

ESTUDOS PRELIMINARES APLICADOS AO NANOENCAPSULAMENTO DE INSETICIDAS NEONICOTINÓIDES: TIAMETOXAM

(Márcia R. Assalin¹, Débora C. S. Dutra¹, Maria A. Rosa¹, Rafaela C.R.M. Duarte¹, Patrícia Donaire², Nelson Duran²)

(¹ EMBRAPA Meio Ambiente, Rodovia Campinas Mogi-Mirim, Tanquinho Velho, CP. 69, CEP 13820-000, Jaguariúna, SP, Brazil. ² Laboratório de Química Biológica, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil)
Márcia.assalin@embrapa.br

Classificação: Tecnologias de micro e nanoencapsulação de princípios ativos

Resumo

O HLB é uma das mais importantes doenças dos citros da atualidade. A severidade da doença se dá principalmente pela rápida e eficiente disseminação das bactérias associadas ao HLB, pelo psíldeo *Diaphorina citri* e pela ausência de resistência genética em citros. O controle químico é a principal forma de controle dos psíldeos, existindo diferentes inseticidas registrados com esta finalidade. Tiametoxam é um dos princípios ativos utilizados no controle do HLB. Formulações de pesticidas nanoencapsulados permitem uma liberação controlada do ativo bem como proteção contra sua degradação prematura, possibilitando o uso do inseticida convencional de maneira mais sustentável. Neste trabalho estudos preliminares aplicados ao nanoencapsulamento do inseticida tiametoxam foram realizados. Três diferentes metodologias de preparação de nanopartículas poliméricas foram estudadas: dupla emulsão modificada seguida por evaporação do solvente, nanoprecipitação e gelificação iônica. As nanopartículas foram caracterizadas em termos de tamanho, índice de polidispersidade e potencial zeta. A nanoprecipitação e gelificação iônica resultaram em partículas homogêneas e monodispersas, sendo que o diâmetro médio obtido foi 268,7 e 158,8 nm respectivamente, enquanto que o índice de polidispersidade foi inferior a 0,3 para ambas as metodologias. A determinação da eficiência de encapsulamento é a próxima etapa a ser realizada, na continuidade dos estudos de desenvolvimento do nanopesticida.

Palavras-chave: Inseticidas; Tiametoxam; Nanotecnologia; Greening; Liberação Controlada.

PRELIMINARY STUDIES APPLIED TO NANOENCAPSULATION OF NEONICOTINOID INSECTICIDE: THIAMETHOXAM

Abstract

Huanglongbing (HLB) is probably the most serious disease of citrus, nowadays. The severity of disease is mainly the rapid and efficient dissemination of the bacteria associated with HLB by psyllids *Diaphorina citri* and the absence of genetic resistance in citrus. Chemical control is the main way to control the psyllids, and there are different insecticides registered for this purpose. Thiamethoxam is one of the active ingredients used in the control of HLB. Nanoencapsulated pesticide formulations allow controlled release of the active substance as well as protection against premature degradation, making it possible to use the conventional insecticide in a more sustainable way. In this work preliminary studies applied to the nanoencapsulation of the insecticide thiamethoxam were carried out. Three different methods of preparation of polymer nanoparticles were studied: modified double emulsion method followed by solvent evaporation, nanoprecipitation and ionic gelification. The nanoparticles were characterized in terms of size, polydispersity index and zeta potential. Nanoprecipitation and ionic gelification resulted in homogeneous and monodisperse particles, with the

mean diameter obtained being 268.7 and 158.8 nm respectively, while the polydispersity index was less than 0.3 for both methodologies. The determination of the encapsulation efficiency is the next step to be carried out, in the continuity of the development studies of the nanopesticide.

Keywords: Inseticide; Thiamethoxam; Nanotechnology; Greening, Controlled release

1 INTRODUÇÃO

O HLB é uma das mais importantes doenças dos citros da atualidade. A severidade da doença se dá principalmente pela rápida e eficiente disseminação das bactérias associadas ao HLB, pelo psílídeo *Diaphorina citri* (*D. citri*) e pela ausência de resistência genética em citros.

O controle químico é a principal forma de controle dos psílídeos, existindo diferentes inseticidas registrados com esta finalidade. Tiametoxam (inseticida neonicotinoide) é um dos princípios ativos utilizados no controle do HLB. Apresenta elevada solubilidade em água (4 g L^{-1} , a 25°C), elevado potencial de lixiviação, além de ser rapidamente degradado por fotólise (ZHAO et al., 2016). Devido às grandes perdas ocorridas, sejam elas devido às técnicas de aplicação utilizadas, condições ambientais, lixiviamento e degradação por fotólise, concentrações abaixo da concentração efetiva para controle da doença são observadas e novas aplicações são requeridas. Repetidas e indiscriminadas aplicações resultam em uso do pesticida em quantidades superiores àquelas realmente necessárias ao controle da doença e implicam em uma série de problemas que vão desde o aumento do custo do tratamento, contaminação dos corpos aquáticos superficiais e subterrâneos, risco da ocorrência de resistência de populações de *D. citri* ao inseticida, além de riscos à saúde humana, invertebrados aquáticos e abelhas.

A pesquisa científica tem focado no uso de nanopartículas para reduzir o uso de pesticidas em diferentes culturas. Dentro deste contexto, nanopartículas poliméricas tem despertado o interesse dos pesquisadores, uma vez que são possíveis a utilização de polímeros biodegradáveis (naturais ou sintéticos) e o encapsulamento de moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas. Além disto permitem uma liberação controlada do ativo bem como proteção contra sua degradação prematura, possibilitando o uso do inseticida convencional de maneira mais sustentável. Desta forma, estudos da efetividade de formulações de pesticidas encapsulados é extremamente importante para viabilização de seu uso na agricultura. Neste trabalho, estudos preliminares de nanoencapsulamento de tiametoxam foram realizados. Dentre as metodologias de preparo de nanopartículas poliméricas, foram estudadas: dupla emulsão modificada seguida por evaporação do solvente (HUBER et al., 2014), nanoprecipitação (BERNIN–NETO, 2014) e gelificação iônica (GRILLO et al., 2014). Todas as metodologias utilizadas levam em sua composição Quitosana, polímero biocompatível e biodegradável, bastante utilizado no encapsulamento de moléculas hidrofílicas (VRIGNAUD et al., 2011). As nanopartículas foram caracterizadas em termos de tamanho, índice de polidispersidade e potencial zeta.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparo das Nanopartículas pelo método de dupla emulsão modificada e evaporação do solvente

Uma alíquota de 1 mL (4 mg mL^{-1}) de solução aquosa de tiametoxam, (grau técnico, 90%) e 0,5% de álcool polivinílico (PVA) foram primeiramente emulsificados com 10 mL da fase orgânica constituída de acetato de etila e 60 mg de poli(ϵ -caprolactona) (PCL, MM $10.000 \text{ g mol}^{-1}$, Aldrich) sob agitação em Ultra-Turrax. (8.000 rpm) por 1 minuto, para formação da emulsão água-óleo (A/O). Esta emulsão foi então transferida para um bquer contendo 50,1 mL de água Milli-Q, 9,9 mL de uma solução de Quitosana (2 mg mL^{-1}), MM de $105.000 \text{ g mol}^{-1}$ e grau de desacetilação de ~81%, (Polymar), 1% de PVA e 0,9% de NaCl, sob agitação mecânica em Ultra-Turrax, a 10.000 rpm durante 1,5 minutos, formando a dupla emulsão A/O/A. Após este período, a dupla emulsão foi transferido para um balão de fundo redondo (100 mL) e submetido à evaporação do solvente, em rotaevaporador (Heidolph) a 28°C .

2.2 Preparo das Nanopartículas pelo método de nanoprecipitação

Uma alíquota de 3 mL de uma solução orgânica composta de 5 mg mL⁻¹ de PCL e 10 mg mL⁻¹ de tiametoxam (90 %) foi vertida em 9,0 mL de uma solução aquosa composta de quitosana (0,4 mg mL⁻¹, 0,1% de ácido acético) (QS) (MM de 105.000 g mol⁻¹ e grau de desacetilação de ~81%, Polymar) e o surfactante Tween 80 (1 mg mL⁻¹) (Oxiten), em uma única etapa, sob agitação magnética (300 rpm) mantida durante 5 minutos, seguida pela etapa de retirada do solvente orgânico por meio de evaporação sob baixa pressão, 28°C.

2.3 Preparo das Nanopartículas pelo método de gelificação iônica

Uma solução aquosa (Q) de 0,1% de quitosana (MM de 105.000 g mol⁻¹ e grau de desacetilação de ~81%, Polymar) pH 4,7 (com ácido acético, 0,2%) e 8 mg de tiametoxam (90%) foi mantida sob agitação magnética por 12 h. Paralelamente foi preparada uma solução aquosa de Tripolifosfato (Sigma-Aldrich) 0,1% (TPP) e mantida sob refrigeração a 4°C. Uma alíquota de 5 mL da solução Q foi adicionada a 20 mL da solução TPP sob agitação magnética a qual foi mantida por mais 10 minutos.

2.4 Tamanho de partícula, índice de polidispersidade e potencial zeta

Para a análise de diâmetro e carga de partícula foi utilizada a técnica do espalhamento dinâmico de luz (DLS) no equipamento ZetaSizer Malvern® à 25°C. Foi feita uma dispersão das partículas em água milli-Q (1:100) para medida do diâmetro médio (Z-average) e outra dispersão em KCl 1 mmol L⁻¹ (1:100) para medida da carga superficial (Potencial Zeta).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As metodologias aplicadas na preparação das nanopartículas foram comparadas inicialmente por meio da medida do diâmetro hidrodinâmico médio e índice de polidispersidade. Estas medidas são importantes porque além da avaliação do tamanho da partícula obtida são bons indicadores da estabilidade das mesmas. Partículas de tamanhos muito distintos tendem a coalescer mais facilmente (ÜNER et al., 2006). A Tabela 1 apresenta os valores de diâmetro médio e índice de polidispersidade das nanopartículas preparadas.

Tabela 1. Valores de diâmetro e índice de polidispersidade obtido para cada uma das metodologias de preparação utilizadas

Metodologia de Preparo	Diâmetro (nm)	Índice de Polidispersidade
Dupla emulsão e evaporação do solvente	2225,0	1
Nanoprecipitação	268,7	0,298
Gelificação Iônica	158,8	0,190

A metodologia de dupla emulsão seguida por evaporação do solvente resultou em partículas grandes (maiores que 1µm) e de tamanhos muito diferentes. Já as demais metodologias utilizadas na preparação das nanopartículas poliméricas resultaram em partículas monodispersas e homogêneas. Os valores de potencial Zeta foram determinados apenas para as metodologias de nanoprecipitação e gelificação iônica, sendo que os valores obtidos foram +25,5 mv e +18,5 mv. A carga positiva das nanopartículas são decorrentes da presença de quitosana (devido aos agrupamentos amina presente nesta molécula), o que resulta em sua propriedade de bioadesão. Além disso, medidas do potencial zeta são fundamentais, pois em geral partículas carregadas irão sofrer repulsão elétrica entre si, aumentando a estabilidade da emulsão (ÜNER et al., 2006; GRILO et al., 2014). A determinação da eficiência de encapsulamento, será a próxima etapa a ser realizada, uma vez que é de extrema

importância estabelecer a quantidade do ativo encapsulado para dar-se continuidade aos estudos de desenvolvimento do nanopesticida.

4 CONCLUSÃO

Os estudos preliminares de preparação das nanopartículas poliméricas, nos quais foram considerados apenas o tamanho da partícula obtido e o índice de polidispersidade demonstraram que a metodologia de dupla emulsão seguida de evaporação do solvente apresentou resultados insatisfatórios. As demais metodologias de preparação resultaram em partículas homogêneas e monodispersas, e serão utilizadas na continuidade dos estudos para desenvolvimento do nanopesticida.

AGRADECIMENTOS

À Amanda Ferreira Costa pela colaboração. À Fapesp pelo apoio financeiro, processo 2016/23282-0.

REFERÊNCIAS

BERNI-NETO, E.A. Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas contendo amitraz, fluazuron e/ou violaceína para o uso na pecuária. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, Campinas; 2014.

GRILLO, R.; PEREIRA, A.E.S.; NISHISAKA, C.S.; LIMA, R.; OEHLKE, K.; GREINER, R.; FRACETO, L.F. Chitosan/tripolyphosphate nanoparticles loaded with paraquat herbicide: Na environmentally safer alternative for weed control. *Journal of Hazardous Materials*, v.278, p.163-171, 2014.

HUBER, S. C.; MARCATO, P. D.; DURAN, N.; COSTA, A. M. A.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J. M. Preparation and Application of Mucoadhesive Nanoparticles Containing Enoxaparin in a Wound Healing Animal Model. *Current Nanoscience*, v. 10, p. 779-785, 2014.

ÜNER, M. Preparation, characterization and physico-chemical properties of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): Their benefits as colloidal drug carrier system. *Pharmazie*, v.61, p. 375-386, 2006.

VRIGNAUD, S.; BENOIT, J.B.; SAULNIER, P. Strategies for the nanoencapsulation of Hydrophilic molecules in polymer-based nanoparticles. *Biomaterials*. v. 32, p. 8593-8604, 2011.

ZHAO, Q.; GE, Y.; ZUO, P.; SHI, D.; JIA, S. Degradation of Thiamethoxam in aqueous solution by ozonation: Influencing factors, intermediates, degradation mechanism and toxicity assessment. *Chemosphere*. v. 146, p. 105 - 112, 2016.