara e analisadas três dias não consecutivos ($n= 3$) foram escolhidas pela cobertura de toda a faixa de trabalho usada na construção da curva de calibração. A primeira concentração das soluções padrão de azadirachtina ($1,20 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi selecionada para serem 120% maior que o ponto no intervalo de resposta lineal. O segundo ($60,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e terceiro ponto ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) referem-se ao 60 e 100% dos pontos de concentração mais altos na curva de calibração, respectivamente. A recuperação total média e desvio padrão (DP) encontrados foram de $99,2 \pm 0,97\%$, mostrando a relação entre os valores teóricos e experimentais. Os resultados detalhados dos três níveis de concentração testados são apresentados na Tabela 5.4.

TABELA 5.4 – Resultados de precisão e exatidão intra e inter dias para três concentrações diferentes de soluções padrão de aza-A

Concentração do analito ($\mu\text{g/mL}$)	Dia	Média	Desvio Padrão (DP)	Coefficiente de variação (CV)	Exatidão (%)
Intra-dia ($n= 5$)					
1,20	1	1,19	0,01	0,46	99,50
60,0	1	59,7	0,53	0,88	99,40
100	1	99,80	0,90	0,90	99,80
1,20	2	1,18	0,02	1,52	98,20
60,0	2	59,40	0,84	1,42	99,00
100	2	99,30	0,74	0,74	99,30
1,20	3	1,19	0,03	2,20	98,80
60,0	3	59,50	0,73	1,22	99,20
100	3	99,60	0,67	0,67	99,60
Inter-dia ($n= 5$)					
1,20	-	1,19	0,01	1,10	99,00
60,0	-	59,70	0,31	0,52	99,60
100	-	99,00	1,09	1,10	99,00

A precisão foi determinada pelas análises das soluções padrão de azadirachtina em três níveis de concentração diferentes ($1,20; 60,0$ e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$), representada pelo desvio padrão (DP). Cada nível de concentração da solução padrão de azadirachtina foi preparado em quintuplicata, com um total de 15 amostras por dia. As soluções padrões de azadirachtina usadas para apela determinação da precisão foram avaliadas na faixa do intervalo linear de trabalho. A precisão intermediária, inter-

dia, foi determinada analisando três níveis diferentes de concentrações de soluções padrão de azadirachtina em três dias não consecutivos. Os resultados apresentados na Tabela 5.4 mostram coeficientes de variação obtidos da razão do desvio padrão pela média das áreas dos picos de cada concentração calculada, permitindo a avaliação da repetibilidade em cada nível de concentração das soluções, intra-dia ($n = 15$) e inter-dia ($n = 3$) foram 0,46% e 1,10%, respectivamente. Os resultados obtidos indicaram uma precisão satisfatória para o método analítico. Os dados de ANOVA resultaram com distribuição de Fisher (F) calculado de 3,39, inferior ao valor crítico para um F de 7,71, o que significa que os resultados obtidos em diferentes dias e níveis não foram estatisticamente diferentes.

5.3.4 - Limite de detecção e limite de quantificação

A sensibilidade de calibração da curva analítica pode ser definida pelo limite de quantificação (LQ) que representa a menor concentração em que a azadirachtina pode ser determinada por CLAE com precisão e exatidão aceitáveis, e o limite de detecção (LD) que representa a concentração da solução padrão de azadirachtina que teoricamente produz. Os limites de quantificação e detecção foram determinados de acordo com a relação sinal/ruído, sendo 2,31 e 0,77 vezes para LD e LQ , respectivamente. O limite de quantificação foi menor que o primeiro ponto da curva de calibração ($1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$, LQ real); provando ser linear, exato e preciso na faixa de trabalho utilizada na avaliação do método analítico.

TABELA 5.5 -Parâmetros relativos à curva de calibração do método analítico

Parâmetros	aza-A ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Faixa de linearidade	1,00 – 100,00
Limite de detecção	0,769
Limite de quantificação	2,308

A resposta dos resultados dos parâmetros avaliados na curva de calibração do método analítico pela quantificação de aza-A apresentaram condições reprodutível em comparação com o método analítico estabelecido inicialmente por FORIM *et al.* (2010), sendo viável para quantificação de azadirachtina nos extratos de neem e produtos formulados contendo os extratos.

5.4 - Quantificação do teor de aza-A no extrato e óleo de neem por CLAE-UV

Os extratos das amêndoas de sementes de neem foram submetidos a um pré-tratamento por extração em fase sólida usando cartucho *SPE* com o intuito de concentrar os compostos bioativos, como a azadirachtina, enriquecendo o extrato de trabalho com o principal princípio ativo. Pela quantificação de aza-A foi usado o método desenvolvido por FORIM *et al.* (2010), após a revalidação. A análise do teor de aza-A nas amostras de neem foi determinada a partir da média de três determinações de cada amostra e calculada com base na equação da reta obtida nos parâmetros relativos da curva calibração do método analítico para quantificação de aza-A, Tabela 5.2. Nos cromatogramas obtidos por CLAE (Figura 5.4 e 5.5) do extrato e óleo, após o pré-tratamento apresentaram um conteúdo teor de aza-A de 290,85 e 34.03 mg kg⁻¹ respectivamente, apresentados na Tabela 5.7.

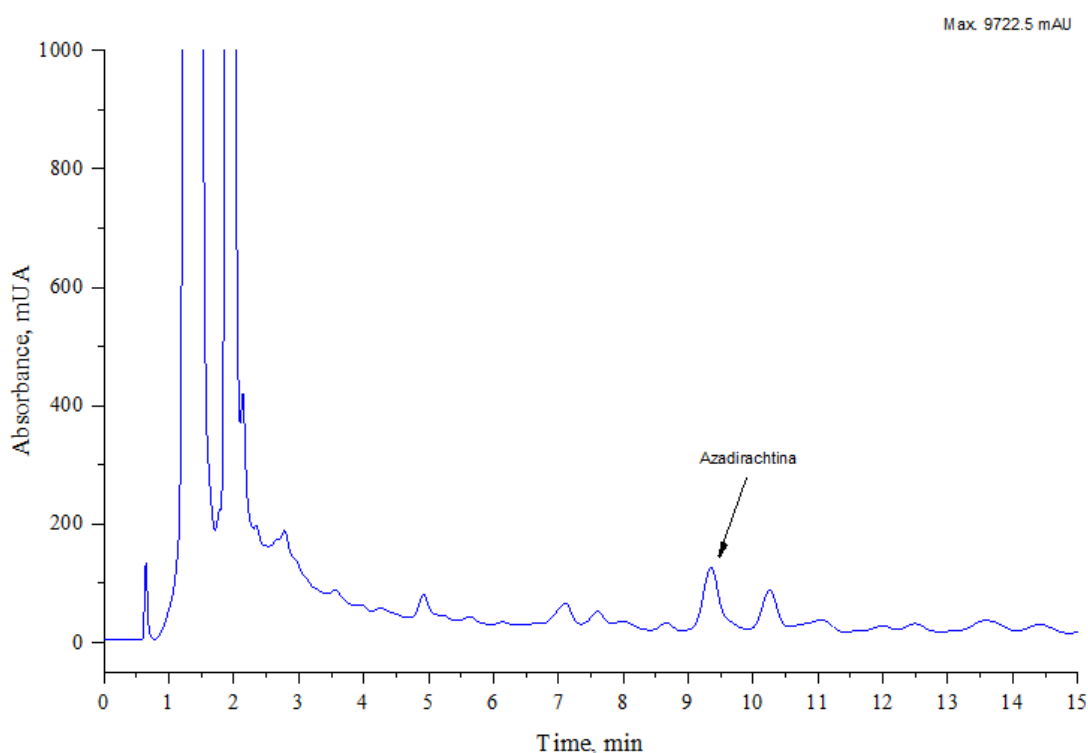


FIGURA 5.4 - Cromatograma de quantificação de aza-A no extrato de neem obtido por CLAE-UV. Condições: Xtimate™ C18 (4,6x150 mm, 5 μm), H₂O/ACN (65:35), 35°C, 1,00 mL/min, vol. inj. 10,0 μL, λ = 217 nm, 35 min.

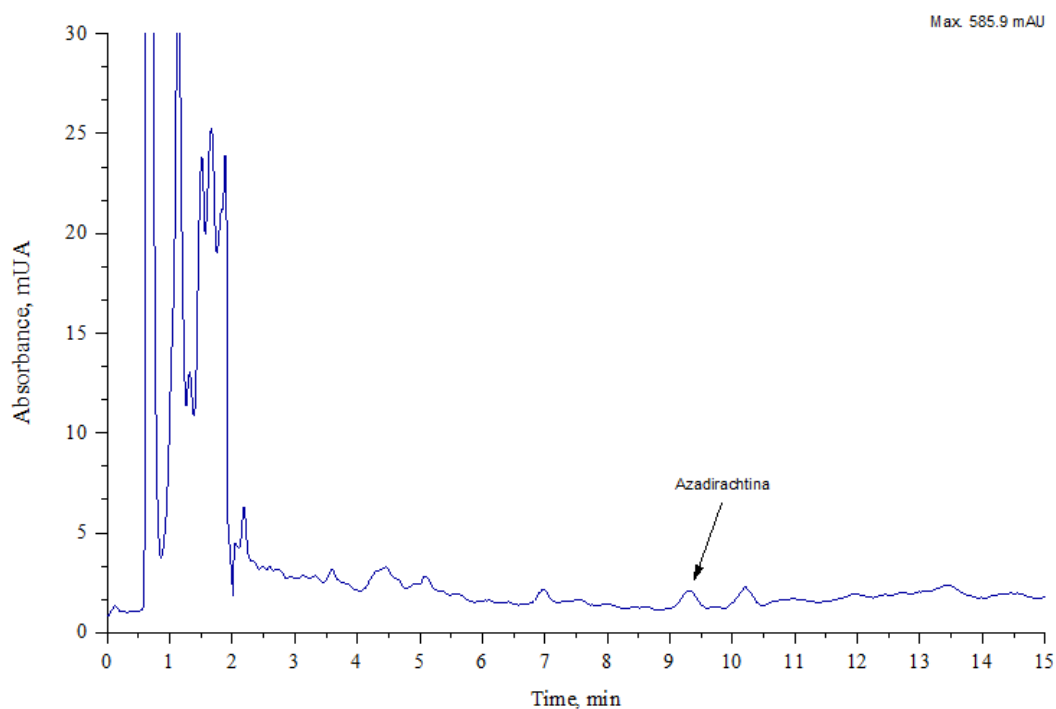


FIGURA 5.5 - Cromatograma de quantificação de aza-A no óleo de neem obtido por CLAE-UV. Condições: Xtimate™ C18 (4,6x150 mm, 5 µm), H₂O/ACN (65:35), 35°C, 1,00 mL/min, vol. inj. 10,0 µL, λ = 217 nm, 35 min.

TABELA 5.6 - Quantificação teor de aza-A no extrato metanólico e óleo de neem por CLAE-UV.

Amostra	Soluções	Concentração calculada (mg/kg)	Media da Concentração (mg/kg)	Desvio Padrão (DP)
Óleo de Neem	1	319,68	290,84	33,85
	2	290,84		
	3	252,22		
Extrato de Neem	1	38118,11	34032,33	2201,89
	2	34032,33		
	3	37498,16		

Os resultados do teor de azadirachtina nas amostras de neem apresentaram um conteúdo rico da principal substância inseticida de *Azadirachta indica* (COSTA *et al.*, 2016). O extrato de neem apresentou resultados consideráveis, alguns autores como TEIXEIRA *et al.* (2005) reportam conteúdos de aza-A de 3520,2 mg kg⁻¹, assim como FORIM *et al.* (2010) 32480 mg kg⁻¹ de aza-A em extratos. Posteriormente, os resultados obtidos anteriormente permitiram pelo elevado conteúdo do princípio ativo no extrato a possibilidade de uso do material vegetal para o processo de encapsulamento.

Consequentemente, o uso de menor quantidade de material vegetal diminui o custo de produção, facilita a formulação, reduz os riscos de incompatibilidade do material vegetal com os demais produtos como, por exemplo, o polímero e favorece na reprodutibilidade da ação biológica. Deste modo, o extrato de neem obtido e quantificado foi submetido ao processo de desenvolvimento de novas formulações e de micro encapsulamentos usando diferentes matrizes poliméricas.

5.5 - Preparo das nanopartículas em suspensão coloidal

Para a aquisição das nanocápsulas e nanoesféras em suspensão coloidal foram desenvolvidas duas técnicas principais de preparação: Nanoprecipitação (NPPT) e Nanoemulsão/Interfacial Deposição/Deslocamento do Solvente (NIDDS) conforme FESSI *et al.* (1989) e FORIM *et al.* (2013), respectivamente. Ambas as técnicas foram executadas implementando três diferentes polímeros, sendo poli(ϵ -caprolactona), lignina e ácidos húmicos. A escolha entre os métodos foi determinada pelas características do rendimento no processo de micro e nanoencapsulamento.

5.5.1 - Obtenção das nanopartículas por NPPT

As suspensões coloidais de nanocápsulas (NC) e nanoesféras (NS) contendo a azadirachtina foram preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado (FESSI *et al.*, 1989). O método consistiu em reverter lentamente uma fase orgânica contendo um polímero (PCL, Ácidos húmicos ou ligninas), um tensoativo de baixo equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) (Span[®] 60), o extrato de neem e óleo de neem (não usado para nanoesferas), foram vertidos lentamente, sob agitação, sobre uma fase aquosa composta de água aquecida a 45°C e um tensoativo de elevado EHL (Tween[®] 80), o que conduz a formação imediata das nanopartículas. A Tabela 5.7 ilustra as nanoformulações preparadas por NPPT. As suspensões coloidais das nanocápsulas e nanoesferas obtidas de todas as formulações preparadas com os diferentes biopolímeros (PCL, ligninas e ácidos húmicos) apresentaram aspecto leitoso e opaco, podendo-se observar o reflexo azulado decorrente do movimento browniano das nanopartículas em suspensão, efeito Tyndall (SCHAFFAZICK *et al.*, 2002). Portanto, as características do produto final após a interação das fases orgânicas e aquosas indicaram a formação das suspensões coloidais, as quais apresentaram os menores diâmetros particulares, isso foi possível estabelecer, já que

se mostraram-se translúcidas, podendo-se também evidenciar claramente o reflexo azulado característico das partículas coloidais em suspensão.

TABELA 5.7 - Composição das suspensões preparadas pelo método de NPPT

Fase Orgânica	Nanocápsulas (NC)				Nanoesféras (NS)			
	*Tipo biopolímero				*Tipo biopolímero			
	PCL	Lignina	Ac. Húmico	Ac. Húmico	PCL	Lignina	Ac. Húmico	Ac. Húmico
Biopolímero* (mg)	252,2	250,1	255,2	749,5	254,4	250,3	253,3	750,2
Span® 60 (mg)	195,0	196,4	195,3	195,1	195,9	195,5	195,5	195,3
Óleo de Neem (mg)	775,5	776,2	775,5	775,2	-	-	-	-
Extrato de Neem (mg)	60,10	60,70	59,90	60,10	60,20	60,30	60,90	60,40
Acetona (mL)	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00	65,00
Fase Aquosa								
Tween® 80 (mg)	195,8	195,1	195,4	195,4	195,7	194,6	196,3	196,0
Água destilada (mL)	135,0	135,0	135,0	135,0	135,0	135,0	135,0	135,0

As nanocápsulas preparadas por nanoprecipitação em escala de laboratório geralmente apresentam diâmetros de partículas médios entre 100 e 400 nm (ALBISA *et al.*, 2017). O modelo destas partículas corresponde a uma parede polimérica adsorvendo o princípio ativo, no caso o extrato de neem, assim como um núcleo oleoso dispersando a substância ativa utilizando um tensoativo e um emulsionante. Especificamente, quando o núcleo das nanocápsulas é composto por uma dispersão lipídica de óleo e monoestearato de sorbitano, este nanocorpo tem sido designado como nanocápsulas de núcleo lipídico. Todas as formulações das nanocápsulas e nanoesferas foram empregados três polímeros diferentes, tendo a consideração que os polímeros utilizados na formulação das nanopartículas são biocompatíveis e biodegradáveis tais como o poli(ϵ -caprolactona) (PCL), a lignina e ácidos húmicos. O PCL usualmente tem preferência para polímeros sintéticos com alta pureza e reprodutibilidade entre lotes, assim como sua biocompatibilidade, baixo custo e relativamente não tóxico (FERRARI *et al.*, 2011). Por outro lado, os polímeros naturais, como a lignina e ácidos húmicos, também foram utilizados pelos requerimentos das características biológicas específicas do trabalho, focando principalmente nos ácidos húmicos pela capacidade fertilizante. Além disso, as ligninas e ácidos húmicos são considerados subprodutos de segmentos industriais de baixo custo.

5.5.2 - Obtenção das nanopartículas por NIDDS

O preparo das nanopartículas pelo método NIDDS consistiu de três etapas, sendo uma solução orgânica formada pelos diferentes polímeros de trabalho num solvente como acetona, o qual é parcialmente miscível em água (Solução 1), conforme FORIM *et al.* (2013). Esta solução foi vertida numa emulsão óleo/água (Solução 2), onde o material ativo foi misturado numa solução do composto que constitui o material encapsulante, formando uma emulsão (SUAVE *et al.*, 2006). A emulsão foi preparada pela homogeneização dos constituintes da fase interna, neste caso, óleo e extratos de neem contendo a substância ativa (azadirachtina). Finalmente, uma terceira fase (Solução 3) contendo um composto tensoativo foi adicionada na emulsão já na presença do polímero e solvente. Com a adição de excesso de água, ocorre a difusão do solvente posicionando o polímero na interface óleo/água (FORMARIZ *et al.*, 2005; SUAVE *et al.*, 2006). Com a evaporação do solvente e do excesso de água num evaporador rotativo ocorre a formação das nanocápsulas. O tensoativo se localiza na interface nanocápsulas/água estabilizando o sistema (JÄGER, 2005). As composições das formulações são apresentadas na Tabela 5.8.

TABELA 5.8 - Composição das suspensões preparadas pelo método de NIDDS

Composição	Nanocápsulas /*Tipo biopolímero			
	PCL	Lignina	Ac. Húmico	Ac. Húmico
Solução 1: Biopolímero* (mg)	250	250	250	750
Acetona (mL)	65,0	65,0	65,0	65,0
Solução 2: Óleo de neem (mg)	195	195	195	195
Extrato de neem (mg)	60,0	60,0	60,0	60,0
Água (mL)	75,0	75,0	75,0	75,0
Solução 3: Tween® 80 (mg)	195	195	195	195
Água (mL)	60,0	60,0	60,0	60,0

O volume final da suspensão coloidal foi rotaevaporado até ajustar um volume final de 100 mL, assim conseguir uma eliminação do excesso de solvente.

5.6 - Caracterização das nanopartículas biopoliméricas em Suspensão coloidal

Com o propósito de caracterizar as nanopartículas biopoliméricas, as suspensões coloidais foram investigadas quanto a estabilidade dos produtos nanoencapsulado e avaliando as propriedades físico-químicas.

5.6.1 - Determinação do *pH* das suspensões coloidais

Com a finalidade de avaliar a estabilidade do polímero formulado e presente nas nanocápsulas e nanoesferas em função do tempo, foram acompanhadas as medições de *pH* da suspensão coloidais. Os valores de *pH* das suspensões foram determinados diretamente nas suspensões através do potenciômetro (Model 827/pHmetro), previamente calibrado com soluções tampão com *pH* 4,00 e 10,0. Assim, foram determinados os valores de *pH* nas suspensões coloidais, obtendo como resultados valores na faixa entre 4,0 e 7,0 num intervalo de 60 dias, Tabela 5.9 e Figura 5.6. Estes valores permitiram avaliar a estabilidade das suspensões coloidais, mesmo da tendência do *pH* de algumas formulações, já que uma alteração do *pH* pode ser um indicativo evidente de degradação do polímero, afetando a estabilidade das suspensões coloidais e a cinética de liberação dos constituintes ativos (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

TABELA 5.9 - Medição do *pH* das suspensões coloidais de aza-A

Amostra*	Dia 01	Dia 10	Dia 20	Dia 30	Dia 40	Dia 50	Dia 60	Média	DP
NC1 (PCL)	6,00	5,27	5,24	5,33	5,17	5,15	5,10	5,32	0,31
NC2 (Lignina)	4,76	5,08	5,01	5,05	5,04	5,03	4,97	4,99	0,11
NC3 (Ác. Húmicos)	6,38	5,86	5,77	5,81	5,84	5,80	5,70	5,88	0,23
NC4 (Ác. Húmicos)	7,17	6,41	6,19	6,18	6,07	6,01	5,91	6,28	0,42
NS1 (PCL)	5,76	5,42	5,34	5,44	5,30	5,25	5,01	5,36	0,23
NS2 (Lignina)	5,05	5,04	5,00	5,03	4,89	4,81	4,67	4,93	0,14
NS3 (Ác. Húmicos)	5,84	5,80	5,77	5,89	5,68	5,60	5,59	5,74	0,12
NS4 (Ác. Húmicos)	6,18	6,14	6,07	6,08	6,02	6,00	6,02	6,07	0,07

*Medidas em triplicata ($n = 3$). DP: desvio padrão e PCL: poli(ϵ -caprolactona)

A Figura 5.6 representa a variação dos resultados nas determinações de *pH*, onde os valores obtidos para NS4, NS3, NS2 não apresentam variações significativas mantendo um *pH* estável. Por outro lado, as formulações NC4, NC3, NC1 e NS1

apresentaram um decaimento do pH considerável nos primeiros 15 dias, a maioria das formulações correspondentes às nanocápsulas, essa relação no incremento da acidez nas suspensões coloidais das nanocápsulas podem estar associadas aos polímeros usados nas formulações, podendo a relaxação das cadeias poliméricas do PCL, ligninas e ácidos húmicos gerando uma exposição de um maior número de grupos de ácidos carboxílicos terminais que podem ser ionizados, alterando o pH das suspensões coloidais (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

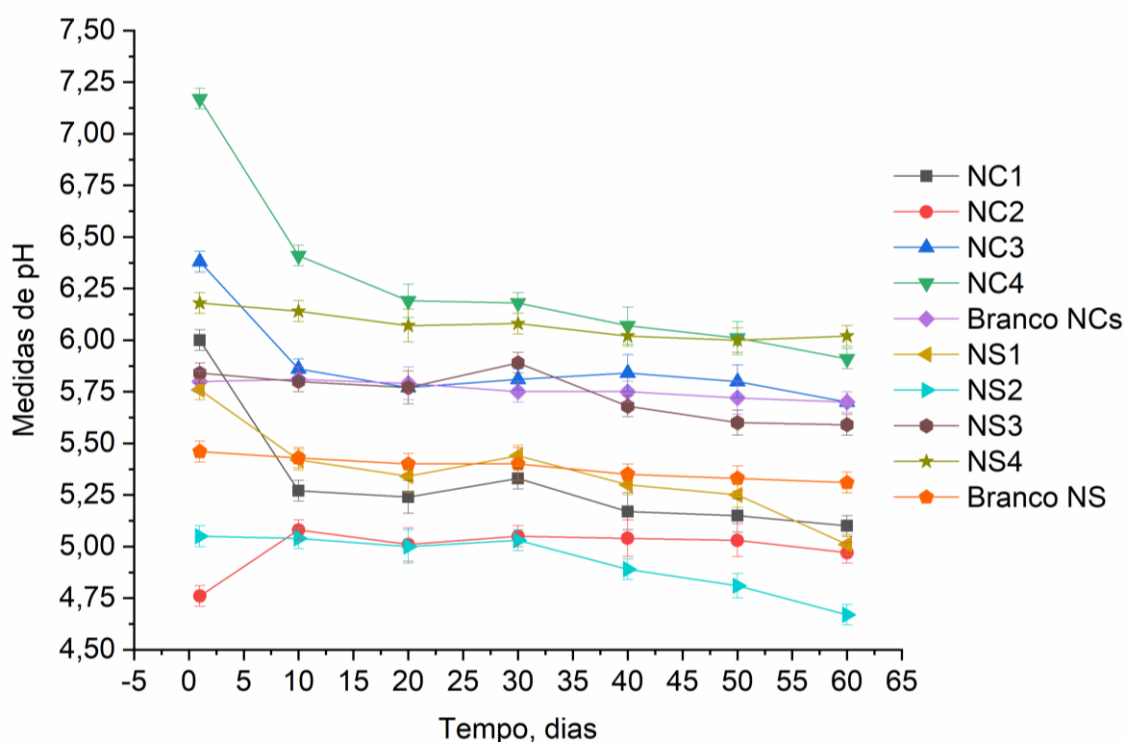


FIGURA 5.6 - Determinação do pH das suspensões coloidais das nanopartículas de aza-A.

Estas análises foram importantes para avaliar a estabilidade dos polímeros formulados pela obtenção das nanocápsulas e nanoesferas, já que a alteração de pH pode indicar degradação do polímero em solução, gerando monômeros (no caso ácido láctico) que levam à acidificação da formulação (MELO *et al.*, 2010).

5.6.2 - Determinação do Potencial zeta e diâmetro de partícula (DP) das suspensões coloidais

Para caracterização das amostras foram avaliados os parâmetros como valores de tamanho médio (diâmetro hidrodinâmico) e potencial zeta das formulações contendo nanopartículas de aza-A (neem). A Tabela 5.10 apresenta os resultados obtidos da avaliação dos parâmetros descritos anteriormente para as suspensões coloidais e os produtos secos por aspersão. As análises dos resultados mostram valores de tamanho das nanopartículas compatíveis com relatados na literatura para estas nanopartículas como sistemas carreadores de bioinseticidas (FORIM *et al.*, 2013; PASQUOTO-STIGLIANI *et al.*, 2017; SHAH *et al.*, 2016). No entanto, as micro/nanopartículas apresentaram um leve aumento no tamanho entre as amostras em suspensão coloidal e as secas por aspersão, fato que se pode associar ao princípio ativo na matriz polimérica das nanopartículas, devido às características das formulações (DOS SANTOS SILVA *et al.*, 2010). Ainda em relação aos produtos secos por aspersão, os quais apresentam tamanhos maiores aos comparados com as suspensões coloidais. A variabilidade do tamanho nas formulações com PCL (NC1, NS1) em comparação com os ácidos húmicos (NC3, NC4, NS3 e NS4) apresentaram diâmetros de partículas maiores nos produtos secos por aspersão (Pó) e uma redução considerável nas suspensões coloidais (SC), que descrevem uma distribuição média, tendo em conta as considerações de homogeneidade das suspensões coloidais.

Quanto ao potencial zeta, os resultados apresentados na Tabela 5.10 indicaram uma tendência reprodutível em relação a referentes teóricos, tais como o desenvolvido por FORIM *et al.* (2013), onde foi avaliado o potencial zeta de nanopartículas carregadas com neem após da formulação com PCL como matriz polimérica, determinando nanopartículas muito estáveis no meio aquoso com $PZ > 30$ mV ou < -30 mV. Esta reprodutibilidade é relevante na implementação simultânea dos biopolímeros formulados, sendo referente para as ligninas e os ácidos húmicos.

TABELA 5.10 - Caracterização das suspensões coloidais e os produtos secos por aspersão carregados com neem

Amostras*	Diâmetro de partícula (d.nm) ± DP	Potencial zeta (mV) ± DP
NC1 Pó	1455 ± 27,60	-20,20 ± 4,91
NC2 Pó	1801 ± 84,32	-31,00 ± 3,35
NC3 Pó	6052 ± 8,905	-24,20 ± 4,75
NC4 Pó	3952 ± 14,61	-24,00 ± 4,47
NS1 Pó	2369 ± 468,8	-16,60 ± 7,23
NS2 Pó	1546 ± 87,21	-25,10 ± 4,71
NS3 Pó	2049 ± 107,4	-24,20 ± 4,75
NS4 Pó	5050 ± 8,356	-29,30 ± 5,25
NC1 SC	1727 ± 67,68	-18,40 ± 6,06
NC2 SC	649,6 ± 146,1	-29,50 ± 5,60
NC3 SC	404,1 ± 111,6	-34,10 ± 5,62
NC4 SC	235,7 ± 108,1	-22,90 ± 4,05
NS1 SC	183,2 ± 118,0	-32,70 ± 6,74
NS2 SC	219,1 ± 60,95	-37,70 ± 7,29
NS3 SC	94,28 ± 46,43	-41,70 ± 7,39
NS4 SC	207,1 ± 27,28	-48,00 ± 4,03

*Realizado por triplicata ($n = 3$)

NC: Nanocápsulas, NS: Nanoesferas, SC: Suspensão coloidal e DP: Desvio padrão

Tendo em conta que o potencial zeta descreve o potencial de superfície das partículas, influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003), pode-se considerar os resultados obtidos dentro da faixa que descreve a estabilidade das nanopartículas (SOUZA *et al.*, 2012).

5.6.3 - Determinação da degradação fotoquímica das suspensões coloidais

Para avaliação da estabilidade fotoquímica das suspensões coloidais foi feita uma simulação de radiação com exposição a luz ultravioleta por 72 h. As suspensões coloidais foram retiradas nos tempos pré-estabelecidos de 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48 e 72 h após da exposição a radiações ultravioleta. Cada análise foi realizada em triplicata. Em seguida, as amostras foram analisadas por CLAE e quantificadas através da curva analítica avaliada (vide seção 5.3). Como controle, utilizou-se duas soluções do extrato de neem, uma não formulada e exposta à radiação ultravioleta, e outra envolta em papel alumínio também nas condicionada da câmara de radiação

para avaliar possíveis perdas por degradação fotoquímica e alvo de comparação com as amostras formuladas. A Figura 5.7 ilustra a curva de degradação de aza-A em soluções coloidais formuladas com ácidos húmicos, selecionado este polímero pelo alvo de estudo acima do PCL e as ligninas implementadas como matriz polimérica pelo aproveitamento das propriedades fertilizantes dos ácidos húmicos e sua influência no crescimento da planta, melhorando o rendimento e a absorção dos nutrientes no desenvolvimento (DE MELO *et al.*, 2016). A curva de degradação fotoquímica dos produtos formulados com ácidos húmicos em suspensões coloidal apresentara uma porcentagem de degradação inferior aos controles contendo o extrato de neem não formulados. O processo de nanoencapsulação e nanoesferado aumentaram a estabilidade da azadirachtina em aproximadamente uma porcentagem média de $28,5 \pm 5,60$ em comparação aos controles na exposição direta à radiação de luz ultravioleta.

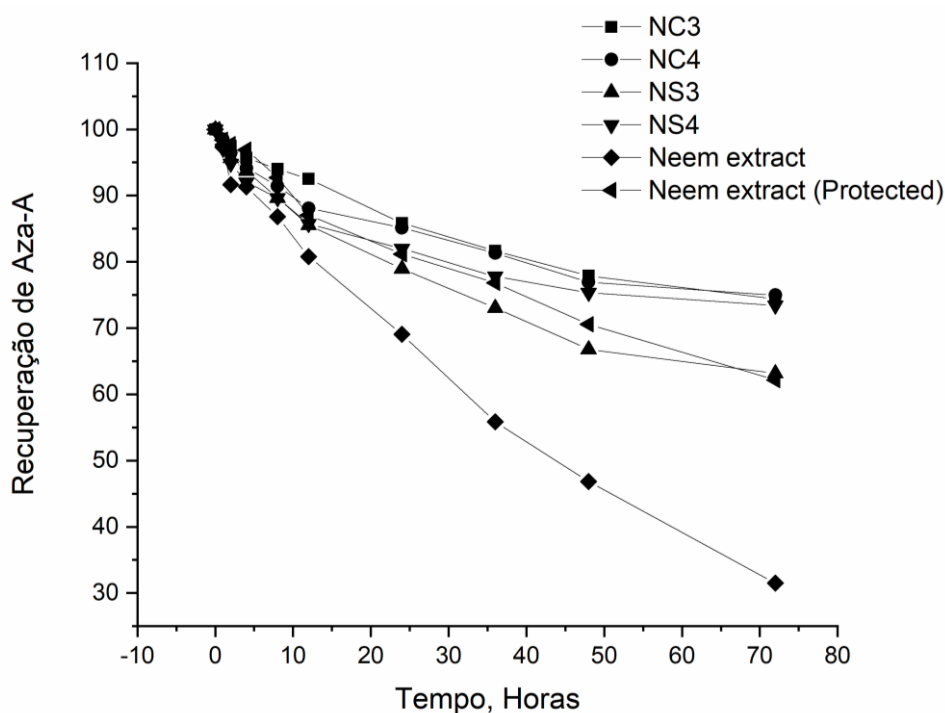


FIGURA 5.7 - Curva de degradação fotoquímica das suspensões coloidais formuladas com ácidos húmicos

A fotodegradação do extrato de neem após da radiação UV apresentaram uma da estabilidade em $68,5 \pm 5,60$, indicando a fotosensibilidade da azadirachtina e posteriormente da atividade inseticida (CHAUDHARY *et al.*, 2017). No entanto, os ganhos da estabilidade fotoquímica dos produtos formulados em suspensão coloidal

tornam os ácidos húmicos como matriz polimérica na formação de nanocápsulas e nanoesferas uma opção viável no uso de formulação pela proteção ativa de bioinseticidas.

5.6.4 - Avaliação da degradação térmica das suspensões coloidais

O ensaio de estabilidade térmica não apresentou variação entre as amostras formuladas, mas uma variação significativa entre a avaliação das suspensões coloidais e extrato de neem não formulado usado como controle. Após a exposição térmica de 30°C no período de 72 h foram obtidas os resultados que permitiram acompanhar a avaliação da estabilidade das suspensões coloidais, conseguindo porcentagem médios de recuperação da azadirachtina de $24,6 \pm 4,20$, sendo um resultado referente em relação à estabilidade do composto formulado em que comparação com o extrato de neem não formulado que apresento uma porcentagem de degradação de $39,6 \pm 2,60$, as variações dos resultados obtidos podem-se visualizar na Figura 5.8.

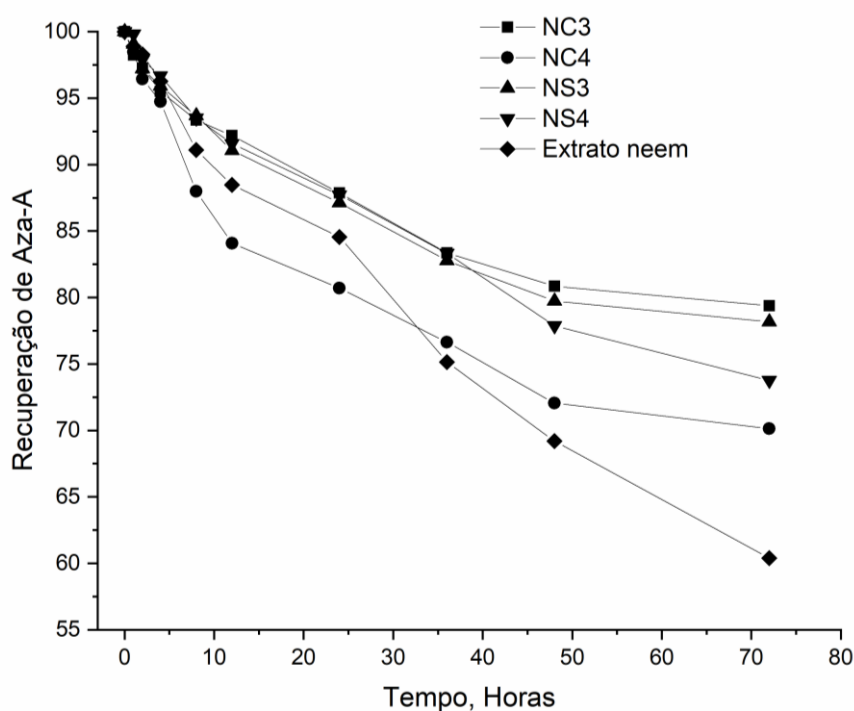


FIGURA 5.8 - Curvas de degradação térmica das suspensões coloidais

5.6.5 - Análise morfológica das nanopartículas em suspensão coloidal.

A avaliação das diferentes suspensões coloidais foi importante para conhecer a estabilidade das nanopartículas após do processo de formulação. A técnica MEV foi usada para caracterização morfológica das suspensões coloidais formuladas com ácidos húmicos como matriz polimérica, permitindo obter informações relativas à forma e ao tamanho das nanopartículas em suspensão (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). As suspensões coloidais formuladas com ácidos húmicos quando analisadas morfolologicamente através da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), apresentaram diferenças significativas na sua morfologia como pode ser visto na Figura 5.9, proporcionando possivelmente características distintas no processo de liberação do extrato bruto de neem formulado com as mesmas (COSTA, 2015).

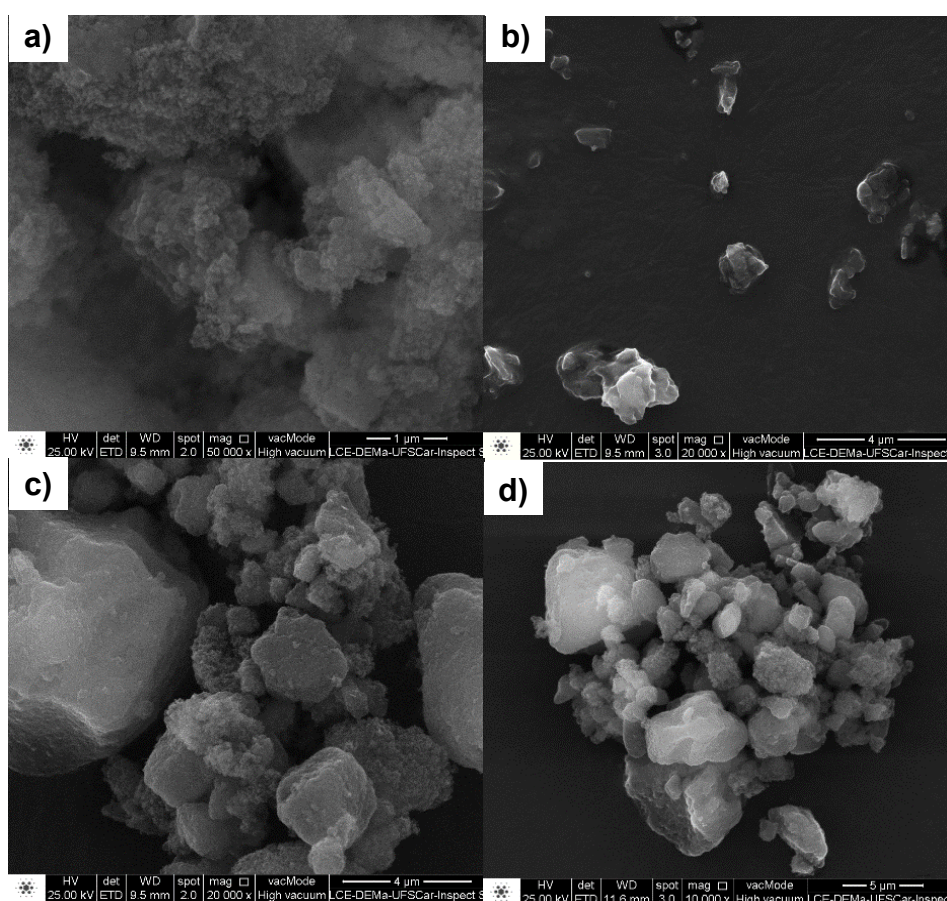


FIGURA 5.9 - Imagens de MEV das suspensões coloidais. a) nanocápsulas NC3, b) nanocápsulas NC4, c) nanoesferas NS3, e d) nanoesferas NS4 nas aproximações de 40000x.

Avaliação das imagens obtidas por MEV demonstraram pela maioria das amostras um perfil reprodutível apresentando homogeneidade (FORIM *et al.*, 2013), sendo NC3as amostras com melhor formação esférica. As análises geralmente das amostras NC3, NS3 e NS4 apresentam um perfil morfológico descrevendo um material compacto de estrutura não uniforme em sua totalidade, já que as nanocápsulas e nanoesferas se podem encontrar com outros agentes não nanoencapsulados nas suspensões coloidais permitindo que apresentem outros artefatos. Uma maior aproximação permitirá amostrar melhor o perfil de formação das nanocápsulas e nanoesferas uniformes em todo o material, Figura 5.10.

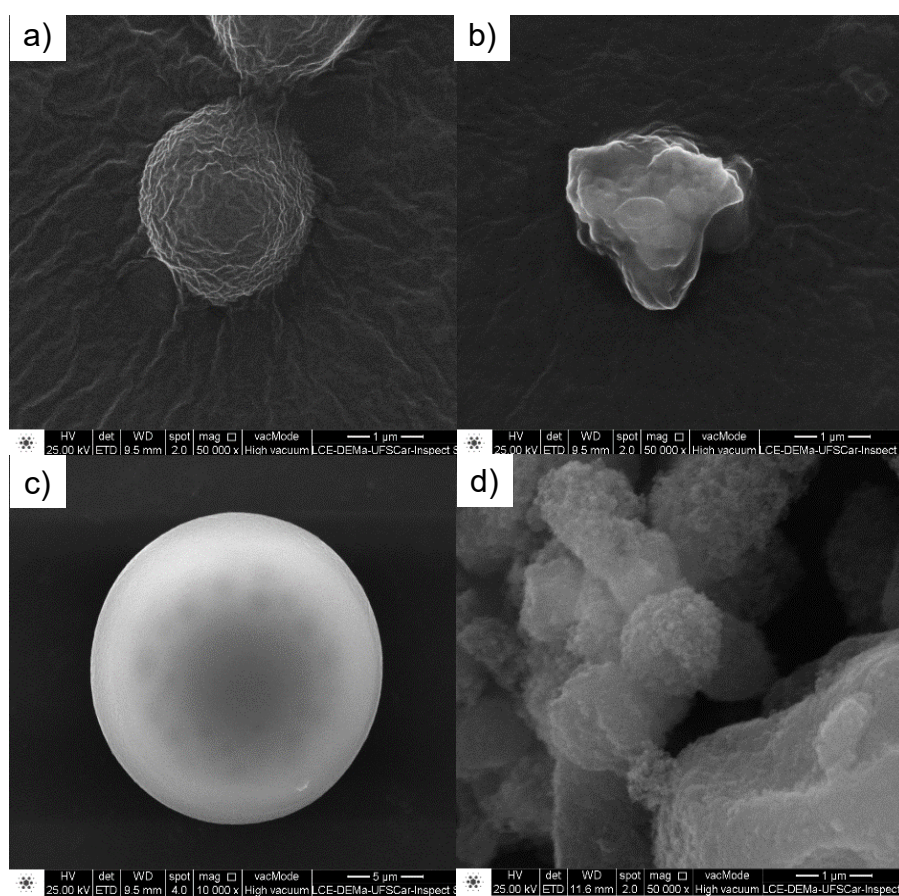


FIGURA 5.10 - Imagens de maior aproximação MEV das suspensões coloidais. a) NC3 em 50000x, b) NC4 em 50000x, c) NS3 em 10000x e d) NS4 em 50000x.

5.6.6 - Estudos da cinética de liberação

A avaliação dos estudos de liberação nanopartículas em suspensão coloidal foram realizados pela técnica de difusão de bolsas de diálise proposta por LEVY *et al.* (1990), permitindo avaliar a liberação dos produtos formulados a partir de sistemas

nanoparticulados poliméricos onde influem diferentes fatores tais como a dessorção da azadirachtina na superfície das partículas; da difusão da azadirachtina através da matriz das nanoesferas; e a difusão através da parede polimérica das nanocápsulas (SOPPIMATH *et al.*, 2001). Os resultados obtidos após a avaliação apresentaram um perfil de liberação de azadirachtina nas suspensões coloidais formuladas com ácidos húmicos como matriz polimérica uma tendência de liberação após as 12 h em relação ao incremento na porcentagem média de recuperação de $40,1 \pm 4,8$ de aza-A (Figura 5.11).

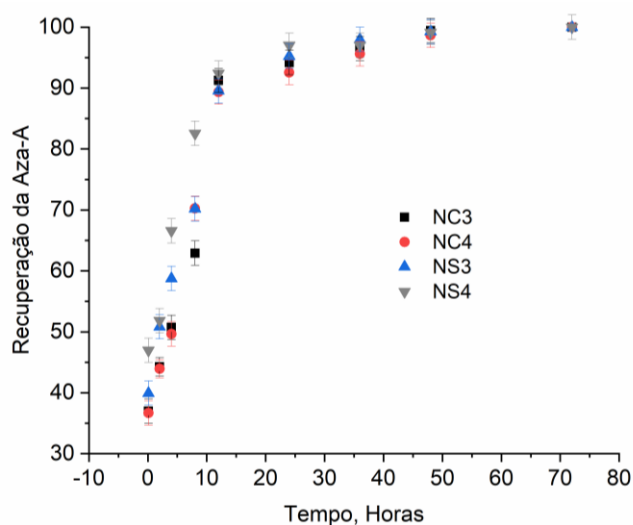


FIGURA 5.11 - Gráfico da avaliação da cinética de liberação de aza-A das suspensões coloidais ($n=3$)

A tendência geralmente foi constante após das 20 h proporciona a liberação com uma taxa maior de aza-A em comparação com as primeiras 20 h, tendo uma liberação mais controlada no início do ensaio e demonstrando depois das 20 h uma possível degradação da matriz polimérica, a curva apresenta diminuição na concentração de aza-A no transcurso do tempo de avaliação, porém a prolongação a ação inseticida durante o tempo total foi ativa.

5.7 - Quantificação do teor total de azadirachtina nas suspensões coloidais por CLAE-UV.

As suspensões coloidais obtidas pelos diferentes métodos foram tratadas com acetona para promover a dissolução das nanopartículas. Depois de homogeneizar, foi retirada uma alíquota da solução e centrifugada por 30 min a 14.000 rpm.

Posteriormente, uma alíquota do sobrenadante foi retirada e seca. O material seco foi ressuspensionado em metanol e analisado por triplicata por CLAE, obtendo-se os resultados apresentados nas Tabelas 5.11 e 5.12.

TABELA 5.11 - Determinação do teor total de azadirachtina na suspensão coloidal pelo método NPPT

Amostra	Concentração calculada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração Susp. Coloidal* ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Eficiência de encapsulamento (%)
NC1 (PCL)	2,20	22,1	65,0
NC2 (Lignina)	2,40	23,9	70,4
NC3 (Ác. Húmicos)	2,68	26,8	78,8
NC4 (Ác. Húmicos)	3,06	30,6	89,9
NS1 (PCL)	2,85	28,5	83,8
NS2 (Lignina)	2,66	26,6	78,2
NS3 (Ác. Húmicos)	2,83	28,3	83,2
NS4 (Ác. Húmicos)	2,92	29,2	85,8

NC: Nanocápsulas e NS: nanoesferas

*A concentração teor da suspensão coloidal calculada como a concentração nominal nas suspensões coloidais, sendo 34,0 mg/L

TABELA 5.12 - Determinação do teor total de azadirachtina na suspensão coloidal pelo método NIDDS

Amostra	Concentração calculada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração Susp. Coloidal* ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Eficiência de encapsulamento (%)
NC1 (PCL)	2,04	20,5	60,1
NC2 (Lignina)	1,79	16,9	49,9
NC3 (Ác. Húmicos)	1,56	15,7	45,9
NC4 (Ác. Húmicos)	1,58	15,8	46,5
NS1 (PCL)	1,85	18,5	54,4
NS2 (Lignina)	1,76	17,5	51,7
NS3 (Ác. Húmicos)	1,51	15,1	44,3
NS4 (Ác. Húmicos)	1,42	14,2	41,8

*A concentração teor na suspensão coloidal como nominal foi de 34,0 mg/L

Nas análises de quantificação do teor da azadirachtina foram avaliados os métodos desenvolvidos pela obtenção de encapsulamento da azadirachtina em relação à porcentagem de recuperação como parâmetro de estabilidade, tendo um maior monitoramento quantitativo das formulações ajudando à otimização dos parâmetros nos métodos de encapsulamento e ter a melhor seleção da técnica baseada na eficiência de nanoencapsulamento. Enquanto, foi determinada o teor de azadirachtina livre na fase externa de dispersão com a finalidade de ter uma maior

veracidade na quantificação total de azadirachtina encapsulada. A Tabela 5.13 e 5.14 descrevem os resultados obtidos após da quantificação por CLAE.

TABELA 5.13 - Determinação do teor de azadirachtina livre na suspensão coloidal pelo método NPPT

Amostra	Concentração calculada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração Susp. Coloidal* ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Eficiência de encapsulamento (%)
NC1 (PCL)	38,9	5,03	14,8
NC2 (Lignina)	31,2	5,97	17,6
NC3 (Ác. Húmicos)	24,1	5,55	16,3
NC4 (Ác. Húmicos)	9,50	2,38	7,01
NS1 (PCL)	5,59	3,24	9,54
NS2 (Lignina)	19,3	5,31	15,6
NS3 (Ác. Húmicos)	19,3	4,68	13,8
NS4 (Ác. Húmicos)	13,0	3,72	10,9

*A concentração teor da suspensão coloidal calculada como a concentração nominal nas suspensões coloidais, sendo 34,0 mg/L

TABELA 5.14 - Determinação do teor de azadirachtina livre na suspensão coloidal pelo método NIDDS

Amostra	Concentração calculada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração Susp. Coloidal (mg μL^{-1})	Eficiência de encapsulamento (%)
NC1 (PCL)	2,05	20,5	60,3
NC2 (Lignina)	1,69	16,9	49,9
NC3 (Ác. Húmicos)	1,56	15,6	45,9
NC4 (Ác. Húmicos)	1,58	15,8	46,5
NS1 (PCL)	1,85	18,5	54,4
NS2 (Lignina)	1,76	17,5	51,7
NS3 (Ác. Húmicos)	1,51	15,1	44,3
NS4 (Ác. Húmicos)	1,42	14,2	41,8

*A concentração teor na suspensão coloidal como nominal foi de 34,0 mg/L

As análises da determinação do teor de azadirachtina livre não encapsuladas nas suspensões coloidais mostram concentrações baixas com respeito ao teor de azadirachtina nanoencapsulada, permitindo conferir a efetividade dos métodos NPPT e NIDDS no encapsulamento do princípio ativo e avaliar o método com maior capacidade de encapsulamento com respeito as características da amostra. Além disso, a quantificação da azadirachtina livre não encapsulada nas suspensões coloidais apresentaram uma variação representativa permitindo a seleção do método de encapsulamento com maior eficiência, favorecendo finalmente ao método NPPT por seu enfraquecimento no teor de azadirachtina livre não encapsulada nas

suspensões coloidais em comparação com o desenvolvimento da técnica NIDDS (Tabela 5.13 e 5.14), posteriormente a comparação do teor de azadirachtina encapsulada nas técnicas e quantificada nas suspensões coloidais foram relativamente maior em relação ao método NIDDT (Tabela 5.10 e 5.11), os dados da quantificação do teor de azadirachtina encapsulada possibilitaram a seleção da técnica de encapsulamento NPPT como a metodologia mais adequada para o desenvolvimento das formulação na obtenção do encapsulamento de azadirachtina.

5.8 - Obtenções das nano/micropartículas em pó secas por *Spray-Dryer*

Aproveitando as vantagens no processo do método de microencapsulação usados no *Spray-Drying* foram aproveitadas as propriedades oferecida mediante a técnica permitindo obter uma maior qualidade dos produtos com uma eficiência controlada, podendo implementar produtos das formulações sensíveis ao calor, possibilitando maiores produções em operações contínuas com equipamentos simples como o Mini *Spray-Dryer* Büchi B-290, gerando micropartículas relativamente uniformes e esféricas, boa eficiência e baixo custo do processo (SUAVE *et al.*, 2006). As suspensões coloidais contendo as nanocápsulas e nanoesféras foram secas pelo método da secagem por aspersão, tendo como suporte de secagem aerossil 200 (Diox. Silício coloidal) em quantidades de 1% m/V. Foram tomado 60 mL de cada suspensão coloidal previamente concentradas e secas imediatamente após da sua preparação (Figura 5.12). As suspensões coloidais preparadas foram secas num Mini *Spray-Dryer* Büchi B-290 sendo constantemente homogeneizadas com agitador magnético durante o processo.

O método de aspersão apresenta vantagens como a obtenção dos produtos numa única etapa e possibilidades de transposições de escalas. Para a obtenção do pó com adequadas características, foi importante o uso de um adjuvante de secagem, o qual evita a adesão das partículas nas paredes do equipamento e conseqüentemente uma maior recuperação dos produtos em pó. Conhecendo as quantidades de materiais usados nas formulações foram determinados os rendimentos da operação de secagem, calculados com base na massa total de sólidos presentes nas suspensões de nanocápsulas e nanoesféras, adicionados das massas

dos componentes oleosos da formulação e da massa do adjuvante de secagem (Tabela 5.15 e 5.16, Figura 5.12).

TABELA 5.15 - Determinação dos rendimentos de secagem das nanocápsulas obtidos por aspersão.

Composição	Nanocápsulas (NC)			
	PCL	Lignina	Ac. Húmico	Ac. Húmico
Fase Orgânica				
Biopolímero* (mg)	252,20	250,10	255,20	749,50
Span® 60 (mg)	195,00	196,40	195,30	195,10
Óleo de neem (mg)	775,50	776,20	775,50	775,20
Extrato de neem (mg)	60,10	60,70	59,90	60,10
Acetona (mL)	65,00	65,00	65,00	65,00
Fase Aquosa				
Tween® 80 (mg)	195,80	195,10	195,40	195,40
Água destilada (mL)	135,00	135,00	135,00	135,00
Secagem das nanopartículas por Spray-Dryer				
Suspensão coloidal (mL)	60,00	60,00	60,00	60,00
Suporte de Secagem (Aerosil)	602,60	606,10	602,30	603,40
Massa seca esperada para 100mL (mg)	2081,2	2084,6	2083,6	2578,7
Massa seca esperada para 60 mL (mg)	1248,7	1250,8	1250,2	1547,2
Massa das preparações secas (mg)	883,3	982,2	940,5	963,8
% Rendimento	70,7	78,5	75,2	62,3

*Tipo biopolímero

Os cálculos dos rendimentos foram realizados considerando os pesos de aerosil e as massas secas esperadas para os volumes de 60 mL.

TABELA 5.16 - Determinação dos rendimentos de secagem das nanoesferas obtidos por aspersão.

Composição	Nanoesféras (NS)			
	PCL	Lignina	Ac. Húmico	Ac. Húmico
Fase Orgânica				
Biopolímero* (mg)	254,40	250,30	253,30	750,20
Span® 60 (mg)	195,90	195,50	195,50	195,30
Óleo de neem (mg)				
Extrato de neem (mg)	60,20	60,30	60,90	60,40
Acetona (mL)	65,00	65,00	65,00	65,00
Fase Aquosa				
Tween®80 (mg)	195,70	194,60	196,30	196,00
Água destilada (mL)	135,00	135,00	135,00	135,00
Suspensão coloidal (mL)	60,00	60,00	60,00	60,00
Suporte de Secagem (Aerosil)	602,90	601,50	602,80	605,40
Massa seca esperada para 100mL (mg)	1309,1	1302,2	1308,8	1807,3
Massa seca esperada para 60 mL (mg)	785,5	781,3	785,3	1084,4
Massa das preparações secas (mg)	739,8	644,3	620,0	664,9
% Rendimento	94,2	82,5	79,0	61,3

*Tipo biopolímero

Os cálculos dos rendimentos foram realizados considerando os pesos de aerosil e as massas secas esperadas para os volumes de 60 mL.

Os resultados de rendimentos de secagem nas amostras obtidas apresentaram valores superiores a 70,0%, indicando que as micropartículas poliméricas foram obtidas com valores satisfatórios pelo método de aspersão. As nanopartículas apresentaram valores de rendimento de preparo e doseamento de azadirachtina superiores quando foi diminuído a quantidade do extrato nas diferentes formulações contendo ácidos húmicos, o que permite inferir que a presença dessas quantidades formuladas influi no rendimento.

Os rendimentos obtidos na secagem pelo método de aspersão por *Spray-Dryer* apresentaram resultados variáveis entre os diferentes polímeros implementados nas formulações, permitindo estabelecer uma comparação na efetividade de encapsulamento do princípio ativo. A relação dos estudos de micro/nanoencapsulação de princípios ativos com o propósito de aplicação são variados, pelo que os produtos que constituintes nas formulações variam dependendo dos interesses de uso, em grão medida os polímeros implementados nas formulações formam um fator importante no encapsulamento pela adsorção do princípio ativo na parede polimérica, permitindo influenciar a quantidade de princípio ativo associado aos sistemas nanoestruturados, dentro dos quais destacam-se as propriedades físico-químicas no princípio ativo. A grande importância da implementação dos ácidos húmicos como biopolímero nas formulações de obtenção do micro/nanopartículas de aza-A é da acrescenta um valor agregado nos produtos finais, a conhecimento da efetividade da ação fertilizante dos ácidos húmicos.

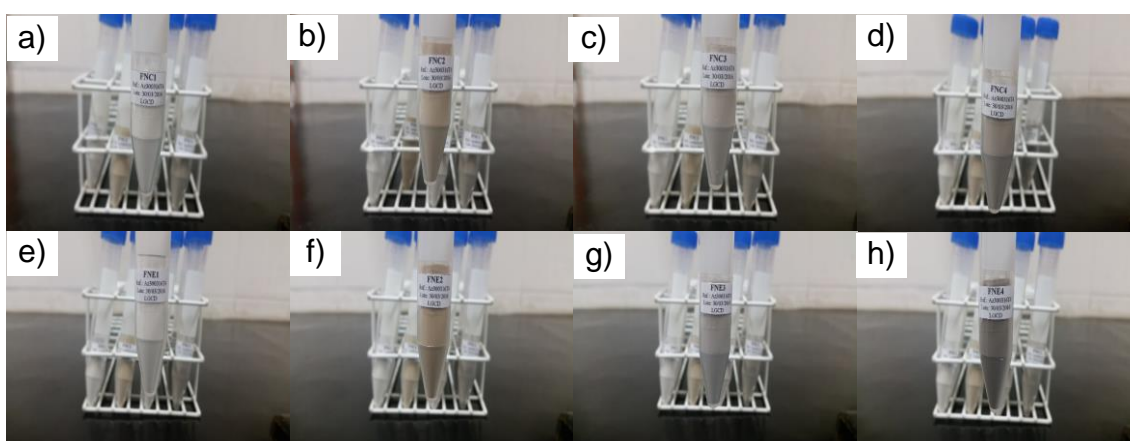


FIGURA 5.12 - Produtos secos por aspersão utilizando o Mini *Spray-dryer* B-290: a) NC com PCL, b) NC com lignina, c) NC com ác. húmicos, d) NC com ác. húmicos concentrada, e) NS com PCL, f) NS com lignina, g) NS com ác. húmicos, e h) NS com maior aplicação de ác. húmicos.

5.9 - Caracterização dos produtos secos por aspersão

5.9.1 - Doseamento quantitativo de aza-A nos produtos secos por *Spray-Dryer*

O teor de azadirachtina em todos os produtos nebulizados foi quantificado por CLAE (Tabela 5.17). As amostras foram preparadas tratando os nebulizados com acetona a fim de proceder a dissolução do polímero e liberação do conteúdo de azadirachtina presente nas nanopartículas.

TABELA 5.17 - Quantificação do teor aza-A nos produtos secos por aspersão utilizando o equipamento Mini *Spray-dryed Büchi*® B-290

Amostra	Concentração Pó* (mg/Kg)	Eficiência de encapsulamento (%)
NC1 (PCL)	1,62	79,4
NC2 (Lignina)	1,25	61,2
NC3 (Ác. Húmicos)	1,12	54,6
NC4 (Ác. Húmicos)	1,06	52,0
NS1 (PCL)	1,39	68,5
NS2 (Lignina)	0,73	35,7
NS3 (Ác. Húmicos)	0,96	47,2
NS4 (Ác. Húmicos)	1,33	65,0

*A concentração teor do pó nominal calculada foi $2,042 \text{ mg kg}^{-1}$

Os resultados apresentados na Tabela 5.17 representam os valores do teor de aza-A quantificada nos produtos finais micro/nanoencapsulados, apresentando resultados atípicos entre os dados obtidos com respeito aos diferentes polímeros implementados nas formulações. Evidentemente, os valores após o processo de encapsulamento permitiram inferir as porcentagens do teor de aza-A não nanoencapsulada, relacionando as variações das porcentagens de recuperação com os diferentes fatores que influem no nanoencapsulamento do produto ativo durante a obtenção dos produtos secos por aspersão.

5.9.2 - Estabilidade fotoquímica dos produtos secos por aspersão

O propósito do nanoencapsulamento do extrato de neem como biopesticida tem como finalidade a diminuição dos fatores de degradação sofrida pela azadirachtina e demais constituintes do extrato (CARVALHO *et al.*, 2015). Esses constituintes

apresentam baixa estabilidade em condições de campo, principalmente à fotodegradação. Assim, uma alternativa para proporcionar ganhos de estabilidade como a diminuição da degradação do extrato de neem tem sido descrita, acrescentando a necessidade de novas formulações de neem com maior fotoestabilidade, período crescente entre pulverizações, a fim de aumentar seu uso na agricultura (COSTA *et al.*, 2017; FLORES-CÉSPEDES *et al.*, 2015).

Para avaliação da estabilidade fotoquímica dos produtos secos por aspersão foi feita uma simulação em câmara com exposição à radiação ultravioleta por 72 horas. Os produtos secos por aspersão foram retirados em triplicata nos tempos de 12, 24, 36, 48 e 72 h após da exposição a radiações ultravioleta. Em seguida, as amostras foram analisadas por CLAE-UV e quantificadas por meio da curva de calibração avaliada (vide seção 5.3.2). Como controle, utilizou-se duas amostras do extrato bruto de neem exposto à radiação UV, a primeira envolta em papel alumínio e a segunda exposta diretamente. A Figura 5.13 ilustra a curva de degradação dos produtos secos por aspersão nanoencapsulados.

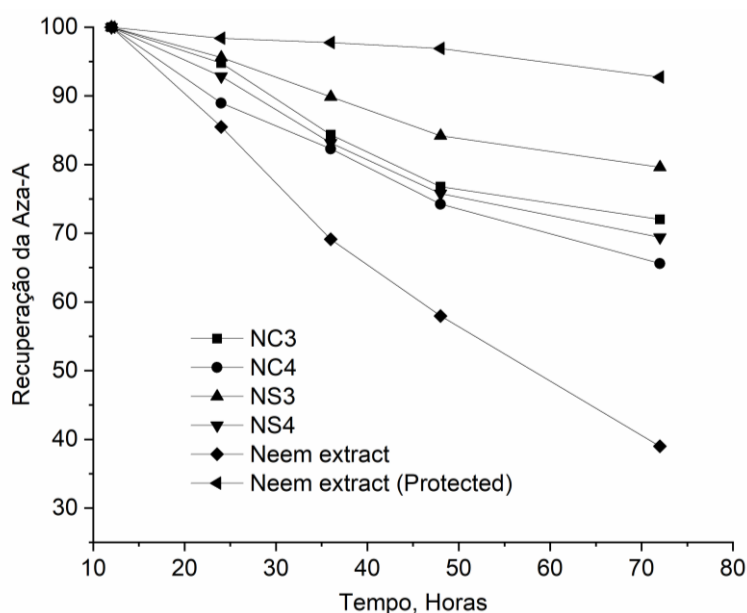


FIGURA 5.13 - Curva de degradação fotoquímica dos produtos secos por aspersão.

A Figura 5.13 apresenta como a curva de degradação fotoquímica dos produtos secos por aspersão decai consideravelmente em todos os produtos que foram expostos à radiação UV e levemente o extrato de neem não formulado protegido com papel alumínio e utilizado como controle, tendo uma diminuição da estabilidade de $7,30 \pm 5,90$. As amostras formuladas expostas a radiação UV apresentaram uma

diminuição da estabilidade da azadirachtina em $28,3 \pm 5,91\%$ nos produtos microencapsulado e nanoesferado, porém a estabilidade da azadirachtina quantificada no extrato de neem não formulado sem proteção apresenta diminuição do $61,0 \pm 5,90\%$ da sua estabilidade, o que permite inferir um ganho de aproximadamente do dobro da estabilidade com os produtos microencapsulas e microesferado.

5.9.3 - Degradação térmica dos produtos secos por aspersão

Os ensaios de degradação térmica apresentaram resultados próximos entre os produtos formulados diferindo levemente do extrato de neem não formulado. A exposição térmica num período total de 72 h e a temperatura constante numa câmara acondicionada a 30°C . Alíquotas foram retiradas por triplicata para acompanhar o processo de degradação térmica nas formulações dos produtos secos por aspersão, tendo como referência o extrato de neem não formulado como controle. A avaliação da degradação térmica permitiu obter os resultados da diminuição da estabilidade da azadirachtina no controle com perdas de $31,7 \pm 5,50$, tendo um aumento na perda de estabilidade em comparação com os produtos microencapsulas e microesferado que ficaram com um ganho do 10% aproximadamente, sendo só uma perda de estabilidade em 72 h de $24,2 \pm 5,50$ (Figura 5.14).

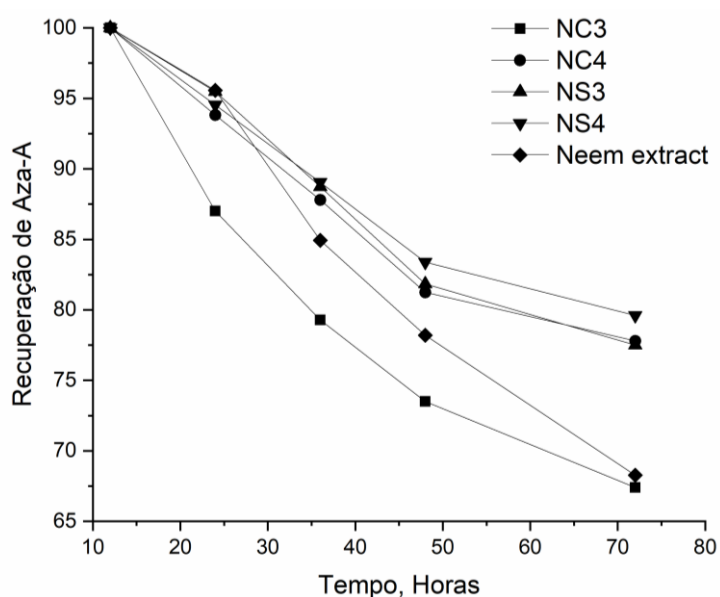


FIGURA 5.14 - Curvas de degradação térmica de azadirachtina presente nos produtos secos por aspersão

COSTA (2015) descreve tendências características no armazenamento dos produtos à base de neem, tendo condições com fatores como a temperatura e umidade, onde a azadirachtina pode sofrer processos de degradação em função do tempo (COSTA, 2015). Na Figura 5.14 o extrato de neem sem proteção exposto a temperatura ambiente (aproximadamente 30°C) apresentou uma degradação na estabilidade da azadirachtina de um $31,7 \pm 5,50\%$ num período de 72 h, o que descreve a ação descrita por COSTA (2015) da temperatura sob azadirachtina por tempos prolongados.

5.9.4 - Análise da morfologia do micro/nanopartículas por microscopia eletrônica de varredura

A avaliação das diferentes formulações para obtenção do micro/nanopartículas tendo os ácidos húmicos como matriz polímero foi relevante para a obtenção de informações relativas à forma e ao tamanho das nanopartículas de cada amostra após o processo de encapsulamento. Através da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), se puderam presenciar as diferenças na morfologia de cada formulação (Figura 5.15).

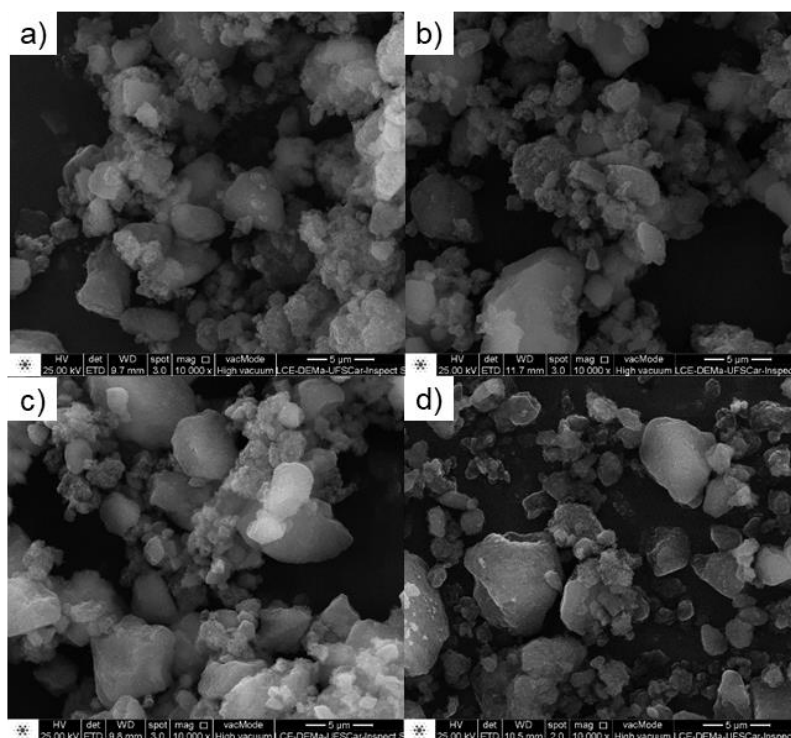


FIGURA 5.15 – Análises da morfologia dos produtos secos por aspersão em 10000x: a) NC3, b) NC4, c) NS3, e d) NS4

As imagens obtidas por MEV mostraram em sua grande maioria um perfil reprodutível, mesmo sendo as formulações diferentes, estas apresentam o perfil morfológico de um material compacto de estruturas semiesféricas em forma de clusters (Aglomerações). Em geral, os produtos secos por aspersão obtidos no processo de nanoencapsulamento e nanoesferado, apresentam um perfil de formação de microesferas não uniforme em todo o material.

5.10 - Bioensaios

O ensaio biológico visou certificar se a atividade inseticida já conhecida do extrato de neem se manteria após do processo de microencapsulamento utilizando ácidos húmicos como biopolímero. Para o ensaio foi escolhido a inseto praga *Spodoptera frugiperda*, por suas conhecidas ações malélicas em diversos cultivos, principalmente no milho e algodão (PEREZ-ZUBIRI *et al.*, 2016).

5.10.1 - Avaliação dos produtos formulados em dieta artificial sobre *Spodoptera frugiperda*

As micropartículas formuladas com ácidos húmicos como matriz polimérica NC3 e NC4 formuladas com 250 mg e 750 mg de ácidos húmicos, respectivamente foram avaliadas biologicamente frente a *S. frugiperda*. O extrato de neem foi utilizado como controle no ensaio biológico, usando 60,0 mg para cada 200,0 g de dieta artificial. O cálculo do teor de aza-A no extrato de neem permite inferir a quantidade de azadirachtina em 60 mg de extrato de neem presente na dieta artificial, sendo 2,0 mg. A quantidade do extrato de neem utilizado foi superior em comparação com o extrato de neem utilizado nas formulações, no entanto, a quantidade escolhida para a dieta, tanto nas formulações quanto no controle foram iguais. Foram administradas quantidades de 15 e 45 mg das formulações NC3 e NC4 na dieta artificial, os resultados após do ensaio são apresentados na Figura 5.16.

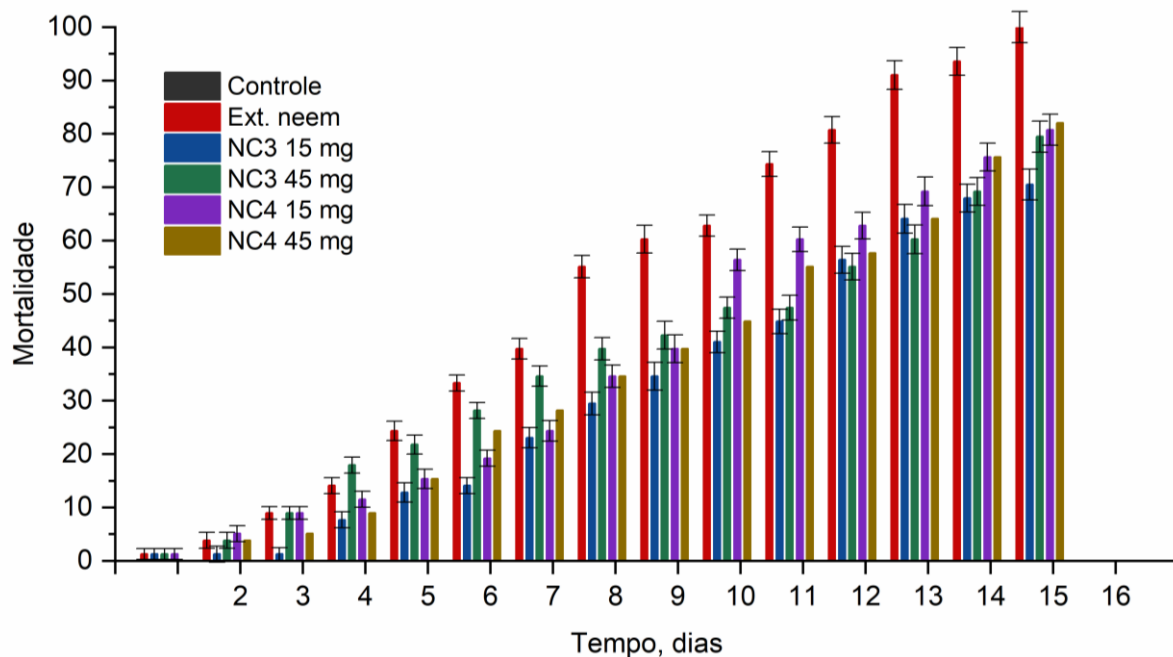


FIGURA 5.16 - Mortalidade de *S. frugiperda* em fase larval alimentadas com dieta artificial e tratada com produtos.

Como observado na Figura 5.16, o período do ensaio foi levado até 15 dias para a avaliação da mortalidade de *S. frugiperda* em presença dos produtos formulados com ácidos húmicos e os controles. O controle de monitoramento no processo após os 15 dias de avaliação conseguiu chegar à fase adulta até polpa, dando continuidade a seu ciclo biológico normal. Enquanto o extrato de neem não formulado apresentou uma efetividade do 100% de mortalidade das lagartas de *S. frugiperda* no período final de avaliação, permitindo conferir a ação inseticida e referente de comparação biológica no controle de *S. frugiperda*. A Figura 5.17 permite a visualização da avaliação biológica dos produtos formulados, onde é possível observar o efeito dos constituintes do extrato de neem sobre a inseto praga e a alterações morfológicas no processo evolutivo. Os produtos formulados e aplicados com maior quantidade de pó (45 mg) no ensaio apresentaram uma maior eficiência em comparação com os utilizados em menores quantidades (15 mg), não tendo uma variação significativa na mortalidade de *S. frugiperda*.

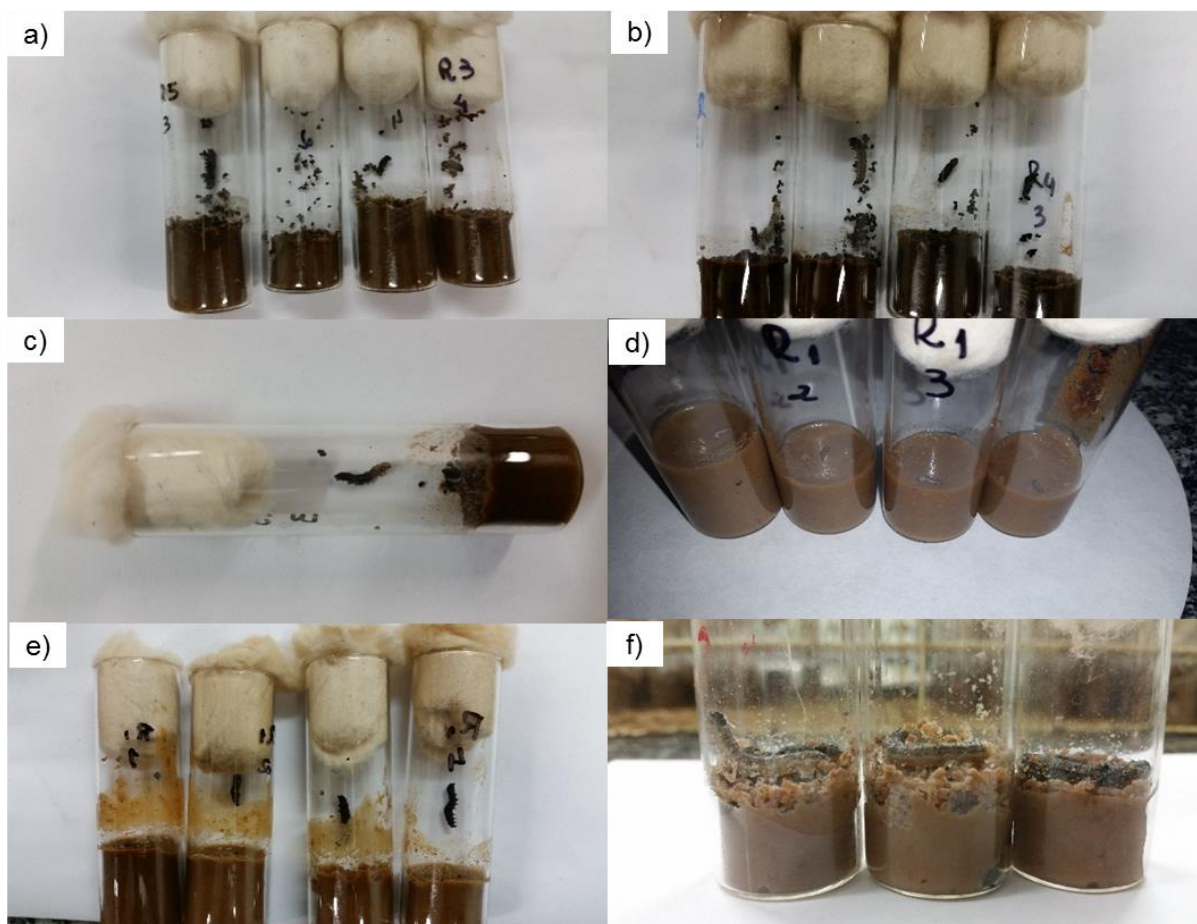


FIGURA 5.17 - Larvas *S. frugiperda* afetadas após ingerir a dieta artificial com produtos e extratos de neem: a) produto NC3 (15 mg), b) NC3 (45 mg), c) NC4 (15 mg), c) NC4 (45 mg), e) neem não formulado, e f) controle (dieta sem neem)

Todas as formulações apresentaram efeito sobre *S. frugiperda* representando mortalidades superiores a $78,5 \pm 0,1\%$ no ensaio, tendo ação de efeito inseticida dos produtos no período médio do $39,3 \pm 0,1\%$ durante 10 dias. As larvas que seguiram sobreviver ao efeito inseticida dos produtos avaliados nos 15 dias foram deixadas para observar o efeito dos produtos a longo prazo na dieta artificial, acareando de formações morfológicas da fase larval de seu desenvolvimento normal (Figura 5. 18).

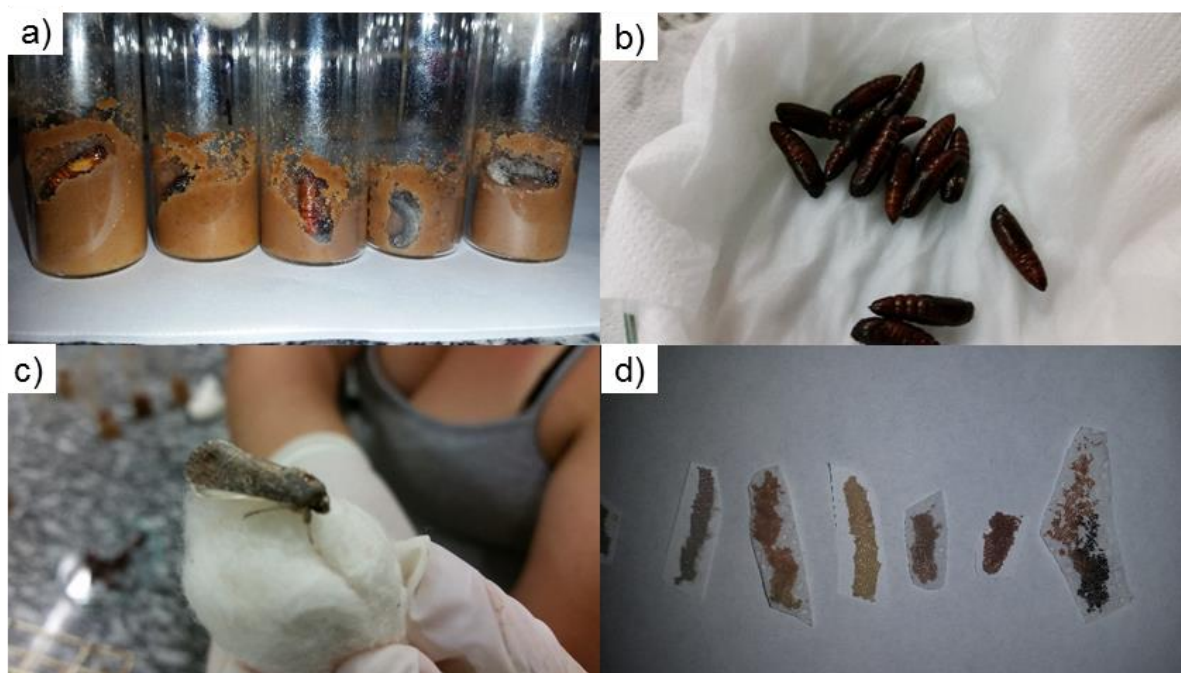


FIGURA 5.18 - Desenvolvimento larval de *S. frugiperda* durante o ensaio: a) e b) pupas com diminuição no tamanho; c) fase adulta desenvolvida no controle (Dieta sem produtos formulados); e d) ovos de *S. frugiperda* no controle

5.10.2 - Avaliação dos produtos formulados em pó pulverizados sobre *S. frugiperda* simulando aplicação de campo

Para verificar a eficiência dos produtos obtidos após o micro/nanoencapsulamento com ácidos húmicos como matriz polimérica sobre *S. frugiperda* foi avaliada a aplicação dos produtos sob plantas de milho, simulando condições de cultivos (Figura 5.20b). Os produtos foram pulverizados sobre as plantas de milho, nas mesmas concentrações de aplicação no ensaio da dieta artificial, com o propósito de examinar a eficácia dos produtos formulados sobre *S. frugiperda*. Os produtos foram distribuídos sem toda a planta de milho com o alvo de avaliar a capacidade inseticida dos produtos micro/nanoencapsulados após aplicação. Posteriormente as plantas previamente cultivadas com substrato para crescimento à $25\pm 1^\circ\text{C}$, foram desenvolvidas até 15 dias para aplicação das larvas de *S. frugiperda* e posterior administração dos produtos nanoencapsulados, os resultados após do ensaio são apresentados na Figura 5.19.

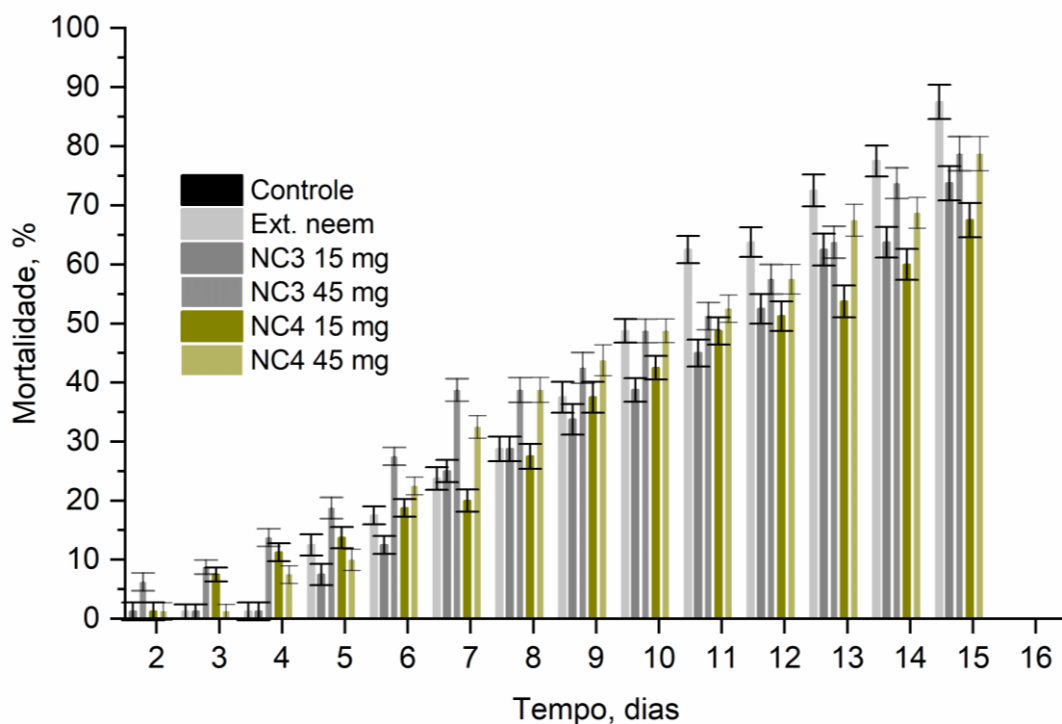


FIGURA 5.19 - Mortalidade da fase larval de *S. frugiperda* após pulverização dos produtos em culturas de milho.

A aplicação dos produtos micro/nanoencapsulados em quantidades diferentes (15 e 45 mg) foram mantidos nas concentrações utilizadas na avaliação da mortalidade em dieta artificial como comparativo de ação, apresentando efeitos significativos na fase de desenvolvimento de *S. frugiperda*, promovendo mortalidade média de até 50% no período de 10 dias. Os produtos aplicados em maiores quantidades causaram em menor tempo mortalidade de *S. frugiperda*. Os resultados tardios em comparação com o bioensaio em dieta artificial apresentaram diminuição na alimentação no tempo de ensaio, com alterações após os dias de avaliação com alterações morfológicas. Dimensionando os dados obtidos no campo de ação em grande escala, o retardamento no ciclo biológico das lagartas devido à falta de alimentação irá prejudicar sua multiplicação e não afeitar o ecossistema como ocorre com os inseticidas sintéticos convencionais devido ao seu efeito ‘*knock-down*’ (SODERLUND *et al.*, 2003).

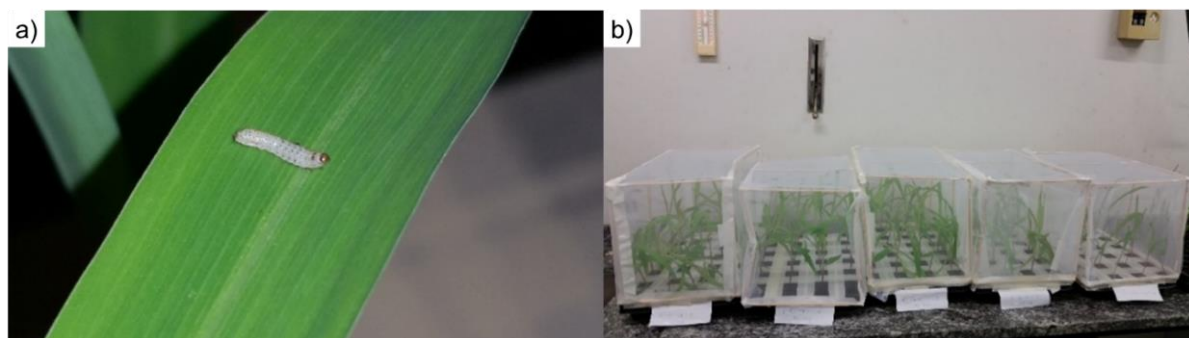


FIGURA 5.20 - Avaliação dos produtos sobre plantas de milho com *S. frugiperda*: a) aplicação de lagarta em folhas, e b) avaliação isolada (Simulação ambiental).

5.11 - Determinação da capacidade fertilizante dos produtos formulados em pó

A incorporação dos ácidos húmicos nas formulações nos produtos micro/nanoencapsulados teve principalmente dois objetivos: a funcionalidade biopolimérica, aproveitando a capacidade biodegradável e a capacidade fertilizante influenciando diretamente na fertilidade do solo, assim como a contribuição simultânea de forma significativa na estabilidade, afetando na absorção dos nutrientes e como consequência no crescimento da planta. Mantendo as concentração e quantidade aplicada nos bioensaios com *S. frugiperda*, foram desenvolvidos ensaios de avaliação da capacidade fertilizante dos produtos micro/nanoencapsulados NC3 e NC4 implementado 20 plantas de milho por cada amostra, o extrato de neem não formulado como controle, e finalmente um controle sem alterações no substrato como referente de desenvolvimento natural (Figura 5.21).

Os resultados apresentados na Figura 5.22 mostram a avaliação expressada em porcentagens de germinação das plantas de milho a partir das massas das diferentes partes da planta calculados após a avaliação de 15 dias. Os dados obtidos indicam uma germinação total média de $89,5 \pm 0,1\%$ das plantas tratadas com os produtos formulados em pó, influenciando no crescimento devido à capacidade de fertilização dos produtos formulados com ácidos húmicos. Desse modo, a dualidade da função dos ácidos húmicos no processo de micro/nanoencapsulamento e ação compósita teve relevância com os resultados obtidos na determinação da germinação e na matriz polimérica dos micros/nanopartículas formuladas, com rendimentos médios acima de 70%.

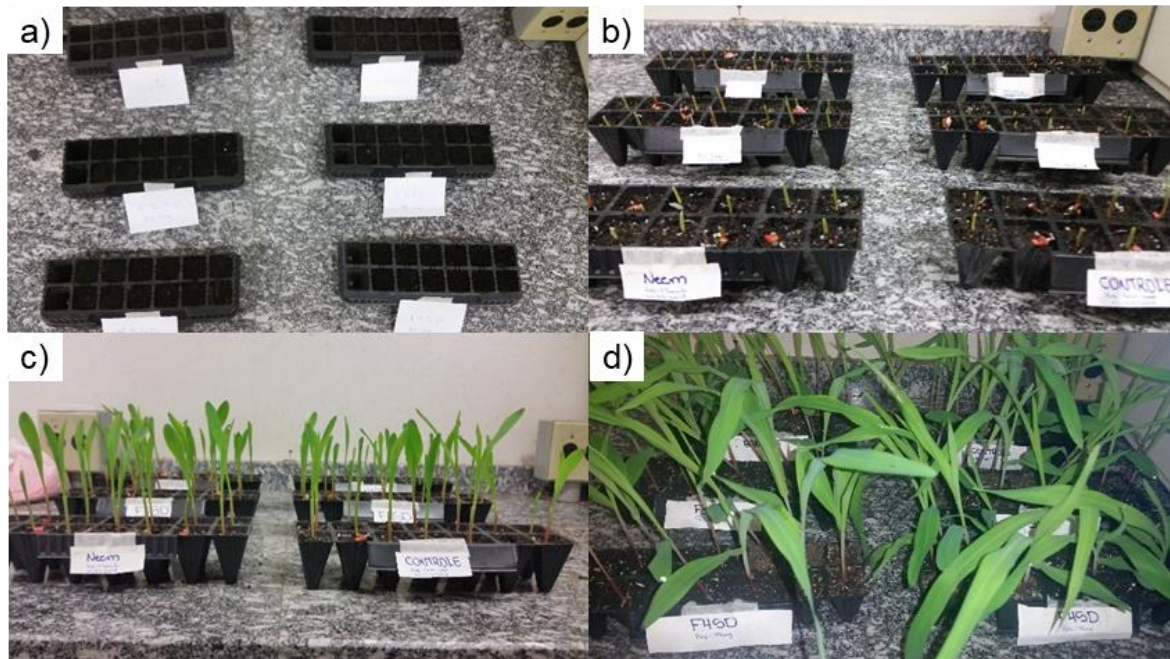


FIGURA 5.21 - Capacidade fertilizante dos produtos: a) dia inicial (0), b) 3 dias de ensaio, c) fertilização de plantas de milho (9 dias), e d) 14 dias de ensaio.

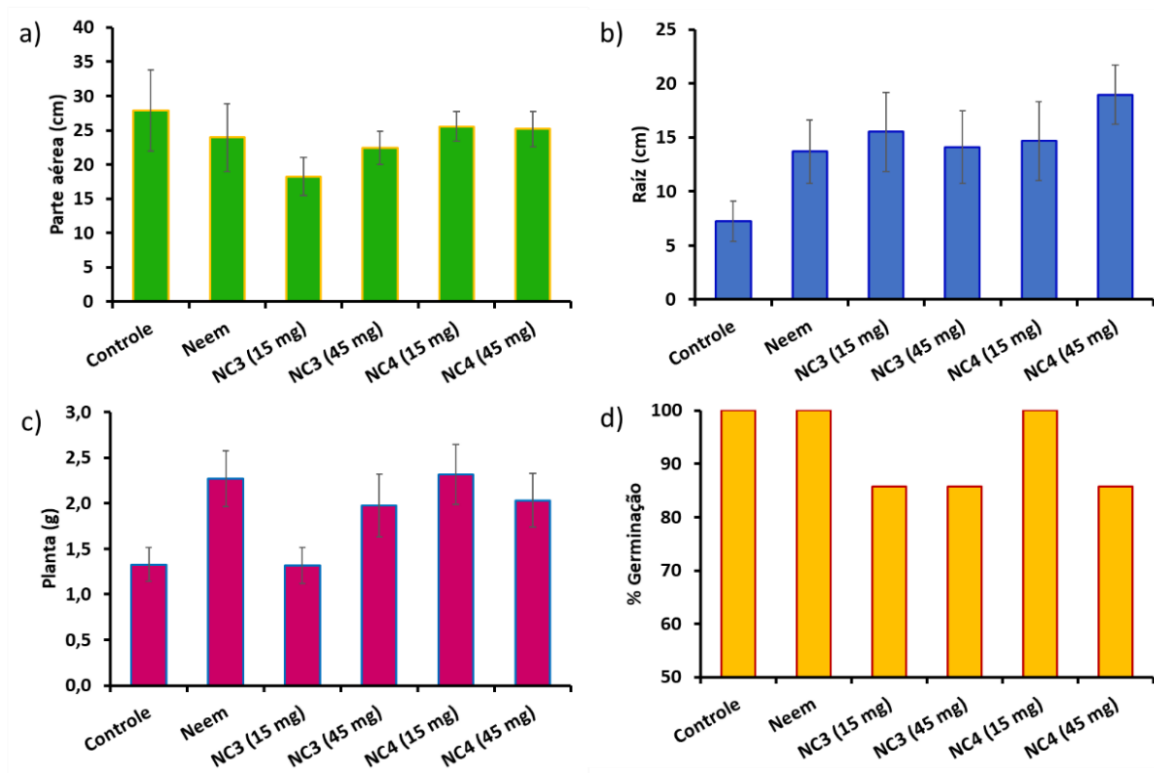


FIGURA 5.22 - Avaliação fertilizante dos produtos microencapsulados: a) parte aérea, b) raiz, c) planta, e d) % Germinação.

O resultado da formulação NC4 representa o maior uso das substâncias húmicas nas formulações, estabelecidas na obtenção de micro/nanocápsulas em pó (item 5.8), onde foram empregados 750 mg de ácidos húmicos e 250 mg para as amostras NC3, respectivamente. O anterior pode ser associado aos resultados, estabelecendo uma relação da germinação das plantas de milho e à quantidade de ácidos húmicos utilizados nas formulações dos produtos, sendo diretamente proporcional ao crescimento da planta de milho.

6 - CONCLUSÃO

O método escolhido para o desenvolvimento das micro/nanopartículas formuladas com ácidos húmicos como matriz biopolimérica e carregadas com uma substância bioativa a partir do extrato das amêndoas de sementes da planta *Azadirachtina indica* para obtenção de um produto natural formulado com ação inseticida-fertilizante apresentou uma eficiência superior a $70,3 \pm 0,1\%$, com pouca variabilidade na estabilidade de aza-A micro/nanoencapsulada como princípio ativo, mantendo maior tempo de estabilidade durante sua ação inseticida. Assim, as micro/nanopartículas apresentaram ganhos na proteção dos constituintes ativos do extrato vegetal do neem. A comparação com diferentes biopolímeros permitiu a comparação no processo de encapsulamento com ácidos húmicos como matriz polimérica, permitindo a avaliação deste como biopolímero e aproveitando as propriedades fertilizantes como alvo de doble funcionalidade nos produtos finais em pó obtidos por *Spray Dryer*.

Os estudos de avaliação da estabilidade de aza-A, promovidos na câmara de degradação fotoquímica (UV), temperatura, cinética de liberação, assim como o monitoramento quantitativo da substância ativa por CLAE-UV, comprovaram a eficiência pelo micro/encapsulamento do método escolhido na obtenção dos produtos formulados. Além das propriedades avaliadas na estabilidade de aza-A, a verificação do pH nas amostras em suspensões coloidais por 60 dias apresentaram dados médios características de ácidos débeis ou tênues, estando de acordo com faixas gerais de pH adequados para usos tópicos e comerciais. A cinética de liberação do micro/nanocápsulas em suspensão coloidal demonstrou uma liberação controlada e eficiente, com uma tendência de liberação de $40 \pm 0,5\%$ em 12 h e posteriormente uma diminuição paulatina no tempo restante da avaliação até 72 h.

O bioensaio com a lagarta militar *S. frugiperda* demonstraram resultados da proteção de aza-A avaliados, apresentando mortalidades superiores de $78,7 \pm 0,1\%$ (valor médio) na avaliação dos produtos formulados em pó incorporados em dieta artificial e $76,2 \pm 0,1\%$ (valor médio) na análise dos produtos micro/nanoencapsulados pulverizados em plantas de milho. Adicionalmente, a capacidade fertilizante dos produtos formulados com ácidos húmicos, proporcionaram uma germinação das plantas de milho uma eficiência de $89,1 \pm 0,1\%$. Sendo os resultados anteriores promissórios para promover biopesticidas micro/nanoencapsulados com biopolimérica, aproveitando uma dupla funcionalidade da matriz polimérica, neste caso como fertilizante.

Os processos avaliados nesta dissertação deram apenas os primeiros passos que apontam a novas estratégias para o controle de insetos pragas com micro/nanocápsulas biopoliméricas de dupla funcionalidade fertilizante favorecendo o desenvolvimento das plantas. Existem melhorias e modificações a fazer, sobretudo na perspectiva de torná-lo num processo mais integro, variando etapas para a otimização e obtenção de maiores rendimentos numa só unidade no produto final.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, F. O., OLIVEIRA, E. F., PAULA, H. C., & DE PAULA, R. C. "Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation". *Carbohydrate Polymers*, **89** (4): 1277-1282, (2012).
- AKTAR, W., SENGUPTA, D., & CHOWDHURY, A. "Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards". *Interdisciplinary toxicology*, **2** (1): 1-12, (2009).
- ALBISA, A., PIACENTINI, E., SEBASTIAN, V., ARRUEBO, M., SANTAMARIA, J., & GIORNO, L. "Preparation of Drug-Loaded PLGA-PEG Nanoparticles by Membrane-Assisted Nanoprecipitation". *Pharmaceutical Research*, **34** (6): 1296-1308, (2017).
- ALMEIDA, F. V., CENTENO, A. J., BISINOTI, M. C., & JARDIM, W. F. "Substâncias tóxicas persistentes (STP) no Brasil". *Química Nova*, 1976-1985, (2007).
- ANJALI, C., SHARMA, Y., MUKHERJEE, A., & CHANDRASEKARAN, N. "Neem oil (*Azadirachta indica*) nanoemulsion—a potent larvicidal agent against *Culex quinquefasciatus*". *Pest management science*, **68** (2): 158-163, (2012).
- Anjum, R., Rahman, M., Masood, F., & Malik, A. (2012). Bioremediation of pesticides from soil and wastewater. In *Environmental Protection Strategies for Sustainable Development* (pp. 295-328): Springer.
- ANVISA, A. N. d. V. S. R. (2003). Guia para a Validação de Métodos Analíticos e Bionalíticos.
- ARCHANA, B., TABASSUM, P., & PRANITA, D. "Review on neem (*Azadirachta indica* A. Juss) as a potencial source of organic pesticide". *International Journal of Ayurveda and Pharma Research*, **5** (4): 12-15, (2017).
- Aubry, J., Ganachaud, F., Cohen Addad, J.-P., & Cabane, B. (2009). Nanoprecipitation of polymethylmethacrylate by solvent shifting: 1. Boundaries. In *Langmuir* (Vol. 25, pp. 1970-1979).
- AZEREDO, A., TORRES, J. P., DE FREITAS FONSECA, M., BRITTO, J. L., BASTOS, W. R., E SILVA, C. E. A., . . . CLAUDIO, L. "DDT and its metabolites in breast milk from the Madeira River basin in the Amazon, Brazil". *Chemosphere*, **73** (1): S246-S251, (2008).
- BECK-BROICHSITTER, M., RYTTING, E., LEBHARDT, T., WANG, X., & KISSEL, T. "Preparation of nanoparticles by solvent displacement for drug delivery: a shift in the "ouzo region" upon drug loading". *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **41** (2): 244-253, (2010).

- BENELLI, G., CANALE, A., TONIOLO, C., HIGUCHI, A., MURUGAN, K., PAVELA, R., & NICOLETTI, M. "Neem (*Azadirachta indica*): towards the ideal insecticide?". *Natural product research*, **31** (4): 369-386, (2017).
- BENGE, M. "The tree and its characteristics, cultivation and propagation of the neem tree". *Focus on Phytochemical Pesticides*; M Jacobson (ed.). CRC, Boca Raton, Florida. pp, 1-17, (1989).
- Bertolote, J. M., Fleischmann, A., Eddleston, M., & Gunnell, D. (2006). Deaths from pesticide poisoning: a global response. In: RCP.
- BHAGAT, D., SAMANTA, S. K., & BHATTACHARYA, S. "Efficient management of fruit pests by pheromone nanogels". *Scientific reports*, **3** (2013).
- BILATI, U., ALLÉMANN, E., & DOELKER, E. "Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles". *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **24** (1): 67-75, (2005).
- BITTENCOURT, A. M. O cultivo do nim indiano (*Azadirachta indica* A. Juss): Uma visão econômica. Universidade Federal do Paraná. (2006),
- Blackwell, A. (1997). *The Neem Tree Azadirachta indica* A. Juss. and Other Meliaceae Plants: Source of Unique Products for Integrated Pest Management, Medicine, Industry and Other Purposes. Edited by H. Schmutterer. Weinheim, Federal Republic of Germany: VCH (1995), pp. 716, DM198. 00. ISBN 3-527-30054-6. In: Cambridge Univ Press.
- BLANCO, C. A., STORER, N. P., ABEL, C. A., JACKSON, R., LEONARD, R., LOPEZ, J. D., . . . TERÁN-VARGAS, A. P. "Baseline susceptibility of tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry1F toxin from *Bacillus thuringiensis*". *Journal of economic entomology*, **101** (1): 168-173, (2008).
- BOURSIER, C. M., BOSCO, D., COULIBALY, A., & NEGRE, M. "Are traditional neem extract preparations as efficient as a commercial formulation of azadirachtin A?". *Crop Protection*, **30** (3): 318-322, (2011).
- CABONI, P., SARAI, G., ANGIANI, A., GARCIA, A. J., LAI, F., DEDOLA, F., & CABRAS, P. "Residues and persistence of neem formulations on strawberry after field treatment". *Journal of agricultural and food chemistry*, **54** (26): 10026-10032, (2006).
- CARVALHO, F. P. "Pesticides, environment, and food safety". *Food and Energy Security*, **6** (2): 48-60, (2017).

- CARVALHO, R. A., OMOTO, C., FIELD, L. M., WILLIAMSON, M. S., & BASS, C. "Investigating the molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*". *PLoS One*, **8** (4): e62268, (2013).
- CARVALHO, S., VENDRAMIM, J. D., SÁ, I., SILVA, M., RIBEIRO, L., & FORIM, M. "Efeito inseticida sistêmico de nanoformulações à base de nim sobre *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) biótipo B em tomateiro". *Bragantia*, **74** (3): 298-306, (2015).
- CARVALHO, S. S., VENDRAMIM, J. D., PITTA, R. M., & FORIM, M. R. "Efficiency of neem oil nanoformulations to *Bemisia tabaci* (Genn.) biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae)". *Semina: Ciências Agrárias*, **33** (1): (2012).
- CHANDLER, D., BAILEY, A. S., TATCHELL, G. M., DAVIDSON, G., GREAVES, J., & GRANT, W. P. "The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management". *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **366** (1573): 1987-1998, (2011).
- CHAUDHARY, S., KANWAR, R. K., SEHGAL, A., CAHILL, D. M., BARROW, C. J., SEHGAL, R., & KANWAR, J. R. "Progress on *Azadirachta indica* based biopesticides in replacing synthetic toxic pesticides". *Frontiers in plant science*, **8** (2017).
- CHIDAMBARAM, M., & KRISHNASAMY, K. "Modifications to the conventional nanoprecipitation technique: An approach to fabricate narrow sized polymeric nanoparticles". *Advanced pharmaceutical bulletin*, **4** (2): 205, (2014).
- CHOI, A.-J., KIM, C.-J., CHO, Y.-J., HWANG, J.-K., & KIM, C.-T. "Characterization of capsaicin-loaded nanoemulsions stabilized with alginate and chitosan by self-assembly". *Food and Bioprocess Technology*, **4** (6): 1119-1126, (2011).
- CHOUHDURY, R., MAJUMDER, M., ROY, D. N., BASUMALLICK, S., & MISRA, T. K. "Phytotoxicity of Ag nanoparticles prepared by biogenic and chemical methods". *International Nano Letters*, **6** (3): 153-159, (2016).
- CLOYD, R. A., & BETHKE, J. A. "Impact of neonicotinoid insecticides on natural enemies in greenhouse and interiorscape environments". *Pest management science*, **67** (1): 3-9, (2011).
- Conway, G. R., & Pretty, J. N. (2013). *Unwelcome harvest: agriculture and pollution*: Routledge.
- COSTA, E. M., TORRES, S. B., FERREIRA, R. R., SILVA, F. G. D., & ARAUJO, E. L. "Aqueous extract of neem seeds in the control of *Liriomyza sativae* (Diptera: Agromyzidae) in the melon". *Revista Ciência Agronômica*, **47** (2): 401-406, (2016).

- COSTA, E. S. Nano-microencapsulados de extrato de *Azadirachta indica* usando ligninas do bagaço de cana-de-açúcar: estabilidade e eficácia contra insetos pragas. São Carlos, Brasil, Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos. (Doutorado), (2015), 160.
- COSTA, E. S., PERLATTI, B., SILVA, E. M. D., MATOS, A. P., DA SILVA, M. F. G., FERNANDES, J. B., . . . FORIM, M. R. "Use of lignins from sugarcane bagasse for assembling microparticles loaded with *Azadirachta indica* extracts for use as neem-based organic insecticides". *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **28** (1): 126-135, (2017).
- Coxall, M. (2014). *Ethical Eating: A Complete Guide to Sustainable Food*: Malcolm Coxall, Cornelio Books.
- CZAJA, K., GÓRALCZYK, K., STRUCIŃSKI, P., HERNIK, A., KORCZ, W., MINORCZYK, M., . . . LUDWICKI, J. K. "Biopesticides—towards increased consumer safety in the European Union". *Pest management science*, **71** (1): 3-6, (2015).
- D AMATO, C., TORRES, J. P., & MALM, O. "DDT (dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental-uma revisão". *Química Nova*, **25** (6/A): 995-1002, (2002).
- DA COSTA, J. T., FORIM, M. R., COSTA, E. S., DE SOUZA, J. R., MONDEGO, J. M., & JUNIOR, A. L. B. "Effects of different formulations of neem oil-based products on control *Zabrotes subfasciatus* (Boheman, 1833)(Coleoptera: Bruchidae) on beans". *Journal of stored products research*, **56** 49-53, (2014).
- DA SILVA, C. B., & PARRA, J. P. "New method for rearing *Spodoptera frugiperda* in laboratory shows that larval cannibalism is not obligatory". *Revista Brasileira de Entomologia*, **57** (3): 347-349, (2013).
- DA SILVA, K., SPENCER, T., CRESPO, A., & SIEGFRIED, B. "Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) field populations to the Cry1F *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein". *Florida Entomologist*, **99** (4): 629-633, (2016).
- DAHIYA, N., CHIANESE, G., ABAY, S. M., TAGLIALATELA-SCAFATI, O., ESPOSITO, F., LUPIDI, G., . . . HABLUETZEL, A. "In vitro and ex vivo activity of an *Azadirachta indica* A. Juss. seed kernel extract on early sporogonic development of *Plasmodium* in comparison with azadirachtin A, its most abundant constituent". *Phytomedicine*, **23** (14): 1743-1752, (2016).
- DAI, J., YAYLAYAN, V. A., VIJAYA RAGHAVAN, G., PARE, J. R., & LIU, Z. "Multivariate calibration for the determination of total azadirachtin-related limonoids and simple

- terpenoids in neem extracts using vanillin assay". *Journal of agricultural and food chemistry*, **49** (3): 1169-1174, (2001).
- DALLA VILLA, R., DE CARVALHO DORES, E. F. G., CARBO, L., & CUNHA, M. L. F. "Dissipation of DDT in a heavily contaminated soil in Mato Grosso, Brazil". *Chemosphere*, **64** (4): 549-554, (2006).
- DAMALAS, C. A., & ELEFTHEROHORINOS, I. G. "Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators". *International journal of environmental research and public health*, **8** (5): 1402-1419, (2011).
- DAS, R., SARMA, S., BRAR, S., & VERMA, M. "Nanoformulation of Insecticides-Novel Products". *J Biofertil Biopestici*, **5** e119, (2014).
- DASGUPTA, N., RANJAN, S., MUNDEKKAD, D., RAMALINGAM, C., SHANKER, R., & KUMAR, A. "Nanotechnology in agro-food: from field to plate". *Food Research International*, **69** 381-400, (2015).
- DAYAN, F. E., CANTRELL, C. L., & DUKE, S. O. "Natural products in crop protection". *Bioorganic & medicinal chemistry*, **17** (12): 4022-4034, (2009).
- DE ALCÂNTARA, R., DA COSTA LOPES, A. S., DE SOUZA, L. C., DE OLIVEIRA LIMA, M., & DA SILVA SANTOS, L. "DDT concentration in fish from the Tapajos River in the Amazon region, Brazil". *Chemosphere*, **153** 340-345, (2016).
- DE MELO, B. A. G., MOTTA, F. L., & SANTANA, M. H. A. "Humic acids: Structural properties and multiple functionalities for novel technological developments". *Materials Science and Engineering: C*, **62** (Supplement C): 967-974, (2016).
- DE PAULA, J. A. M., BRITO, L. F., CAETANO, K. L. F. N., DE MORAIS RODRIGUES, M. C., BORGES, L. L., & DA CONCEIÇÃO, E. C. J. T. "Ultrasound-assisted extraction of azadirachtin from dried entire fruits of *Azadirachta indica* A. Juss.(Meliaceae) and its determination by a validated HPLC-PDA method". **149** 77-84, (2016).
- DEBOST-LEGRAND, A., WAREMBOURG, C., MASSART, C., CHEVRIER, C., BONVALLOT, N., MONFORT, C., . . . CORDIER, S. "Prenatal exposure to persistent organic pollutants and organophosphate pesticides, and markers of glucose metabolism at birth". *Environmental research*, **146** 207-217, (2016).
- DENARDI, S. E., BECHARA, G. H., DE OLIVEIRA, P. R., & CAMARGO-MATHIAS, M. I. "Azadirachta indica A. Juss (neem) induced morphological changes on oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae) tick females". *Experimental parasitology*, **126** (4): 462-470, (2010).

- Dhir, B. (2017). Biofertilizers and Biopesticides: Eco-friendly Biological Agents. In *Advances in Environmental Biotechnology* (pp. 167-188): Springer.
- DJOMAHA, E., GHOGOMU, R., HANNA, R., NGATAT, E., & LONTCHI, N. "The effects of extract of *Azadirachta indica* (Neem) oil and Imidacloprid (IRON 30SC) on the population dynamics of *Brevicoryne brassicae*, *Lipaphis pseudobrassicae* and *Plutella xylostella* on white cabbage". *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*, **8** (4): 135-142, (2016).
- DONG, W., ZHANG, X., WANG, H., DAI, X., SUN, X., QIU, W., & YANG, F. "Effect of different fertilizer application on the soil fertility of paddy soils in red soil region of southern China". *PLoS One*, **7** (9): e44504, (2012).
- DOS SANTOS SILVA, M., COCENZA, D. S., DE MELO, N. F. S., GRILLO, R., ROSA, A. H., & FRACETO, L. F. "Nanopartículas de alginato como sistema de liberação para o herbicida clomazone". *Química Nova*, **33** (9): 1868-1873, (2010).
- DOS SANTOS SILVA, M., COCENZA, D. S., GRILLO, R., DE MELO, N. F. S., TONELLO, P. S., DE OLIVEIRA, L. C., . . . FRACETO, L. F. "Paraquat-loaded alginate/chitosan nanoparticles: preparation, characterization and soil sorption studies". *Journal of hazardous materials*, **190** (1): 366-374, (2011).
- DU, Y.-H., JIA, R.-Y., YIN, Z.-Q., PU, Z.-H., CHEN, J., YANG, F., . . . LU, Y. "Acaricidal activity of extracts of neem (*Azadirachta indica*) oil against the larvae of the rabbit mite *Sarcoptes scabiei* var. *cuniculi* in vitro". *Veterinary parasitology*, **157** (1): 144-148, (2008).
- E SILVA, C. E. D. A., AZEREDO, A., LAILSON-BRITO, J., TORRES, J. P. M., & MALM, O. "Polychlorinated biphenyls and DDT in swordfish (*Xiphias gladius*) and blue shark (*Prionace glauca*) from Brazilian coast". *Chemosphere*, **67** (9): S48-S53, (2007).
- EL-SAMAHY, M., EL-GHOBARY, A. M., & KHAFAGY, I. "Using silica nanoparticles and neem oil extract as new approaches to control *Tuta absoluta* (meyrick) in tomato under field conditions". *Int. J. Plant Soil Sci*, **3** 1355-1365, (2014).
- ESPARZA-DÍAZ, G., LÓPEZ-COLLADO, J., VILLANUEVA-JIMÉNEZ, J. A., OSORIO-ACOSTA, F., OTERO-COLINA, G., & CAMACHO-DÍAZ, E. "Concentración de azadiractina, efectividad insecticida y fitotoxicidad de cuatro extractos de *Azadirachta indica* A. Juss". *Agrociencia*, **44** (7): 821-833, (2010).

- FAYE, M. Nouveau procédé de fractionnement de la graine de Neem (*Azadirachta Indica* A. Jussi) sénégalais: production d'un bio-pesticide d'huile et de tourteau. Institut National Polytechnique de Toulouse. (2010),
- FENG, B.-H., & PENG, L.-F. "Synthesis and characterization of carboxymethyl chitosan carrying ricinoleic functions as an emulsifier for azadirachtin". *Carbohydrate Polymers*, **88** (2): 576-582, (2012).
- FERRARI, R., YU, Y., MORBIDELLI, M., HUTCHINSON, R. A., & MOSCATELLI, D. "ε-Caprolactone-Based Macromonomers Suitable for Biodegradable Nanoparticles Synthesis through Free Radical Polymerization". *Macromolecules*, **44** (23): 9205-9212, (2011).
- FESSI, H., PUISIEUX, F., DEVISSAGUET, J. P., AMMOURY, N., & BENITA, S. "Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement". *International Journal of Pharmaceutics*, **55** (1): R1-R4, (1989).
- FLORES-CÉSPEDES, F., MARTÍNEZ-DOMÍNGUEZ, G. P., VILLAFRANCA-SÁNCHEZ, M., & FERNÁNDEZ-PÉREZ, M. "Preparation and characterization of azadirachtin alginate-biosorbent based formulations: water release kinetics and photodegradation study". *Journal of agricultural and food chemistry*, **63** (38): 8391-8398, (2015).
- FONTES, E. M., PIRES, C. S., SUJII, E. R., & PANIZZI, A. R. "The environmental effects of genetically modified crops resistant to insects". *Neotropical Entomology*, **31** (4): 497-513, (2002).
- FORIM, M. R., COSTA, E. S., DA SILVA, M. F. T. D. G. A. F., FERNANDES, J. O. B., MONDEGO, J. M., & BOIÇA JUNIOR, A. L. "Development of a new method to prepare nano-/microparticles loaded with extracts of *Azadirachta indica*, their characterization and use in controlling *Plutella xylostella*". *Journal of agricultural and food chemistry*, **61** (38): 9131-9139, (2013).
- FORIM, M. R., DA SILVA, M. F., & FERNANDES, J. O. B. "Secondary metabolism as a measurement of efficacy of botanical extracts: The use of *Azadirachta indica* (Neem) as a model". *Insecticides - Advances in Integrated Pest Management*. Rijeka: In-Tech, 367-390, (2011).
- FORIM, M. R., MATOS, A. P., SILVA, M. F. D. G. F. D., CASS, Q. B., VIEIRA, P. C., & FERNANDES, J. B. "Uso de CLAE no controle de qualidade em produtos comerciais de nim: reprodutibilidade da ação inseticida". *Química Nova*, **33** (5): 1082-1087, (2010).

- FORMARIZ, T. P., URBAN, M. C. C., SILVA JÚNIOR, A. A. D., GREMIÃO, M. P. D., & OLIVEIRA, A. G. D. J. R. B. D. C. F. "Microemulsion and liquid crystals as drug delivery systems". *41* (3): 301-313, (2005).
- FRACETO, L. F., GRILLO, R., DE MEDEIROS, G. A., SCOGNAMIGLIO, V., REA, G., & BARTOLUCCI, C. "Nanotechnology in Agriculture: which innovation potential does it have?". *Frontiers in Environmental Science*, **4** 20, (2016).
- GALADIMA, I. B., AUWAL, H. M., ABUBAKAR, I., MADU, J., & JOSEPH, P. "Enhanced Nematicidal Effect of Cowdung Soil Amendment by Neem (*Azadirachta indica*)". *Open Access Library Journal*, **2** (08): 1-4, (2015).
- GARCIA, F. P., ASCENCIO, S. Y. C., OYARZUN, J. C. G., HERNANDEZ, A. C., & ALAVARADO, P. V. "Pesticides: classification, uses and toxicity. Measures of exposure and genotoxic risks". *Journal of Research in Environmental Science and Toxicology* (ISSN: 2315-5698) Vol, **1** (11): 279-293, (2012).
- GHORMADE, V., DESHPANDE, M. V., & PAKNIKAR, K. M. "Perspectives for nanobiotechnology enabled protection and nutrition of plants". *Biotechnology advances*, **29** (6): 792-803, (2011).
- GIONGO, A. M. M., VENDRAMIM, J. D., & FORIM, M. R. "Evaluation of neem-based nanoformulations as alternative to control fall armyworm". *Ciência e Agrotecnologia*, **40** (1): 26-36, (2016).
- GLARE, T., CARADUS, J., GELERNTER, W., JACKSON, T., KEYHANI, N., KÖHL, J., . . . STEWART, A. "Have biopesticides come of age?". *Trends in biotechnology*, **30** (5): 250-258, (2012).
- GOVINDACHARI, T., & GOPALAKRISHNAN, G. "Azadirachtins: Supermoleculas for insect control". *Journal of the Indian Chemical Society*, **75** (10-12): 655-661, (1998).
- GROSSMAN, R. B., & LEY, S. V. "Chemistry of insect antifeedants from *Azadirachta indica* (Part 17): Synthesis of model compounds of azadirachtin. Unusual effect of remote substituents on the course of the oxidative ring contraction reaction". *Tetrahedron*, **50** (39): 11553-11568, (1994).
- GRUBER, A. "Wachstum, Fruchtertrag und Azadirachtingehalt der Samen von *Azadirachta indica* A". Juss auf verschiedenen Standorten in Nicaragua. Doctor thesis, Technical Univ. of Berlin, Germany, (1991).
- GUAN, H., CHI, D., YU, J., & LI, X. "A novel photodegradable insecticide: Preparation, characterization and properties evaluation of nano-Imidacloprid". *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **92** (2): 83-91, (2008).

- GUNNELL, D., EDDLESTON, M., PHILLIPS, M. R., & KONRADSEN, F. "The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: systematic review". *BMC public health*, **7** (1): 357, (2007).
- GUPTA, S. C., PRASAD, S., TYAGI, A. K., KUNNUMAKKARA, A. B., & AGGARWAL, B. B. "Neem (*Azadirachta indica*): An indian traditional panacea with modern molecular basis". *Phytomedicine*, **34** 14-20, (2017).
- GUTERRES, S., FESSI, H., BARRATT, G., DEVISSAGUET, J.-P., & PUISIEUX, F. "Poly (DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study". *International Journal of Pharmaceutics*, **113** (1): 57-63, (1995).
- HALDAR, S. Chemical finger-pringing, metabolic profiling, and biotransformation of neem (*Azadirachta Indica*) Limonoids. Pune, India, Chemical-Biology Unit, Division of Organic Chemistry, CSIR-National Chemical Laboratory, Pune. (Doctoral), (2014), 344.
- HARUN, N. B., REDHUAN, M., ELIYANA, N., KHAING, A. T., & MOHAMED, W. Z. "Molluscicidal Properties of *Azadirachta Indica* on *Pomacea Canaliculata*". *International Medical Journal*, **23** (6): (2016).
- ISMAN, M. B. "Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world". *Annu. Rev. Entomol.*, **51** 45-66, (2006).
- JACOBSEN, C. S., & HJELMSØ, M. H. "Agricultural soils, pesticides and microbial diversity". *Current Opinion in Biotechnology*, **27** 15-20, (2014).
- JÄGER, A. Caracterização físico-química da parede polimérica de nanocápsulas através de sondas fluorescentes. Porto Alegre, Brasil, Instituto de Química. Programa de Pós-Graduação em Química., Universidade Federal do Rio Grande do Sul. (Maestría), (2005), 59.
- JANNOURA, R., JOERGENSEN, R. G., & BRUNS, C. "Organic fertilizer effects on growth, crop yield, and soil microbial biomass indices in sole and intercropped peas and oats under organic farming conditions". *European Journal of Agronomy*, **52** 259-270, (2014).
- JOHNSON, S., & MORGAN, E. D. "Comparison of chromatographic systems for triterpenoids from Neem (*Azadirachta indica*) seeds". *Journal of Chromatography A*, **761** (1): 53-63, (1997).
- Joseph, T., & Morrison, M. (2006). *Nanotechnology in agriculture and food: a nanoforum report*: Nanoforum. org.

- KAGNE, R. "Use of biofertilizers and biopesticides: A potencial tool of sustainable agriculture". Research Front, **Special** (2): 319-322, (2017).
- Kailasa, S. K., Wu, H.-F., & Huang, S.-D. (2013). Recent Developments on Mass Spectrometry for the Analysis of Pesticides in Wastewater. In *Waste Water-Treatment Technologies and Recent Analytical Developments*: InTech.
- KANGO, S., KALIA, S., CELLI, A., NJUGUNA, J., HABIBI, Y., & KUMAR, R. "Surface modification of inorganic nanoparticles for development of organic–inorganic nanocomposites—a review". Progress in Polymer Science, **38** (8): 1232-1261, (2013).
- KASTEN JR, P., PRECETTI, A., & PARRA, J. "Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural". Revista de Agricultura, (1978).
- KIM, K.-H., KABIR, E., & JAHAN, S. A. "Exposure to pesticides and the associated human health effects". Science of The Total Environment, **575** 525-535, (2017).
- KORSMEYER, R. W., GURNY, R., DOELKER, E., BURI, P., & PEPPAS, N. A. "Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers". International journal of pharmaceutics, **15** (1): 25-35, (1983).
- KOUL, O., & WALIA, S. "Comparing impacts of plant extracts and pure allelochemicals and implications for pest control". CAB Reviews: Perspectives in agriculture, veterinary science, nutrition and natural resources, **4** (049): 1-30, (2009).
- KUMAR, J., SHAKIL, N. A., SINGH, M. K., PANKAJ, SINGH, M. K., PANDEY, A., & PANDEY, R. P. "Development of controlled release formulations of azadirachtin-A employing poly (ethylene glycol) based amphiphilic copolymers". Journal of Environmental Science and Health Part B, **45** (4): 310-314, (2010).
- KUMAR, P., BHADAURIA, T., & MISHRA, J. "Impact of application of insecticide quercetin/azadirachtin and chlorpyrifos on earthworm activities in experimental soils in Uttar Pradesh India". Sci. Post Print, **1** (2): 044, (2015).
- LACOUILONCHE, F., GAMISANS, F., CHAUVET, A., GARCIA, M., ESPINA, M., & EGEA, M. "Stability and in vitro drug release of flurbiprofen-loaded poly-ε-caprolactone nanospheres". Drug development and industrial pharmacy, **25** (9): 983-993, (1999).
- LAI, F., WISSING, S. A., MÜLLER, R. H., & FADDA, A. M. "Artemisia arborescens L essential oil-loaded solid lipid nanoparticles for potential agricultural application: preparation and characterization". Aaps Pharmscitech, **7** (1): E10, (2006).

- LAO, S.-B., ZHANG, Z.-X., XU, H.-H., & JIANG, G.-B. "Novel amphiphilic chitosan derivatives: synthesis, characterization and micellar solubilization of rotenone". *Carbohydrate Polymers*, **82** (4): 1136-1142, (2010).
- LENOIR, J. S., MCCONNELL, L. L., FELLERS, G. M., CAHILL, T. M., & SEIBER, J. N. "Summertime transport of current-use pesticides from California's Central Valley to the Sierra Nevada Mountain Range, USA". *Environmental Toxicology and Chemistry*, **18** (12): 2715-2722, (1999).
- LEVY, M., & BENITA, S. "Drug release from submicronized o/w emulsion: a new *in vitro* kinetic evaluation model". *International journal of pharmaceutics*, **66** (1-3): 29-37, (1990).
- LIMA, R. K., CARDOSO, M. G., MORAES, J. C., MELO, B. A., RODRIGUES, V. G., & GUIMARÃES, P. L. "Atividade inseticida do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) sobre lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797)(Lepidoptera: Noctuidae)". *Acta amazônica*, **39** (2): 377-382, (2009).
- LONDRES, F. "Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida". Rio de Janeiro: AS-PTA–Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 190, (2011).
- Martinez, S. (2002). *O nim (Azadirachta indica) natureza, usos múltiplos, produção*: Instituto agrônômico do Paraná (IAPAR).
- Mascarelli, A. (2013). Growing up with pesticides. In: American Association for the Advancement of Science.
- MATOS, A., NEBO, L., CALEGARI, E., BATISTA-PEREIRA, L., VIEIRA, P., FERNANDES, J., . . . RODRIGUES, R. "Atividade biológica de extratos orgânicos de *Trichilia* spp". *Meliaceae*) sobre *Spodoptera frugiperda*, 1-6, (2006).
- MATOS, A. P., NEBO, L., VIEIRA, P. C., FERNANDES, J. B., SILVA, M. F. D. G. F., & RODRIGUES, R. R. "Chemical constituents and insecticidal activity from fruits extracts of *Trichilia elegans* and *T. catigua* (Meliaceae)". *Química Nova*, **32** (6): 1553-1556, (2009).
- MEDINA, E. L., GUTIÉRREZ, C. G., & AYALA, R. D. R. "Nanotecnología y nanoencapsulación de plaguicidas". *Ra Ximhai*, **6** (1): 63-67, (2010).
- MELO, N. F. S. D., GRILLO, R., ROSA, A. H., FRACETO, L. F., DIAS FILHO, N. L., PAULA, E. D., & ARAÚJO, D. R. D. "Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de poli (L-lactídeo) contendo benzocaína". *Química Nova*, 65-69, (2010).

- MORA-HUERTAS, C., FESSI, H., & ELAISSARI, A. "Polymer-based nanocapsules for drug delivery". *International Journal of Pharmaceutics*, **385** (1): 113-142, (2010).
- MORGAN, E. D. "Azadirachtin, a scientific gold mine". *Bioorganic & medicinal chemistry*, **17** (12): 4096-4105, (2009).
- MUGHEIRBI, N. A., PALUCH, K. J., & TAJBER, L. "Heat induced evaporative antisolvent nanoprecipitation (HIEAN) of itraconazole". *International Journal of Pharmaceutics*, **471** (1): 400-411, (2014).
- MÜLLER, K., TIKTAK, A., DIJKMAN, T., GREEN, S., & CLOTHIER, B. "Advances in pesticide risk reduction". *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*, 17-34, (2014).
- NDAKIDEMI, B., MTEI, K., & NDAKIDEMI, P. A. "Impacts of synthetic and botanical pesticides on beneficial insects". *Agricultural Sciences*, **7** (06): 364, (2016).
- Nicoletti, M., Maccioni, O., Coccioletti, T., Mariani, S., & Vitali, F. (2012). Neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss) as source of bioinsecticides. In *Insecticides-Advances in Integrated Pest Management*. InTech.
- NICOLETTI, M., MURUGAN, K., CANALE, A., & BENELLI, G. "Neem-borne molecules as eco-friendly control tools against mosquito vectors of economic importance". *Current Organic Chemistry*, **20** (25): 2681-2689, (2016).
- Norten, E., & Pütz, J. (1999). *Neem: India's miraculous healing plant*. Inner Traditions/Bear & Co.
- NURUZZAMAN, M., RAHMAN, M. M., LIU, Y., & NAIDU, R. "Nanoencapsulation, nano-guard for pesticides: a new window for safe application". *Journal of agricultural and food chemistry*, **64** (7): 1447-1483, (2016).
- NWANKWO, E., ONUSELEOGU, D., OGBONNA, C., & OKOROCHA, A. "Effect of neem leaf extracts (*Azadirachta indica*) and synthetic pesticide (Carbofuran) on the root-knot nematode (*Meloidogyne* spp) of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp)". *International Journal of Entomology Research*, **1** (3): 01-06, (2016).
- OERKE, E.-C., & DEHNE, H.-W. "Safeguarding production—losses in major crops and the role of crop protection". *Crop Protection*, **23** (4): 275-285, (2004).
- OLIVEIRA, C., AUAD, A., MENDES, S., & FRIZZAS, M. "Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture". *Crop Protection*, **56** 50-54, (2014).
- OROZCO-SÁNCHEZ, F., & RODRÍGUEZ-MONROY, M. "Cultivos de células en suspensión de *Azadirachta indica* para la producción de un bioinsecticida". *Revista mexicana de ingeniería química*, **6** (3): 251-258, (2007).

- OSPINA SALAZAR, D. I., HOYOS SANCHEZ, R. A., OROZCO SANCHEZ, F., ARANGO ARTEAGA, M., & GOMEZ LONDONO, L. F. "Antifungal activity of neem (*Azadirachta indica*: Meliaceae) extracts against dermatophytes". *Acta Biológica Colombiana*, **20** (3): 181-192, (2015).
- OULHACI, C. M., DENIS, B., KILANI-MORAKCHI, S., SANDOZ, J. C., KAISER, L., JOLY, D., & ARIBI, N. "Azadirachtin effects on mating success, gametic abnormalities and progeny survival in *Drosophila melanogaster* (Diptera)". *Pest management science*, (2017).
- PALUCKI, M., HIGGINS, J. D., KWONG, E., & TEMPLETON, A. C. "Strategies at the interface of drug discovery and development: early optimization of the solid state phase and preclinical toxicology formulation for potential drug candidates". *Journal of medicinal chemistry*, **53** (16): 5897-5905, (2010).
- PARISI, C., VIGANI, M., & RODRÍGUEZ-CEREZO, E. "Agricultural Nanotechnologies: What are the current possibilities?". *Nano Today*, **10** (2): 124-127, (2015).
- PARK, M., LEE, C.-I., SEO, Y. J., WOO, S. R., SHIN, D., & CHOI, J. "Hybridization of the natural antibiotic, cinnamic acid, with layered double hydroxides (LDH) as green pesticide". *Environmental Science and Pollution Research*, **17** (1): 203-209, (2010).
- PASQUOTO-STIGLIANI, T., CAMPOS, E. V., OLIVEIRA, J. L., SILVA, C. M., BILESKY-JOSÉ, N., GUILGER, M., . . . FRACETO, L. F. "Nanocapsules Containing Neem (*Azadirachta Indica*) Oil: Development, Characterization, And Toxicity Evaluation". *Scientific reports*, **7** (2017).
- PAULA, C. V. D. A competitividade do Brasil, dos Estados Unidos da América (EUA) e da Argentina nas exportações de milho no período 2000-2015. São Leopoldo (RS), Pós-graduação em Economia Universidade do Vale do Rio Dos Sinos (UNISINOS). (Mestrado), (2017), 59.
- PAVELA, R. "History, presence and perspective of using plant extracts as commercial botanical insecticides and farm products for protection against insects-a review". *Plant Protect Sci*, **52** 229-241, (2016).
- PEREIRA, F. V., PAULA, E., MESQUITA, J., LUCAS ALMEIDA, A., & MANO, V. "Bionanocompósitos preparados por incorporação de nanocristais de celulose em polímeros biodegradáveis por meio de evaporação de solvente, automontagem ou eletrofiação". *Química Nova*, **37** (7): 1209-1219, (2014).
- PEREZ-ZUBIRI, J. R., CERNA-CHAVEZ, E., AGUIRRE-URIBE, L. A., LANDEROS-FLORES, J., HARRIS, M. K., & RODRIGUEZ-HERRERA, R. "Population variability of *Spodoptera*

- frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) in maize (Poales: Poaceae) associated with the use of chemical insecticides". *Florida Entomologist*, **99** (2): 329-331, (2016).
- PERLATTI, B., BERGO, P., FERNANDES, J. B., & FORIM, M. R. "Polymeric nanoparticle-based insecticides: a controlled release purpose for agrochemicals". *Insecticides-Development of Safer and More Effective Technologies*, 523–550, (2013).
- Pesticides. (10 February 2017). National Institutes of Health (NIH). Retrieved from <https://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/pesticides/>
- PRIMO, D. C., MENEZES, R. C., & SILVA, T. O. "Substâncias húmicas da matéria orgânica do solo: uma revisão de técnicas analíticas e estudos no nordeste brasileiro". *Scientia Plena*, **7** (5): (2011).
- QIU, X., ZHU, T., LI, J., PAN, H., LI, Q., MIAO, G., & GONG, J. "Organochlorine pesticides in the air around the Taihu Lake, China". *Environmental science & technology*, **38** (5): 1368-1374, (2004).
- RAIZADA, R., SRIVASTAVA, M., KAUSHAL, R., & SINGH, R. "Azadirachtin, a neem biopesticide: subchronic toxicity assessment in rats". *Food and chemical toxicology*, **39** (5): 477-483, (2001).
- Rebelo, R., Vasconcelos, R., Buys, B., Rezende, J., Moraes, K., & Oliveira, R. (2010). Pesticides and related commercialized in Brazil in 2009. An environmental approach. In: IBAMA Press: Brasília, Brazil.
- REIS, C. P., NEUFELD, R. J., RIBEIRO, A. J., & VEIGA, F. "Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles". *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, **2** (1): 8-21, (2006).
- REYES DE FUENTES, D., & FERNÁNDEZ DA SILVA, R. "Efecto biocida in vitro del extracto foliar de *Azadirachta indica* en *Staphylococcus* sp y *Pseudomonas* sp". *Salus*, **17** (3): (2013).
- RUIU, L., SATTA, A., & FLORIS, I. "Effects of an azadirachtin-based formulation on the non-target muscoid fly parasitoid *Muscidifurax raptor* (Hymenoptera: Pteromalidae)". *Biological Control*, **47** (1): 66-70, (2008).
- RULL, R. P., & RITZ, B. "Historical pesticide exposure in California using pesticide use reports and land-use surveys: an assessment of misclassification error and bias". *Environmental health perspectives*, **111** (13): 1582, (2003).
- S MANN, R., & E KAUFMAN, P. "Natural product pesticides: their development, delivery and use against insect vectors". *Mini-reviews in organic chemistry*, **9** (2): 185-202, (2012).

- SALEHZADEH, A. Effects of azadirachtin on insect and mammalian cultured cells Glasgow, Scotland UK Division of Biochemistry and Molecular Biology, University of Glasgow. (Doctor of Philosophy), (2002), 299.
- SARKAR, M., KHANDAVILLI, S., & PANCHAGNULA, R. "Development and validation of RP-HPLC and ultraviolet spectrophotometric methods of analysis for the quantitative estimation of antiretroviral drugs in pharmaceutical dosage forms". Journal of Chromatography B, **830** (2): 349-354, (2006).
- SCHAFFAZICK, S., POHLMANN, A., FREITAS, L., & GUTERRES, S. "Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco". Acta Farm. Bonaerense, **21** (2): 99-106, (2002).
- SCHAFFAZICK, S. R., GUTERRES, S. S., FREITAS, L. D. L., & POHLMANN, A. R. "Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration.". Quím. Nova, **26** (5): 726-737, (2003).
- SCHMUTTERER, H. "Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*". Annual review of entomology, **35** (1): 271-297, (1990).
- SCUDELER, E. L., GARCIA, A. S. G., PADOVANI, C. R., PINHEIRO, P. F. F., & SANTOS, D. "Are the biopesticide neem oil and the predator *Ceraeochrysa claveri* (Navás, 1911) compatible?". J. Entomol. Zool. Stud., **4** (2): 340-346, (2016).
- SCUDELER, E. L., PADOVANI, C. R., & DOS SANTOS, D. C. "Effects of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) on the replacement of the midgut epithelium in the lacewing *Ceraeochrysa claveri* during larval-pupal metamorphosis". Acta histochemica, **116** (5): 771-780, (2014).
- SEAMAN, D. "Trends in the formulation of pesticides—an overview". Pesticide science, **29** (4): 437-449, (1990).
- SHAH, M. A., WANI, S. H., & KHAN, A. A. "Nanotechnology and insecticidal formulations". J Food Bioengin Nanopro, **1** 285-310, (2016).
- SHAHIDI, F., & HAN, X. Q. "Encapsulation of food ingredients". Critical Reviews in Food Science & Nutrition, **33** (6): 501-547, (1993).
- SHAKERI, F., SHAKERI, S., & HOJJATOLESLAMI, M. "Preparation and characterization of carvacrol loaded polyhydroxybutyrate nanoparticles by nanoprecipitation and dialysis methods". Journal of food science, **79** (4): (2014).
- SHARIF, M., KHATTAK, R. A., & SARIR, M. "Effect of different levels of lignitic coal derived humic acid on growth of maize plants". Communications in Soil Science and Plant Analysis, **33** (19-20): 3567-3580, (2002).

- SHARMA, S., & SINGH, A. "Toxic effect of neem, *Azadirachta indica* (A. Juss) foliage extracts against diamondback moth (DBM), *Plutella xylostella* (L.)(Lepidoptera, Plutellidae)". *Journal of Biopesticides*, **7** 99, (2014).
- SHEN, J.-P., ZHANG, L.-M., GUO, J.-F., RAY, J. L., & HE, J.-Z. "Impact of long-term fertilization practices on the abundance and composition of soil bacterial communities in Northeast China". *Applied Soil Ecology*, **46** (1): 119-124, (2010).
- Shiva, V. (2016). *The violence of the green revolution: Third world agriculture, ecology, and politics* (1 ed. Vol. 1). United States of America: University Press of Kentucky.
- SILVA, A., LAGUNES, T., RODRÍGUEZ, M., & RODRÍGUEZ, L. "Insecticidas vegetales: una vieja y nueva alternativa para el manejo de plagas". (2002).
- SILVA, C. L. T., CORRÊA, F., DE JESUS PINTO, A. F., DA SILVA, F. C., & DE JESUS, F. G. "Genótipos de milho resistentes e diferentes estratégias no controle de *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797)(Lepidoptera: Noctuidae)". *Anais da Semana de Ciências Agrárias e Jornada de Pós-graduação em Produção Vegetal*, **14** 62-65, (2017).
- Simeonov, L. I., Macaev, F. Z., & Simeonova, B. G. (2014). *Environmental Security Assessment and Management of Obsolete Pesticides in Southeast Europe*: Springer.
- SODERLUND, D., & KNIPPLE, D. "The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides". *Insect Biochem Mol Biol*, **33** (6): 563-577, (2003).
- SOPPIMATH, K. S., AMINABHAVI, T. M., KULKARNI, A. R., & RUDZINSKI, W. E. "Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices". *Journal of controlled release*, **70** (1): 1-20, (2001).
- SOUZA, P. M. S., LOBO, F. A., ROSA, A. H., & FRACETO, L. F. "Desenvolvimento de nanocápsulas de poli-ε-caprolactona contendo o herbicida atrazina". *Quim. Nova*, **35** (1): 132-137, (2012).
- Suassuna, K. (2001). Contamination in Paulínia by Aldrin, Dieldrin, Endrin and Other Toxic Chemicals Produced and Disposed of by Shell Chemicals of Brazil. In *Contamination in Paulínia by aldrin, dieldrin, endrin and other toxic chemicals produced and disposed of by shell chemicals of Brazil* (pp. 17-17): Greenpeace Brazil.
- SUAVE, J., DALL'AGNOL, E., PEZZIN, A., SILVA, D., MEIER, M., SOLDI, V. J. R. S. E. A. H., & JOURNAL, E. "Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas". **7** (2): 12-20, (2006).

- SUBAPRIYA, R., & NAGINI, S. "Medicinal properties of neem leaves: a review". *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, **5** (2): 149-156, (2005).
- SUGUMAR, S., CLARKE, S., NIRMALA, M., TYAGI, B., MUKHERJEE, A., & CHANDRASEKARAN, N. "Nanoemulsion of eucalyptus oil and its larvicidal activity against *Culex quinquefasciatus*". *Bulletin of entomological research*, **104** (3): 393-402, (2014).
- SZÉKÁCS, A., MÖRTL, M., & DARVAS, B. "Monitoring pesticide residues in surface and ground water in Hungary: surveys in 1990–2015". *Journal of Chemistry*, **2015** (2015).
- TAHIR, M., KHURSHID, M., KHAN, M., ABBASI, M., & KAZMI, M. "Lignite-derived humic acid effect on growth of wheat plants in different soils". *Pedosphere*, **21** (1): 124-131, (2011).
- TAVARES, W. S., COSTA, M. A., CRUZ, I., SILVEIRA, R. D., SERRÃO, J. E., & ZANUNCIO, J. C. "Selective effects of natural and synthetic insecticides on mortality of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and its predator *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae)". *Journal of Environmental Science and Health Part B*, **45** (6): 557-561, (2010).
- TEIXEIRA, H., DE AQUINO, P., APARECIDA, L., DE PAULA, C., & GRACIELLE, D. O. J. "Extração, purificação e caracterização de azadiractina a partir de sementes de nim (*Azadirachta indica*)". 28a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, **Sociedade Brasileira de Química (SBQ)** (Poços de Caldas - MG): 1-2, (2005).
- TOFEL, K. H., NUKENINE, E., STÄHLER, M., & ADLER, C. "Insecticidal efficacy of *Azadirachta indica* powders from sun-and shade-dried seeds against *Sitophilus zeamais* and *Callosobruchus maculatus*". *Journal of Entomology and Zoology studies*, **3** (1): 100-108, (2015).
- VATTIKONDA, S. R., & SANGAM, S. R. "Assessment of antifeedant potential of azadirachtin, a plant product of *Azadirachta indica* against *Papilio demoleus* L.(Lepidoptera: Papilionidae) larvae". *J. Entomol. Zool. Stud.*, **4** 956-959, (2016).
- VERMA, S. "Phytochemical aspect of insecticidal plant *Azadirachta indica* (Neem)". *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **5** (11): 1481-1485, (2016).
- VILLAVERDE, J. J. S. M., BEATRIZ; SANDÍN ESPAÑA, PILAR; LÓPEZ GOTI, CARMEN; ALONSO PRADOS, JOSÉ L. "Biopesticides in the framework of the European Pesticide Regulation (EC) No. 1107/2009". *Pest management science*, **70** (1): 2-5, (2014).

- WHITE, L. M., ERNST, W. R., JULIEN, G., GARRON, C., & LEGER, M. "Ambient air concentrations of pesticides used in potato cultivation in Prince Edward Island, Canada". *Pest management science*, **62** (2): 126-136, (2006).
- WHO. (2009). The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard. Retrieved from http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard/en/
- XU, J., FAN, Q.-J., YIN, Z.-Q., LI, X.-T., DU, Y.-H., JIA, R.-Y., . . . GENG, Y. "The preparation of neem oil microemulsion (*Azadirachta indica*) and the comparison of acaricidal time between neem oil microemulsion and other formulations in vitro". *Veterinary parasitology*, **169** (3): 399-403, (2010).
- YADAV, I. C., DEVI, N. L., SYED, J. H., CHENG, Z., LI, J., ZHANG, G., & JONES, K. C. "Current status of persistent organic pesticides residues in air, water, and soil, and their possible effect on neighboring countries: a comprehensive review of India". *Science of The Total Environment*, **511** 123-137, (2015).
- YAN, Y. X., LIU, J. Q., WANG, H. W., CHEN, J. X., CHEN, J. C., CHEN, L., . . . QIU, M. H. "Identification and antifeedant activities of limonoids from *azadirachta indica*". *Chemistry & biodiversity*, **12** (7): 1040-1046, (2015).
- YANG, F.-L., LI, X.-G., ZHU, F., & LEI, C.-L. "Structural characterization of nanoparticles loaded with garlic essential oil and their insecticidal activity against *Tribolium castaneum* (Herbst)(Coleoptera: Tenebrionidae)". *Journal of agricultural and food chemistry*, **57** (21): 10156-10162, (2009).
- YIN, Y.-H., GUO, Q.-M., YUN, H., WANG, L.-J., & WAN, S.-Q. "Preparation, characterization and nematicidal activity of lansiumamide B nano-capsules". *Journal of Integrative Agriculture*, **11** (7): 1151-1158, (2012).
- YIN, Y., XU, S., CHANG, D., ZHENG, H., LI, J., LIU, X., . . . XIONG, F. "One-pot synthesis of biopolymeric hollow nanospheres by photocrosslinking". *Chemical Communications*, **46** (43): 8222-8224, (2010).
- ZHANG, J., LI, M., FAN, T., XU, Q., WU, Y., CHEN, C., & HUANG, Q. "Construction of novel amphiphilic chitosan copolymer nanoparticles for chlorpyrifos delivery". *Journal of Polymer Research*, **20** (3): 107, (2013).
- ZIAEE, M., MOHARRAMIPOUR, S., & MOHSENIFAR, A. "Toxicity of *Carum copticum* essential oil-loaded nanogel against *Sitophilus granarius* and *Tribolium confusum*". *Journal of applied entomology*, **138** (10): 763-771, (2014).