

## DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS DE POLI- $\epsilon$ -CAPROLACTONA CONTENDO O HERBICIDA ATRAZINA

Patrícia Moraes Sinohara Souza, Fabiana Aparecida Lobo, André Henrique Rosa e Leonardo Fernandes Fraceto\*

Departamento de Engenharia Ambiental, Universidade Estadual Paulista, Av. Três de Março, 511, 18087-180 Sorocaba - SP, Brasil

Recebido em 6/3/11; aceito em 26/6/11; publicado na web em 9/8/11

DEVELOPMENT OF NANOCAPSULES OF POLY- $\epsilon$ -CAPROLACTONE CONTAINING HERBICIDE ATRAZINE. In this study, polymeric nanocapsules of PCL containing the herbicide atrazine were prepared. In order to optimize the preparation conditions, a  $2^3$  factorial design was performed using different formulations of nanocapsules, which investigated the influence of three variables at two levels. The factors varied were the quantities of PCL, Span 60 and Myritol. The results were evaluated considering the size, polydispersity, zeta potential and association rate and the measures of these parameters were taken immediately after preparation and after 30 days of preparation. The formulations with minimum level of polymer in the preparation showed better stability results.

Keywords: atrazine; polymeric nanocapsules; modified release systems.

### INTRODUÇÃO

Em decorrência do crescimento populacional e do aumento da demanda por alimentos, o uso de agrotóxicos vem se intensificando a cada ano. Estima-se que 700.000 toneladas de agrotóxicos sejam lançadas anualmente no meio ambiente. O valor do mercado mundial para agrotóxicos foi estimado em US\$ 32 bilhões em 2000, correspondendo à comercialização de mais de 3000 ingredientes ativos. As vendas totais de agrotóxicos variam muito com a categoria, sendo que os herbicidas representam 48%.<sup>1</sup>

O grupo das triazinas é o responsável por 30% da produção mundial de herbicidas, sendo utilizados no controle em pré e pós-emergência das plantas daninhas em plantações de cana-de-açúcar, milho, soja, trigo, feijão, laranja entre outros.<sup>2</sup> Dentre as triazinas, a atrazina é o herbicida mais utilizado, principalmente na cultura de milho.<sup>3</sup>

A atrazina é absorvida pelas plantas através das raízes e se transloca via xilema até as folhas, onde age inibindo a fotossíntese, cujos sintomas se manifestam através da clorose, necrose e morte das plantas. Quando o produto é aplicado na pós-emergência das invasoras, é absorvido através das folhas, onde penetra rapidamente. Neste caso atua por contato e praticamente não sofre nenhuma movimentação.<sup>4</sup>

A atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina) ainda é um dos herbicidas mais utilizados mundialmente, embora sua utilização já tenha sido proibida em alguns países. Esse herbicida seletivo é indicado para o controle de plantas invasoras anuais dicotiledôneas e algumas monocotiledôneas nas culturas de milho (*Zea mays*), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) e sorgo (*Sorghum bicolor*).<sup>5</sup> Devido à sua ampla utilização e persistência no ambiente, a atrazina e seus metabólitos são frequentemente encontrados em águas superficiais e subterrâneas.<sup>6</sup>

Há relatos mostrando que a atrazina afeta a função endócrina de ratos machos,<sup>7</sup> a maturação sexual de ratos fêmeas<sup>8</sup> e a atividade da NaK-ATPase em salmão, aumentando sua mortalidade.<sup>9</sup>

Análises utilizando um sistema teste de *Allium cepa* para avaliar a potencialidade de indução do efeito citotóxico do herbicida atrazina revelaram que todas as concentrações testadas (0,015; 0,031; 0,062

e 0,125 ppm) da atrazina mostraram efeitos mutagênicos, quando comparadas com o teste controle, o que permite sugerir que doses residuais deste herbicida podem constituir um problema para organismos expostos a este composto químico. O herbicida atrazina pode apresentar uma potencialidade em causar problemas à saúde humana.<sup>10</sup>

A liberação imediata de ativos pelas formulações comercializadas levou ao desenvolvimento de formulações de liberação controlada dos herbicidas, de forma a favorecer sua eficiência e diminuir seu potencial de contaminação. Uma importante tecnologia nesse contexto é a utilização de sistemas nanoestruturados a partir de polímeros biodegradáveis.

A taxa na qual o ingrediente ativo é liberado a partir de formulações convencionais está geralmente relacionada exponencialmente com a quantidade (ou concentração) do ingrediente que permanece na formulação. Isso significa que a concentração no ambiente deve, inicialmente, ser muito alta (geralmente tóxica), consequentemente diminuindo rapidamente para níveis baixos e ineficazes. Em contraste, os sistemas de liberação controlada geralmente apresentam baixa concentração inicial de ingrediente ativo, no entanto, esta concentração é mantida protegendo as culturas. Como alternativa, eles podem ter liberação elevada com uma concentração inicial da substância ativa, mas, em seguida, diminuição da liberação suficiente para manter níveis eficazes, durante um período de tempo prolongado.<sup>11,12</sup>

A literatura descreve alguns trabalhos relacionados à liberação de compostos com aplicações em agronegócio, no entanto, a abordagem de utilização de micro/nanopartículas poliméricas ainda tem sido pouco explorada.<sup>13-16</sup>

Dentre os poliésteres alifáticos, os homo e copolímeros de lactato e glicolato (PLA, PGA, PLGA), poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) e os polihidroxialcanoatos (PHA) podem ser usados no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados para encapsulação e liberação controlada de compostos bioativos.<sup>17</sup>

Um dos métodos para a preparação de nanopartículas poliméricas é a nanoprecipitação, que se baseia na precipitação e formação cineticamente controlada de vesículas de tamanho coloidal constituídas por uma fase oleosa revestida por uma camada polimérica em um ambiente externo aquoso. Após a mistura das duas fases miscíveis, o polímero precipita na interface pela redução da sua solubilidade

\*e-mail: leonardo@sorocaba.unesp.br

na mistura de solventes, sendo que a difusão mútua dos solventes fornece uma energia favorável para a formação de nanogotas de óleo, que servem como núcleo para a precipitação do polímero.<sup>18</sup>

O termo nanopartículas inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre si pela presença ou ausência de óleo em suas composições. As nanocápsulas são vesículas constituídas por um invólucro polimérico disposto em torno de um núcleo oleoso. Por outro lado, as nanoesferas, que não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica.<sup>19</sup>

Este trabalho descreve a preparação e caracterização de nanocápsulas de PCL contendo o herbicida atrazina, bem como a otimização do preparo através de um planejamento fatorial 2<sup>3</sup>, observando-se a influência de elementos utilizados na fase orgânica nos parâmetros tamanho, polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulamento. Os fatores avaliados foram as quantidades de polímero (PCL), óleo (Miritol) e tensoativo (SPAN 60). A Figura 1 representa a estrutura química dos fatores avaliados e do herbicida atrazina.

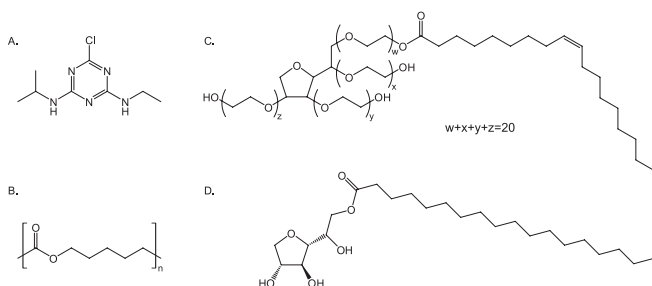


Figura 1. Estrutura química do: A. Atrazina, B. PCL, C. Tween 80, D. Span 60

## PARTE EXPERIMENTAL

### Materiais

Foram utilizados o herbicida atrazina, o polímero poli(ε-caprolactona) (PCL), monoestearato de sorbitano (Span60®) (Sigma Aldrich Chem. Co.), polissorbato 80 (Tween80®) (LabSynth, Brasil), óleo Miritol (triacilglicerol de cadeia longa) e acetona grau analítico (LabSynth, Brasil). Os solventes empregados para análises cromatográficas foram acetonitrila grau HPLC (J.T. Baker®) e água Milli-Q.

### Preparação das nanocápsulas de poli-ε-caprolactona contendo atrazina

As nanocápsulas foram preparadas através do método de nanoprecipitação, envolvendo a mistura de uma fase orgânica em outra aquosa. A fase orgânica constituiu-se do polímero PCL (100 ou 150 mg), acetona (solvente orgânico) (30 mL), Span® 60 (tensoativo da fase orgânica) (20 ou 40 mg), Miritol (triacilglicerol de cadeia longa) (200 ou 300 mg) e atrazina (10 mg). A fase aquosa foi composta pelo tensoativo polissorbato 80 (Tween® 80) (60 mg) e água deionizada (Milli-Q, Millipore) (30 mL). Após dissolução dos constituintes, verteu-se a fase orgânica na fase aquosa. A suspensão resultante foi mantida sob agitação durante 10 min e, em seguida, foi concentrada sob baixa pressão até o volume de 10 mL, com o auxílio de um evaporador rotativo, a fim de obter uma concentração de atrazina de 1 mg/mL.

### Planejamento fatorial

Em um planejamento fatorial, determina-se a influência de fatores sobre as respostas de interesse. Para estudar o efeito de qualquer

fator (k) sobre uma dada resposta, precisa-se variar o nível do fator e observar o resultado que essa variação produz sobre a resposta. O número de ensaios necessários para se fazer um planejamento fatorial 2<sup>k</sup> completo aumenta rapidamente com o número de fatores investigados (k).<sup>20</sup>

As proporções ideais de polímero (PCL), óleo (Miritol) e tensoativo (SPAN 60) foram otimizadas a partir de um planejamento fatorial 2<sup>3</sup> (Tabela 1) a fim de se avaliar a influência de 3 variáveis em 2 níveis. As variáveis avaliadas foram as massas do polímero PCL, Miritol e SPAN 60 (Tabela 2). Os volumes da fase aquosa e acetona foram mantidos constantes em 30 mL cada. As massas de herbicida (fase orgânica) e tensoativo Tween 80 (fase aquosa) também foram mantidas constantes sendo, respectivamente, de 10 e 60 mg.

Tabela 1. Matriz do planejamento fatorial 2<sup>3</sup> aplicado ao preparo de NC poliméricas

Formulação	A	B	C
1	-	-	+
2	-	+	+
3	-	-	-
4	-	+	-
5	+	+	-
6	+	+	+
7	+	-	-
8	+	-	+

A: Polímero; B: Miritol; C: SPAN 60. - Nível mínimo ; + Nível máximo

Tabela 2. Fatores variados em 2 níveis no planejamento fatorial descrito na Tabela 1

Níveis	PCL(mg)	Miritol(mg)	SPAN 60(mg)
Superior (+)	150	300	40
Inferior (-)	100	200	30

As influências desses fatores foram analisadas segundo a distribuição de tamanho, potencial zeta, polidispersão e eficiência de associação da atrazina às nanocápsulas.

A análise estatística para determinação da influência dos fatores variados sobre as propriedades das nanocápsulas foi realizada utilizando o software *Statgraphics Plus 5.1*.

### Caracterizações das formulações

#### Medidas de tamanho e polidispersão

A técnica de espalhamento dinâmico de luz foi utilizada para determinação do tamanho médio das partículas (diâmetro hidrodinâmico) e polidispersão. As análises foram realizadas diluindo-se 1/100 (v/v) as suspensões de nanocápsulas (com e sem atrazina) com água Milli-Q, utilizando-se um analisador de partículas Zetasizer (Malvern) com detector em ângulo fixo de 90° e temperatura de 25 °C.

#### Medidas de potencial zeta

O valor de potencial zeta (mV) foi determinado pela técnica de laser doppler velocimetria associada à microeletroforese no aparelho Zetasizer (Malvern) à 25 °C. As análises foram realizadas diluindo-se 1/100 (v/v) as suspensões de nanocápsulas em água Milli-Q.

#### Medidas de estabilidade química

A fim de verificar a estabilidade química do polímero nas formulações foi realizada a medida de pH das suspensões de nanopartículas de PCL contendo atrazina. A medida dos valores de pH das suspensões de nanopartículas foi realizada utilizando-se um potenciômetro calibrado com soluções tampão padrão em pH 7,0 e 4,0.

### Eficiência de encapsulamento das nanocápsulas de PCL contendo atrazina

O total (100%) de herbicida presente na suspensão de nanocápsulas foi determinado diluindo-se a suspensão. Esta solução foi filtrada em membrana Millipore® de 0,22 µm e quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A eficiência de encapsulamento do herbicida às nanocápsulas foi determinada pelo método de ultrafiltração/centrifugação, que consiste em submeter a suspensão de nanocápsulas à centrifugação em dispositivos de ultrafiltração constituídos de celulose regenerada de 10 kDa (Microcon – Millipore®) e quantificar o ultrafiltrado por CLAE. Só passa pela membrana de 10 kDa o herbicida livre, sendo assim, por diferença do 100% de herbicida e concentração de herbicida não associado determinou-se a eficiência de associação de herbicida às nanocápsulas.

Para quantificação da atrazina as condições cromatográficas foram: fase móvel água/acetoneitrila (50/50, v/v), volume de injeção 100 µL, fluxo 1,2 mL/min, detecção UV em 226 nm, coluna fase reversa C<sub>18</sub>.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram preparadas 8 formulações em duplicata, de acordo com os níveis máximo e mínimo dos fatores conforme o planejamento

fatorial. Os fatores variados em 2 níveis foram massa de polímero (PCL), Miritol e SPAN 60. Os efeitos dos fatores foram avaliados sobre quatro respostas: diâmetro de partículas, polidispersão (PDI), potencial zeta e eficiência de encapsulamento. As medidas dos parâmetros avaliados foram realizadas imediatamente após o preparo (tempo 0) e após 30 dias do preparo (tempo 30) e estão representadas nas Tabelas 3 e 4.

Para avaliar a influência da variação dos fatores em 2 níveis sobre a eficiência de encapsulamento das nanocápsulas de PCL contendo atrazina, foram construídos os gráficos de Pareto, a partir dos resultados obtidos com o planejamento fatorial, representados nas Figuras 2 e 3.

Na Figura 2 observa-se que nenhum dos fatores avaliados foram estatisticamente significativos sobre a eficiência de encapsulamento, levando-se em consideração o momento imediatamente após o preparo (tempo 0). Pelos dados da Tabela 3, nota-se que os valores de eficiência de encapsulamento medidos no tempo 0 variam entre 89,4 e 94,3%, indicando que a variação nos níveis dos fatores estudados implicou em alterações pequenas nos valores desse parâmetro. Uma variação maior pode ser observada pelos valores de eficiência de encapsulamento medidos após 30 dias do preparo, representados na Tabela 4, que estão entre 73,5 a 92,3%.

No gráfico de Pareto, representado na Figura 3, construído com os valores obtidos após 30 dias do preparo, pode ser observada mudança

**Tabela 3.** Matriz do planejamento fatorial 2<sup>3</sup> e resultados de diâmetro, polidispersão (PDI), potencial zeta e eficiência de encapsulamento, após o reparo

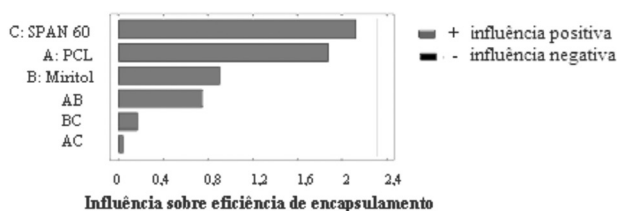
Formulação	A	B	C	Diâmetro (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Eficiência de encapsulamento (%)
1.1	-	-	+	261,9 ± 1,8	0,085 ± 0,021	-34,9 ± 2,8	92,4 ± 3,1
1.2	-	-	+	258,4 ± 5,6	0,059 ± 0,013	-32,3 ± 0,7	90,6 ± 1,9
2.1	-	+	+	327,9 ± 9,1	0,184 ± 0,021	-34,8 ± 3,1	90,4 ± 2,4
2.2	-	+	+	309,5 ± 4,6	0,119 ± 0,014	-30,3 ± 0,9	91,5 ± 3,2
3.1	-	-	-	256,4 ± 0,4	0,125 ± 0,022	-34,5 ± 0,4	89,5 ± 3,5
3.2	-	-	-	276,4 ± 9,7	0,128 ± 0,041	-30,0 ± 0,1	89,4 ± 2,8
4.1	-	+	-	319,0 ± 0,2	0,169 ± 0,001	-36,1 ± 0,1	90,9 ± 3,4
4.2	-	+	-	341,4 ± 0,4	0,130 ± 0,001	-37,2 ± 0,1	89,6 ± 2,1
5.1	+	+	-	312,4 ± 3,7	0,095 ± 0,022	-33,2 ± 0,5	90,1 ± 3,2
5.2	+	+	-	306,1 ± 2,5	0,159 ± 0,001	-36,1 ± 0,1	92,2 ± 3,6
6.1	+	+	+	297,0 ± 0,6	0,119 ± 0,026	-35,8 ± 0,1	94,3 ± 3,5
6.2	+	+	+	297,6 ± 0,1	0,125 ± 0,026	-34,3 ± 0,1	92,6 ± 1,2
7.1	+	-	-	298,0 ± 5,0	0,108 ± 0,012	-33,2 ± 0,1	92,0 ± 2,9
7.2	+	-	-	309,3 ± 0,2	0,049 ± 0,036	-37,0 ± 0,2	89,8 ± 1,6
8.1	+	-	+	283,6 ± 0,6	0,105 ± 0,032	-31,5 ± 0,8	93,0 ± 3,7
8.2	+	-	+	303,0 ± 2,2	0,104 ± 0,005	-31,1 ± 0,6	89,9 ± 2,1

A: Polímero; B: Miritol; C: SPAN 60

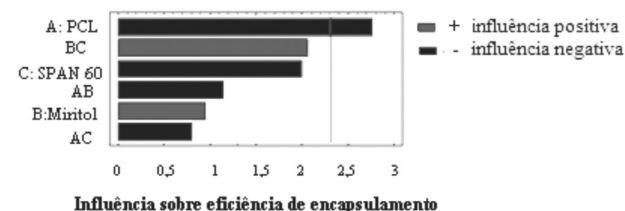
**Tabela 4.** Matriz do planejamento fatorial 2<sup>3</sup> e resultados de diâmetro, polidispersão (PDI), potencial zeta e eficiência de encapsulamento durante 30 dias

Formulação	A	B	C	Diâmetro (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Eficiência de encapsulamento (%)
1.1	-	-	+	263,0 ± 6,6	0,087±0,021	-32,3 ± 3,0	83,3 ± 2,3
1.2	-	-	+	264,0 ± 5,2	0,134±0,006	-30,3 ± 1,2	82,9 ± 3,1
2.1	-	+	+	307,7 ± 5,8	0,089±0,024	-42,8 ± 1,7	91,2 ± 0,9
2.2	-	+	+	326,5 ± 8,4	0,059±0,008	-45,1 ± 1,1	89,7 ± 3,4
3.1	-	-	-	261,9 ± 3,5	0,101±0,023	-38,8 ± 0,8	89,4 ± 2,9
3.2	-	-	-	259,5 ± 1,6	0,138±0,035	-37,5 ± 0,8	87,8 ± 4,1
4.1	-	+	-	363,1 ± 2,9	0,029±0,006	-34,3 ± 0,1	87,4 ± 3,8
4.2	-	+	-	354,3 ± 2,7	0,116±0,016	-35,0 ± 0,2	92,3 ± 2,7
5.1	+	+	-	306,2 ± 7,5	0,094±0,064	-26,8 ± 0,3	83,9 ± 3,0
5.2	+	+	-	321,3 ± 0,8	0,117±0,004	-27,8 ± 0,3	80,7 ± 3,5
6.1	+	+	+	310,6 ± 2,9	0,115±0,023	-26,8 ± 0,1	74,4 ± 3,9
6.2	+	+	+	297,8 ± 3,1	0,153±0,036	-26,2 ± 0,0	89,5 ± 2,5
7.1	+	-	-	308,1 ± 0,15	0,148±0,021	-22,4 ± 1,6	87,6 ± 1,1
7.2	+	-	-	317,5 ± 0,1	0,139±0,042	-23,1 ± 1,1	88,6 ± 2,6
8.1	+	-	+	285,0 ± 1,1	0,112±0,050	-21,9 ± 0,4	73,5 ± 3,4
8.2	+	-	+	281,7 ± 2,5	0,154±0,021	-21,0 ± 0,3	80,4 ± 1,5

A: Polímero; B: Miritol; C: SPAN 60



**Figura 2.** Efeitos dos fatores sobre a eficiência de encapsulamento das nanocápsulas de PCL contendo atrazina imediatamente após preparo



**Figura 3.** Efeitos dos fatores sobre a eficiência de encapsulamento das nanocápsulas de PCL contendo atrazina 30 dias após o preparo

no comportamento da influência dos fatores avaliados sobre a eficiência de encapsulamento. Na Tabela 5 estão descritos valores estimados para efeitos sobre a eficiência de encapsulamento da atrazina, bem como os valores de  $p$  obtidos a partir de análise de variância, para testar a significância estatística dos efeitos estudados no tempo 30.

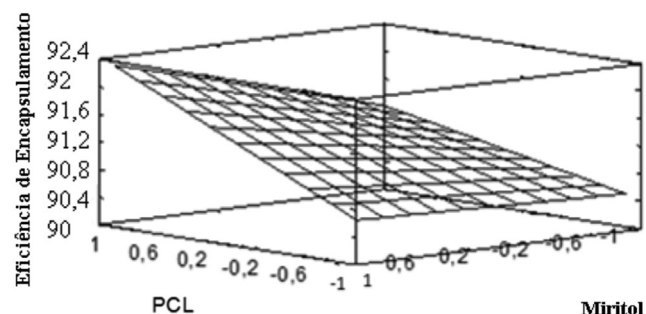
**Tabela 5.** Estimativa dos efeitos e valores de  $p$  para variação de eficiência de encapsulamento após 30 dias de preparo das nanocápsulas de PCL contendo atrazina

	Efeito	Desvio padrão	$p$
A:PCL	-5,67	2,05	0,0247*
B:Miritol	1,95	2,05	0,3708
C:Span60	-4,1	2,05	0,2862
AB	-2,35	2,05	0,4456
BC	4,22	2,05	0,0740
AC	-1,65	2,05	0,2336

\*resultados obtidos com 95,0% de confiança.

Segundo os resultados observados na Tabela 5, apenas o valor de efeito devido ao polímero PCL foi inferior a 0,05, indicando que este efeito é significativamente diferente de zero, com nível de confiança de 95,0%. Portanto, no tempo 30, apenas o fator PCL foi estatisticamente significativo para variação da eficiência de encapsulamento, influenciando o parâmetro de forma negativa.

Na superfície de resposta representada na Figura 4, observa-se a

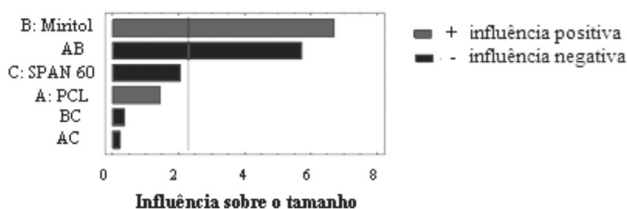


**Figura 4.** Superfície de resposta produzida a partir da avaliação dos fatores PCL e Miritol sobre a eficiência de encapsulamento das nanocápsulas de PCL contendo atrazina imediatamente após preparo

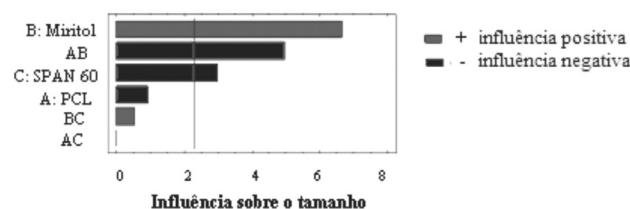
influência positiva do Miritol sobre a eficiência de encapsulamento no tempo 0.

O mesmo comportamento também foi observado para os dados medidos no tempo 30. O aumento da eficiência de encapsulamento em razão de maiores concentrações de óleo está de acordo com a característica do herbicida. A atrazina apresenta valor de log Kow (coeficiente de partição octanol-água) 2,68, o que a caracteriza como um herbicida lipofílico.<sup>21</sup> Devido à natureza lipofílica, o aumento da concentração do óleo nas formulações favorece a associação da atrazina às nanocápsulas, em sua fase oleosa.

Os gráficos de Pareto construídos para avaliação da influência da variação dos fatores em 2 níveis sobre o tamanho das nanocápsulas de PCL contendo atrazina estão representados nas Figuras 5 e 6.



**Figura 5.** Efeito dos fatores sobre o tamanho das nanocápsulas de PCL contendo atrazina imediatamente após preparo



**Figura 6.** Efeito dos fatores sobre o tamanho das nanocápsulas de PCL contendo atrazina 30 dias após o preparo

Pela análise do gráfico de Pareto da Figura 5, bem como os dados da Tabela 6, nota-se que no tempo 0 dois fatores apresentam influência estatisticamente significativa sobre o tamanho das nanocápsulas: Miritol, que apresenta influência positiva, e a interação PCL:Miritol, que apresenta influência negativa sobre o tamanho. Avaliando-se o gráfico de Pareto da Figura 6 e a Tabela 7, Miritol e a interação PCL:Miritol mantêm influência significativa no tempo 30, sendo que o fator SPAN 60 também apresentou  $p < 0,05$ , e valor de efeito negativo, indicando influência negativa sobre o tamanho.

**Tabela 6.** Estimativa dos efeitos e valores de  $p$  para variação do tamanho, imediatamente após o preparo das nanocápsulas de PCL contendo atrazina

	Efeito	Desvio padrão	$p$
A:PCL	7,01	4,91	0,1913
B:Miritol	32,98	4,91	0,0002*
C:Span60	-10,01	4,91	0,0759
AB	-28,18	4,91	0,0004*
BC	-1,71	4,91	0,7364
AC	-1,14	4,91	0,8227

\*resultados obtidos com 95,0% de confiança

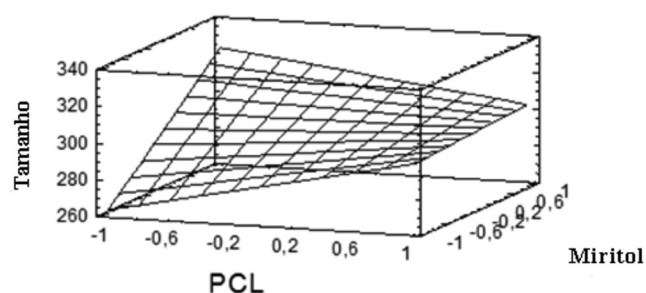
A superfície de resposta representada na Figura 7, gerada a partir dos dados medidos no tempo inicial, revela tendência de que maiores quantidades de Miritol favorecem o aumento do tamanho das nanocápsulas. Se a quantidade de Miritol está mais próxima do nível máximo estipulado no planejamento fatorial, à medida que aumenta o teor de polímero há uma diminuição nos valores obtidos para tamanho. Em contrapartida, caso a concentração de Miritol

**Tabela 7.** Estimativa dos efeitos e valores de *p* para variação do tamanho, após 30 dias do preparo das nanocápsulas de PCL contendo atrazina

	Efeito	Desvio padrão	<i>p</i>
A:PCL	3,52	6,53	0,6042
B:Miritol	43,35	6,53	0,0002*
C:Span60	-19,45	6,53	0,0177*
AB	-32,45	6,53	0,0011*
BC	-6,12	6,53	0,3759
AC	-0,05	6,53	0,9941

\*resultados obtidos com 95,0% de confiança

esteja mais próxima do nível mínimo estabelecido no planejamento, conforme aumenta a concentração de polímero, aumenta o tamanho. Esta influência sobre o tamanho, devido à interação dos fatores PCL e Miritol, também foi observada a partir da análise realizada com os dados medidos no tempo 30 dias.

**Figura 7.** Superfície de resposta produzida a partir da avaliação dos fatores PCL e Miritol sobre o tamanho das nanocápsulas de PCL contendo atrazina imediatamente após preparo

O aumento do tamanho das partículas com o aumento da concentração do polímero é bem descrito na literatura.<sup>22</sup> O aumento do tamanho das partículas em função da concentração de polímero pode ser explicada de duas maneiras: com o aumento da concentração do polímero, há maior número de unidades de cadeias poliméricas se agregando e mais cadeias poliméricas permanecem associadas durante o processo de difusão, levando à formação de partículas maiores e, o aumento da concentração de polímero aumenta a viscosidade da fase orgânica, proporcionando maior resistência à transferência de massa, de modo que a difusão do polímero da fase orgânica para a fase aquosa é reduzida, e são formadas nanopartículas maiores.<sup>23</sup> Neste estudo o polímero não se apresentou como um efeito principal, e sim como parte de um efeito de interação, conjuntamente com o Miritol.

Com relação à polidispersão, quando foram avaliados os dados medidos no tempo inicial, não houve influência estatisticamente significativa de nenhum dos fatores avaliados. Após 30 dias do preparo, observou-se a influência positiva de PCL e influência negativa de Miritol. Os valores de *p* para avaliação do efeito dos fatores avaliados estão representados na Tabela 8. Os valores mais baixos para polidispersão foram obtidos para as formulações em que foi utilizado nível mínimo de polímero estabelecido no planejamento fatorial.

Valores altos de índice de polidispersão indicam heterogeneidade do diâmetro das partículas em suspensão; variações nos valores de polidispersão em função do tempo indicam formação de populações de partículas com diâmetros que não existiam inicialmente, podendo ser decorrente de agregação ou quebra/degradação de partículas. Índices de polidispersão menores que 0,2 sugerem que a distribuição do diâmetro das partículas se encontra em uma estreita faixa de diâmetros.<sup>24</sup>

A análise de efeito para o parâmetro potencial zeta permitiu observar que não houve influência estatisticamente significativa de nenhum

**Tabela 8.** Estimativa dos efeitos e valores de *p* para variação da polidispersão, após 30 dias do preparo das nanocápsulas de PCL contendo atrazina

	Efeito	Desvio padrão	<i>p</i>
A:PCL	0,03	0,012	0,00204*
B:Miritol	-0,03	0,012	0,0375*
C:Span60	0,003	0,012	0,8337
AB	0,01	0,012	0,3648
BC	0,01	0,012	0,3363
AC	0,006	0,012	0,6125

\*resultados obtidos com 95,0% de confiança.

dos fatores avaliados imediatamente após o preparo. Após 30 dias, os fatores Miritol, PCL e a combinação entre os fatores Miritol:SPAN 60, apresentaram influência significativa sobre o parâmetro, como pode ser observado na Tabela 9.

**Tabela 9.** Estimativa dos efeitos e valores de *p* para variação do potencial zeta, após 30 dias do preparo das nanocápsulas de PCL contendo atrazina

	Efeito	Desvio padrão	<i>p</i>
A:PCL	12,6	-1,44	0,0000*
B:Miritol	-4,6	-1,44	0,0128*
C:Span60	-0,175	-1,44	0,9064
AB	-0,025	-1,44	0,9866
BC	-4,25	-1,44	0,0185*
AC	1,05	-1,44	0,4872

\*resultados obtidos com 95,0% de confiança

O fator PCL apresentou influência positiva sobre o potencial zeta, assim, as formulações com maiores quantidades de PCL apresentaram valores maiores (menos negativos), indicando menor estabilidade para formulações em que foi utilizado nível máximo de polímero, uma vez que haverá menor repulsão entre as nanopartículas, e maior probabilidade de agregação.

Poucas são as informações disponíveis na literatura sobre o comportamento do potencial zeta e suas tendências em diferentes formulações. Levando em consideração a experiência dos autores, o potencial zeta de nanocápsulas depende principalmente da natureza química do polímero e do estabilizador e do pH do meio.<sup>25</sup>

Para as formulações de nanocápsulas avaliadas houve pouca variação do pH após 30 dias, como pode ser observado pelos valores médios das duplicatas na Tabela 10.

**Tabela 10.** Valores de pH das formulações preparadas neste estudo

Formulações	pH (tempo 0)	pH (tempo 30)
1	5,69	5,56
2	5,79	5,61
3	5,57	5,16
4	5,08	5,29
5	5,31	5,22
6	5,60	5,24
7	5,17	4,80
8	5,32	4,84

Dentre os fatores estudados, o polímero apresentou efeitos mais significativos, sendo que as formulações em que foi utilizado nível máximo de polímero apresentaram menor estabilidade, evidenciada por menores valores de polidispersão e menores valores em módulo de potencial zeta. As formulações 1, 2, 3 e 4 do planejamento fatorial apresentaram valores de eficiência de encapsulamento, tamanho, polidispersão e potencial zeta que indicaram boa estabilidade ao

longo do tempo observado. Portanto, indica-se para ensaios futuros a utilização dessas formulações com a composição de constituintes proposta de acordo com o planejamento fatorial desenvolvido.

## CONCLUSÕES

O planejamento fatorial 2<sup>3</sup> pode ser considerado uma ferramenta importante para avaliar a influência dos fatores que permitem caracterizar as nanocápsulas, tais como, polidispersão, potencial zeta, tamanho e eficiência de encapsulamento. Nota-se a importância da avaliação destes parâmetros em diferentes tempos de armazenagem das formulações, para se poder prever a estabilidade das mesmas.

O estudo realizado permitiu a escolha de formulações que podem ser utilizadas para ensaios futuros (liberação e sorção). Estas foram escolhidas por apresentarem altos valores de eficiência de encapsulamento, bem como pela estabilidade apresentada ao longo do tempo. Portanto, o método de nanoprecipitação mostrou-se eficaz para o preparo de formulações de nanocápsulas de poli-ε-caprolactona contendo o herbicida atrazina, demonstrando uma técnica com potencial para obter sistemas mais seguros para a aplicação do herbicida no meio ambiente.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

Os gráficos de Pareto referentes à análise de efeito dos parâmetros variados sobre polidispersão e potencial zeta, bem como as superfícies de resposta produzidas a partir da avaliação dos efeitos PCL e Miritol sobre eficiência de encapsulamento e tamanho das nanocápsulas pelos dados obtidos após 30 dias do preparo, estão disponíveis em <http://quimicanova.sbq.org.br>, na forma de arquivo PDF, com acesso livre.

## AGRADECIMENTOS

Às agências de fomento, FAPESP, CNPq e Fundunesp pelo suporte financeiro.

## REFERÊNCIAS

1. Barbosa, L. C. A.; *Os pesticidas, o homem e o meio ambiente*, Edit. da UFV: Viçosa, 2004.
2. Rodrigues, B. N.; Almeida, F. S.; *Guia de herbicidas*, 5ª ed., Grafmarke: Londrina, 2005.
3. Lebaron, H.; Mcfarland, J.; Burnside, O.; *The Triazine Herbicides: 50 Years Revolutionizing Agriculture*, Elsevier BV: San Diego, 2008.
4. Rodrigues, B. N.; Almeida, F. S.; eds.; *Guia de herbicidas*, 3ª ed., Edição dos autores: Londrina, 1995.
5. Arias-Estévez, M.; López-Periago, E.; Martínez-Carballo, E.; Simal-Gándara, J.; Mejuto, J. C.; García-Río, L.; *Agric., Ecosyst. Environ.* **2008**, *123*, 247.
6. Departamento de Defesa e Inspeção Vegetal; *Compêndio de defensivos agrícolas: guia prático de produtos fitossanitários para uso agrícola*, Organização Andrei: São Paulo, 2005.
7. Friedmann, A. S.; *Reprod. Toxicol.* **2002**, *16*, 275.
8. Ashby, J.; Tinwell, H.; Steven, J.; Pastor, T.; Breckenridge, C. B.; *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2002**, *35*, 468.
9. Moore, A.; Scott, A. P.; Lower, N.; Katsiadaki, I.; Greenwood, L.; *Aquaculture* **2003**, *222*, 253.
10. Ventura, B. C.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Brasil, 2004.
11. Scher, H. B., ed.; *Controlled-Release Delivery Systems For Pesticides*, Marcel Dekker: New York, 1999.
12. Collet, J.; Moreton, C. Em *Farmacia, la ciência del diseño de las formas farmacéuticas*; Aulton M. E., ed.; Elsevier: Madrid, 2004.
13. Horeck, K.; Payan, S.; Carnelle, G.; Brujes, L.; Legrand J.; *Powder Technol.* **2003**, *130*, 324.
14. El Bahri, Z.; Tavedert, J. L.; *Polym. Bull.* **2005**, *54*, 97.
15. EL Bahri, Z.; Tavedert, J. L.; *Powder Technol.* **2007**, *172*, 30.
16. Singh, B.; Sharma, D. K.; Gupta, A.; *J. Hazard. Mater.* **2008**, *154*, 278.
17. Durán, N.; Mattoso, L. H. C.; Morais, P. C.; *Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação*, Artliber Editora Ltda.: São Paulo, 2006.
18. Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J. P.; Ammoury, N.; Benita, S.; *Int. J. Pharm.* **1989**, *55*, R1.
19. New, R. R. C. Em *Farmacia, la ciencia del diseño de las formas farmacéuticas*; Philippot, J. R.; Shuber, F., eds.: CRC Press, Inc.: Boca Raton, 1995.
20. Barros Neto, B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E.; *Como fazer experimentos*, Editora da Unicamp : Campinas, 2007.
21. Eisler, R.; *Contaminant Hazard Reviews* **1989**, *18*, 1.
22. O'Donnel, P.; McGinity, J.; *Adv. Drug Delivery Rev.* **1997**, *28*, 25.
23. Galindo-Rodríguez, S.; Allémann, E.; Fessi, H.; Doelker, E.; *Pharm. Res.* **2004**, *21*, 1428.
24. Moraes, C. M.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2009.
25. Mora-Huertas, C. E.; Fessi, H.; Elaissari, A.; *Int. J. Pharm.* **2009**, *385*, 113.