



Leandro Oliveira Araujo

Nanobioherbicida responsivo a luz: desenvolvimento, caracterização e avaliação da toxicidade

Campo Grande – MS

2025



Leandro Oliveira Araujo

Nanobioherbicida responsivo a luz: desenvolvimento, caracterização e avaliação da toxicidade

Defesa apresentada a banca examinadora, como critério parcial de aprovação para a obtenção do Título de Doutor em Ciências dos Materiais do Programa de Pós-graduação em Ciências dos Materiais do Instituto de Física da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Orientador: Prof^o Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires.

Campo Grande – MS

2025

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, cuja luz iluminou meu caminho e me sustentou firmemente em busca dos meus objetivos. À minha família, que esteve ao meu lado com apoio e compreensão nos momentos de ausência. Em especial, agradeço aos meus pais, Maria Aparecida Lemes de Oliveira e Celso Sari Araújo, por todo o amor, ensinamentos e apoio desde o meu nascimento.

Gostaria de expressar minha mais profunda gratidão à minha esposa, Laís Fernandes Aguilera. Seu amor, apoio e compreensão foram verdadeiramente inestimáveis durante toda essa jornada. Sem sua presença constante, seu incentivo e sua paciência, certamente não teria alcançado este momento. Obrigado por estar ao meu lado em cada desafio, por compartilhar cada vitória e por ser minha fonte de inspiração. Sou imensamente grato por ter você ao meu lado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Anderson Lima Caires, expresso minha profunda gratidão. Sua disponibilidade incansável, paciência e orientação foram fundamentais durante todo o processo da minha pesquisa. Agradeço por sua orientação, que foi crucial para meu crescimento acadêmico e pessoal.

Agradeço ao Supervisor do doutorado sanduiche no exterior, Dr. Gil Alberto Batista Gonçalves (Universidade de Aveiro, Portugal), pela orientação dedicada, pelas discussões científicas esclarecedoras e pelo acolhimento no laboratório.

Expresso minha gratidão a todos os professores que contribuíram para minha formação acadêmica e trajetória.

Aos colegas do laboratório do grupo Óptica e Fotônica da UFMS, em especial ao Dr. William M. Facchinatto, Dr. Montcharles Pontes da Silva, Dra. Regiane Godoy de Lima, Dr. Fernando da Conceição, ao doutorando Joelson Fernandes, sou grato pela colaboração, compartilhamento de experiências e ensinamentos que enriqueceram minha pesquisa.

Agradeço também à nossa querida técnica de laboratório, Hellenicy, pela sua disposição em ajudar, amizade e parceria.

Aos alunos de iniciação científica Raphael Flores, Jhoenne Vasconcelos, Gabriella Miessi, agradeço a amizade, parceria e colaboração ao longo do percurso.

Não posso deixar de expressar minha gratidão ao CNPq pela bolsa de Doutorado concedida, que foi fundamental para realização da minha pesquisa.



Agradeço à CAPES pelo apoio por meio do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior – PDSE (Processo 88881.981453/2024-01), que viabilizou o estágio internacional e ampliou significativamente os resultados deste trabalho.

Por fim, agradeço imensamente a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para esta conquista. Vocês foram essenciais em cada etapa deste percurso.

“Aqueles que passam por nós não vão sós, deixam um pouco de si, levam um pouco de nós”.
- Antoine de Saint-Exupéry.

“Que ninguém se engane, só se consegue a simplicidade através de muito trabalho”.
- Clarice Lispector.

RESUMO

O objetivo central desta Tese é desenvolver nanobioherbicidas (NBHs) ambientalmente mais seguros e rastreáveis, conciliando desempenho herbicida, controle coloidal e avaliação ecotoxicológica multiescala. Para isso, emprega-se o polímero conjugado CNPPV como matriz fotoativa para encapsular o ácido úsnico (AU), bioativo de reconhecido potencial, mas limitado por baixa solubilidade e toxicidade intrínseca. A abordagem integra rotas de síntese (nanoprecipitação adaptada e microfluídica), caracterizações físico-químicas e ópticas (DLS, potencial zeta, AFM/MEV, FTIR, UV-Vis e fluorescência), ensaios de liberação e fotoresposta, além de avaliações biológicas em plantas aquáticas (*Lemna minor*) e no modelo embrionário de zebrafish (ZFET). No Capítulo II, estabeleceu-se a prova de conceito por nanoprecipitação, obtendo-se duas formulações — NBH₁ e NBH₂ (esta com 5× mais CNPPV), com estabilidade superior a 90 dias, eficiência de encapsulação > 80%, morfologia esférica, PDI < 0,25, potenciais zeta em torno de -6 e -20 mV e diâmetros médios de ~149 e ~163 nm. A cinética de liberação revelou transporte não-Fickiano (caso anômalo) e, para NBH₂, liberação fotoresponsiva sob 450 nm compatível com Super Caso II; Nas plantas (*Lemna minor*), verificou-se redução da eficiência fotoquímica do PSII e do índice de vitalidade de maneira dependente da concentração e do tempo, confirmando o potencial herbicida. No Capítulo III, comparou-se síntese por microfluídica e nanoprecipitação: foram desenvolvidos microchips com canais ~200 µm; o que possibilitaram sínteses reprodutíveis de NBHs com e sem Tween® 20 em regime estável; com fluxo 320 µL·min⁻¹ para fase aquosa e 30 µL·min⁻¹ para fase orgânica, onde não observou formação de agregados, e obtiveram-se PDI < 0,20 e diâmetros decrescentes com o aumento do fluxo aquoso, sem alterações relevantes nos espectros de absorção/fluorescência entre rotas. Em *Lemna minor*, efeitos espectrais com surfactante surgiram mais precocemente, porém, após 8 dias, não se observaram diferenças significativas entre formulações, enquanto Fv/Fm, Rfd e NPQ confirmaram inibição do PSII, com redução de ~50% em Rfd frente ao controle. No Capítulo IV, investigou-se a segurança e o papel do surfactante no teste de toxicidade ZFET: a nanoencapsulação (com e sem Tween® 20 (Tw)) reduziu significativamente a toxicidade do AU livre, com perfis de liberação semelhantes entre os grupos (c/Tw e sem Tw). A segurança foi avaliada por testes de sobrevivência, frequência cardíaca e comportamento locomotor no Modelo ZFET; microscopia confocal evidenciou a internalização das NPs em tecidos embrionários. Em conjunto, os resultados posicionam a microfluídica como rota preferencial para controle coloidal e reprodutibilidade, validam o CNPPV como matriz foto-rastreável e fotorresponsiva e demonstram que NBHs de AU conciliam eficácia herbicida, liberação modulada por luz e perfil de risco reduzido, contribuindo para estratégias de manejo compatíveis com a sustentabilidade agrícola e a proteção ambiental.

Palavras-chave: Nanobioherbicidas; CNPPV; ácido úsnico; Microfluídica; Nanoprecipitação; Liberação controlada; Fotorresponsividade, ZFET, *Lemnas minor*.

ABSTRACT

This thesis aims to develop environmentally safer and traceable nanobioherbicides (NBHs) by reconciling herbicidal performance, rigorous colloidal control, and multiscale ecotoxicological assessment. To this end, the conjugated polymer CNPPV was employed as a photoactive matrix to encapsulate usnic acid (AU), a bioactive compound with recognized potential but limited by low solubility and intrinsic toxicity. The approach integrates synthesis routes (adapted nanoprecipitation and microfluidics), physicochemical and optical characterizations (DLS, zeta potential, AFM/SEM, FTIR, UV–Vis, and fluorescence), release and photoresponse assays, and biological evaluations in the aquatic plant *Lemna minor* and in the zebrafish embryo model (ZFET). In Chapter II, a proof of concept was established via nanoprecipitation, yielding two formulations—NBH1 and NBH2 (the latter with 5× higher CNPPV)—that showed >90 days of stability, encapsulation efficiency >80%, spherical morphology, PDI <0.25, zeta potentials around −6 and −20 mV, and mean diameters of ~149 and ~163 nm. Release kinetics indicated non-Fickian (anomalous) transport and, for NBH2, photoresponsive release under 450 nm consistent with a Super Case II mechanism. In *Lemna minor*, a concentration- and time-dependent decrease in PSII photochemical efficiency and vitality index confirmed herbicidal potential. In Chapter III, microfluidic and nanoprecipitation syntheses were compared: custom microchips with ~200 μm channels enabled reproducible NBH production with and without Tween® 20 under steady-state operation; using 320 μL·min^{−1} (aqueous) and 30 μL·min^{−1} (organic) flows, no aggregation was observed, PDI values <0.20 were obtained, and particle size decreased with increasing aqueous flow, with no relevant changes in absorption/fluorescence spectra between routes. In *Lemna minor*, spectral effects appeared earlier for surfactant-containing NBHs; however, after 8 days no significant differences were detected between formulations, while Fv/Fm, Rfd, and NPQ confirmed PSII inhibition, including an ~50% reduction in Rfd versus control. In Chapter IV, safety and the role of surfactant were investigated in ZFET toxicity tests: nanoencapsulation (with and without Tween® 20) significantly reduced the toxicity of free AU, with similar release profiles between groups (with/without Tween). Safety was supported by survival, heart-rate, and locomotor assays, and confocal microscopy evidenced nanoparticle internalization in embryonic tissues. Taken together, the results position microfluidics as the preferred route for colloidal control and reproducibility, validate CNPPV as a photo-trackable and photoresponsive matrix, and demonstrate that AU-loaded NBHs combine herbicidal efficacy, light-modulated release, and a reduced risk profile, contributing to management strategies aligned with agricultural sustainability and environmental protection.

Keywords: Nanobioherbicides; CNPPV; usnic acid; microfluidics; nanoprecipitation; controlled release; photoresponsiveness; ZFET; *Lemna minor*.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - 1 INTRODUÇÃO	12
1.1 CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR AGROQUÍMICOS	12
1.2 HERBICIDAS E BIOHERBICIDAS	13
1.3 BIOHERBICIDAS	16
1.4 LÍQUENS	18
1.5 ÁCIDO ÚSNICO: EXPLORANDO AS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DOS LÍQUENS	19
1.6 ÁCIDO ÚSNICO E SEU POTENCIAL USO PARA FINS AGRÍCOLAS	21
1.7 NANOCARREADORES: SISTEMAS DE LIBERAÇÃO SUSTENTADA PARA AGROQUÍMICOS	22
1.8 NANOCARREADORES DE AGROQUÍMICOS "INTELIGENTES"	25
1.9 ANÁLISE DE PLANTAS VIA ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA ...	29
2 OBJETIVOS	36
2.1 OBJETIVOS GERAIS	36
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS (NA ORDEM DOS CAPÍTULOS).....	36
3 REFERÊNCIAS.....	37
CAPÍTULO 2 - NANOBIOHERBICIDAS DE CNPPV PARA ENTREGA DE ÁCIDO ÚSNICO: ESTABILIDADE, CARACTERIZAÇÃO E LIBERAÇÃO FOTORRESPONSIVA	49
RESUMO.....	49
ABSTRACT	50
1 INTRODUÇÃO.....	51
2 MATERIAIS E MÉTODOS	54
2.1 PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA O AU E O CNPPV	54
2.2 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS.....	55
2.2.1 ANÁLISE DO EFEITO TYNDALL.....	56
2.3 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DO ÁCIDO ÚSNICO (AU)	57
2.4 CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES	57

2.5 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (MFA)	58
2.6 ABSORÇÃO UV-VIS E FLUORESCÊNCIA.....	58
2.7 ESTUDO DE FOTODEGRADAÇÃO	59
2.8 CINÉTICA DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO ÁCIDO ÚSNICO E ANÁLISE DE FOTORRESPONSIVIDADE.	59
2.9 ESTUDO DA INTERAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS E EXTRATO DE CLOROFILA.....	61
2.10 IMAGEM DE FLUORESCÊNCIA DA <i>CHL A LEMNA VALDIVIANA</i>	62
2.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	63
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
3.1 PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DO AU E DO CNPPV	64
3.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS NANOCARREADORES.....	65
3.2.1 Verificação qualitativa do efeito Tyndall	66
3.2.2 Espalhamento dinâmico de luz (EDL) e Potencial Zeta (ζ).....	67
3.2.3 Microscopia de força atômica (MFA)	69
3.2.5 Absorção UV-vis e fluorescência	71
3.2.6 Fotodegradação.....	74
3.2.7 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DO AU.....	77
3.5 MEDIDAS DE ESTABILIDADE DOS NANOCARREADORES	78
3.5.1 Medidas de estabilidade dos nanocarreadores (DLS, PDI, potencial zeta)	78
3.5.2 Medida de estabilidade do pH dos nanocarreadores.....	80
3.6 CINÉTICA DE LIBERAÇÃO <i>VITRO</i> E RESPONSABILIDADE A LUZ	82
3.6.1 Cinética de liberação <i>in vitro</i> do AU	82
3.6.2 Liberação responsiva a luz azul do AU.....	86
3.7 EFEITO DOS NANOCARREADORES NO EXTRATO DA CLOROFILA	89
3.7.1 Supressão da fluorescência da clorofila	89
3.8 EFEITO DOS NANOCARREADORES EM PLANTAS AQUÁTICAS (<i>LEMNA</i> <i>MINOR</i>)	94

3.8.1 ANÁLISE DOS EFEITOS DE CONCENTRAÇÃO DO AU LIVRE E DOS NANO BIOHERBICIDAS NAS <i>Lemnas minor</i>	94
4 CONCLUSÃO	103
5 REFERÊNCIAS	104
CAPÍTULO 3 - NANOBIOHERBICIDAS POR MICROFLUÍDICA E NANOPRECIPITAÇÃO: CONTROLE COLOIDAL E DESEMPENHO FOTO-FISIOLÓGICO	114
RESUMO	114
ABSTRACT	115
1 INTRODUÇÃO	116
2 MATERIAIS E MÉTODOS	120
2.1 FABRICAÇÃO DE MICROCHIPS MICROFLUÍDICOS POR IMPRESSÃO 3D E REPLICAÇÃO EM PDMS	120
2.2 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS UTILIZANDO O MÉTODO DE MICROFLUÍDICA	122
2.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
2.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	124
2.7 CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA	124
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	125
3.1 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS UTILIZANDO O MÉTODO DE MICROFLUÍDICA	125
3.2 EFEITO DOS NANOCARREADORES EM PLANTAS (<i>LEMNA MINOR</i>)	129
4 CONCLUSÃO	133
5 REFERÊNCIAS	134
CAPÍTULO 4 - AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E INFLUÊNCIA DO SURFACTANTE NA PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ÁCIDO ÚSNICO	140

RESUMO.....	140
ABSTRACT	141
1 INTRODUÇÃO.....	142
2 MATERIAIS E MÉTODOS	145
2.1 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS UTILIZANDO O MÉTODO DE MICROFLUÍDICA.....	145
2.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	145
2.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	146
2.4 CINÉTICA DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO ÁCIDO ÚSNICO.....	146
2.5 DIÂMETRO HIDRODINÂMICO MÉDIO E POTENCIAL ZETA.	146
2.6 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE EM EMBRIÕES DE <i>DANIO RERIO</i> (ZFET)	147
2.6 MICROSCOPIA CONFOCAL PARA VISUALIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS EM EMBRIÕES DE ZEBRAFISH.....	148
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	149
3.1 SÍNTESE DOS NBHs, POR NANOPRECIPITAÇÃO VIA MICROFLUÍDICA.	149
3.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS NBHs	150
3.3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE EMBRIONÁRIA EM <i>DANIO RERIO</i> (ZFET).	153
3.4 VISUALIZAÇÃO E ANÁLISE DA INTERNALIZAÇÃO DE NBH EM EMBRIÕES DE ZEBRAFISH	157
4 CONCLUSÃO.....	161
5 CONCLUSÃO GERAL.....	161
5 REFERÊNCIAS.....	165

Capítulo 1 - 1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR AGROQUÍMICOS

A contaminação ambiental representa uma ameaça latente à saúde do nosso planeta, manifestando-se em diversas formas e origens. Entre os diversos agentes poluentes, os agroquímicos emergem como protagonistas, desencadeando preocupações significativas devido aos impactos negativos que exercem sobre os ecossistemas terrestres e aquáticos (Chowdhary et al., 2022). Enquanto os agroquímicos são ferramentas cruciais na moderna prática agrícola, eles desempenham um papel paradoxal, aumentando a produção de alimentos, mas simultaneamente contribuindo para desequilíbrios ambientais (Yadav et al., 2023).

O uso indiscriminado de fungicidas, inseticidas e herbicidas ampliou-se nas últimas décadas, acompanhando o crescimento populacional e a demanda por alimentos (Wahab et al., 2022). Essa expansão resulta em resíduos tóxicos que, muitas vezes, infiltram-se nos solos, contaminam os corpos d'água e afetam a qualidade do ar (Karimi et al., 2022; Rasool et al., 2022; Y. Singh & Saxena, 2022). Os efeitos dessa contaminação estendem-se para além das fronteiras agrícolas, afetando ecossistemas naturais, biodiversidade e, em última instância, a saúde humana (Ashraf & Faheem, 2020; Pelosi et al., 2017; Perković et al., 2022).

A exposição de organismos não-alvo pode ocorrer tanto diretamente, quando os pesticidas estão presentes na água, quanto indiretamente, mediante o escoamento que ocasiona pulsos de contaminação (Dara & Drabovich, 2023). Os riscos associados às perturbações ambientais são de difícil previsão, dada a complexidade das interações e a variabilidade dos ecossistemas e seus habitantes (Rico-Martínez et al., 2022). Nesse contexto, é essencial compreender a interação entre os insumos agrícolas, como os agrotóxicos, e os ecossistemas para garantir a utilização sustentável desses compostos no meio ambiente (Sargent et al., 2023).

Diante desse cenário, experimentos conduzidos em ambientes controlados, como laboratórios, têm o propósito de simular diversos cenários de poluição, contribuindo para o entendimento dos mecanismos de toxicidade desses compostos. A pesquisa nesse contexto é crucial para orientar práticas mais sustentáveis e mitigar os impactos negativos resultantes do uso indiscriminado de agrotóxicos. Os peixes por exemplo, desempenhando um papel crucial como bioindicadores da contaminação aquática, reagem prontamente aos efeitos da poluição ambiental (Ahmed et al., 2022). A exposição prolongada desses animais aos agrotóxicos induz a uma variedade de distúrbios fisiológicos e disfunções comportamentais (Bojarski & Witeska, 2020; Pompermaier et al., 2022). A problemática da poluição aquática, especialmente por

contaminantes como os agroquímicos, assume contornos alarmantes no Brasil, que se destaca como um dos principais produtores agrícolas globais (Ollinaho et al., 2023; Pereira et al., 2023).

Desde 2008 o mercado de agrotóxicos no Brasil tem registrado um crescimento expressivo, acompanhado de um aumento progressivo no consumo e na intensificação do uso desses produtos, consolidando o Brasil como o maior consumidor mundial de agrotóxicos, considerando números totais (Paz De Lima & Nery, 2022). Essa realidade demanda ações efetivas e políticas voltadas para a promoção de práticas agrícolas sustentáveis, visando preservar a saúde ambiental e humana a longo prazo.

1.2 HERBICIDAS E BIOHERBICIDAS

Entre os agroquímicos, os herbicidas, utilizados para controlar o crescimento de plantas indesejadas, assumem uma posição de destaque (M. Baltazar & Surajit K. De Datta, 2023b). No entanto, seu uso extensivo levanta desafios significativos, especialmente em relação aos danos ambientais. Os herbicidas são cruciais para proteger as culturas de plantas invasoras que competem por recursos, como água, luz solar e nutrientes no solo (M. Baltazar & Surajit K. De Datta, 2023b, 2023c).

A eficácia e segurança no uso de herbicidas agrícolas dependem de critérios específicos que abrangem desde a época de aplicação até o mecanismo de ação. Estes critérios desempenham um papel crucial no manejo das plantas daninhas e na preservação das culturas desejadas. Eles podem ser classificados em diferentes formas, como época de aplicação, tipo de cultura, mecanismo de ação etc. Cada uma projetada para atender a necessidades específicas (Scherer Roman et al., 2005).

Época de Aplicação:

Os herbicidas são aplicados em momentos estratégicos, como no pré-plantio incorporado (PPI), anterior à semeadura da cultura, ideal para herbicidas voláteis como o Trifluralina. O PPI requer atenção à profundidade de incorporação para garantir eficiência e minimizar riscos de toxicidade à cultura (M. Baltazar & Surajit K. De Datta, 2023c). A pré-emergência (PRE) ocorre logo após a semeadura, enquanto a pós-emergência (POS) é realizada após o surgimento das plantas daninhas, mas antes de prejudicarem a cultura (Scherer Roman et al., 2005).

- **Seletividade das Culturas:**

A capacidade de um herbicida não afetar significativamente a produtividade da cultura é crucial. Herbicidas seletivos, como o 2,4-D em cana-de-açúcar, agem de maneira a controlar

plantas daninhas sem causar danos à cultura desejada (M. Baltazar & Surajit K. De Datta, 2023c). Por outro lado, herbicidas não seletivos, como Glifosato, podem impactar negativamente diversas culturas.

- **Mobilidade na Planta:**

A mobilidade do herbicida na planta é um fator determinante para sua eficácia. Herbicidas sistêmicos, como Diuron, movem-se pelos vasos da planta, enquanto herbicidas de contato, como Paraquat, atuam no local de penetração (M. Baltazar & Surajit K. De Datta, 2023c; Scherer Roman et al., 2005). A escolha entre esses tipos de herbicidas depende da natureza das plantas daninhas e da cultura.

- **Mecanismo de Ação:**

O Comitê de Ação à Resistência a Herbicida (HRAC - *Herbicide Resistance Action Committee*), classifica herbicidas de acordo com seus modos de ação em grupos (A a Z) Tabela 1, considerando alvos celulares e mecanismos bioquímicos (Figura 1) (Délye et al., 2013). Esta classificação é essencial para prevenir a resistência de plantas daninhas, evitando o uso excessivo de herbicidas do mesmo grupo.

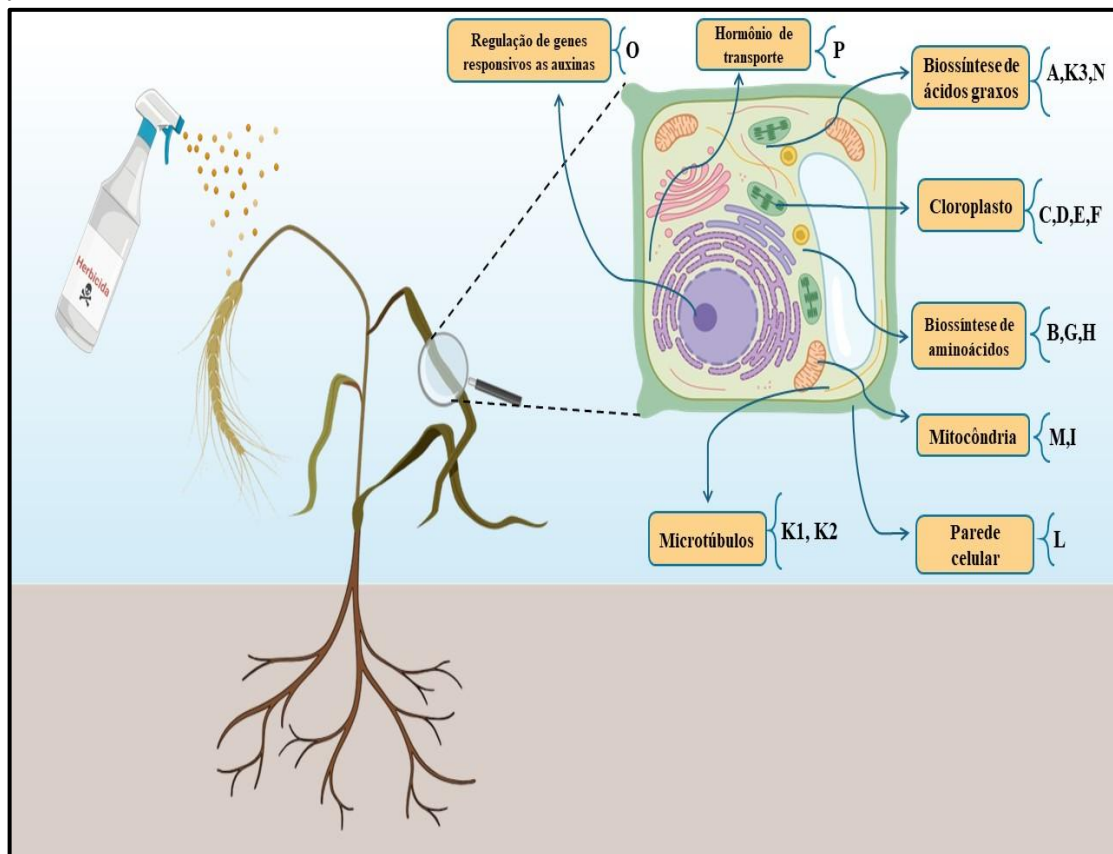
Tabela 1. Modos de ação e classificação dos herbicidas de acordo com o HRAC

Grupos	Modo de ação do herbicida	Caminho ou processo direcionado
A	Inibição da acetil-CoA carboxilase (ACCase)	Biossíntese de ácidos graxos
B	Inibição da acetohidroxiácido sintase (AHAS, ALS)	Biossíntese de aminoácidos (Leu, Ile, Val)
C	Inibição da proteína D1 do fotosistema II (psbA)	Fotossíntese (transferência de elétrons)
D	Desvio dos elétrons transferidos pelo fotosistema I ferredoxina (Fd)	Fotossíntese (transferência de elétrons)
E	Inibição da protoporfirinogênio oxidase (PPO)	Fotossíntese (biossíntese de heme para clorofila)
F	Inibição de fitoeno dessaturase (PDS) ou 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (4-HPPD) ou de uma proteína desconhecida	Fotossíntese (biossíntese de carotenoides)
G	Inibição da 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintase (EPSP sintase)	Biossíntese de aminoácidos (Phe, Trp, Tyr)
H	Inibição da glutamina sintase	Biossíntese de aminoácidos (Gln)

I	Inibição da diidropteroato sintase	Biossíntese de tetrahydrofolato
K1, K2	Aprimoramento da despolimerização da tubulina	Inibidores da formação de microtúbulos
K3	Inibição da sintase de ácidos graxos (FAS)	Biossíntese de ácidos graxos
L	Inibição da celulose-sintase	Biossíntese da parede celular
M	Desacoplamento da fosforilação oxidativa	Biossíntese de ATP
N	Inibição da elongase de ácidos graxos	Biossíntese de ácidos graxos
O	Estimulação da proteína 1 de resposta ao inibidor de transporte (TIR1)	Regulação de genes responsivos a auxina
P	Inibição do transporte de auxina	Sinalização hormonal de longo alcance
Z	Desconhecido	

Fonte: Adaptado de (Délye et al., 2013)

Figura 1 Esquema representativo dos alvos celulares de ação herbicida e classificação de herbicidas por modo de ação de acordo com o HRAC.



Fonte: Autor.

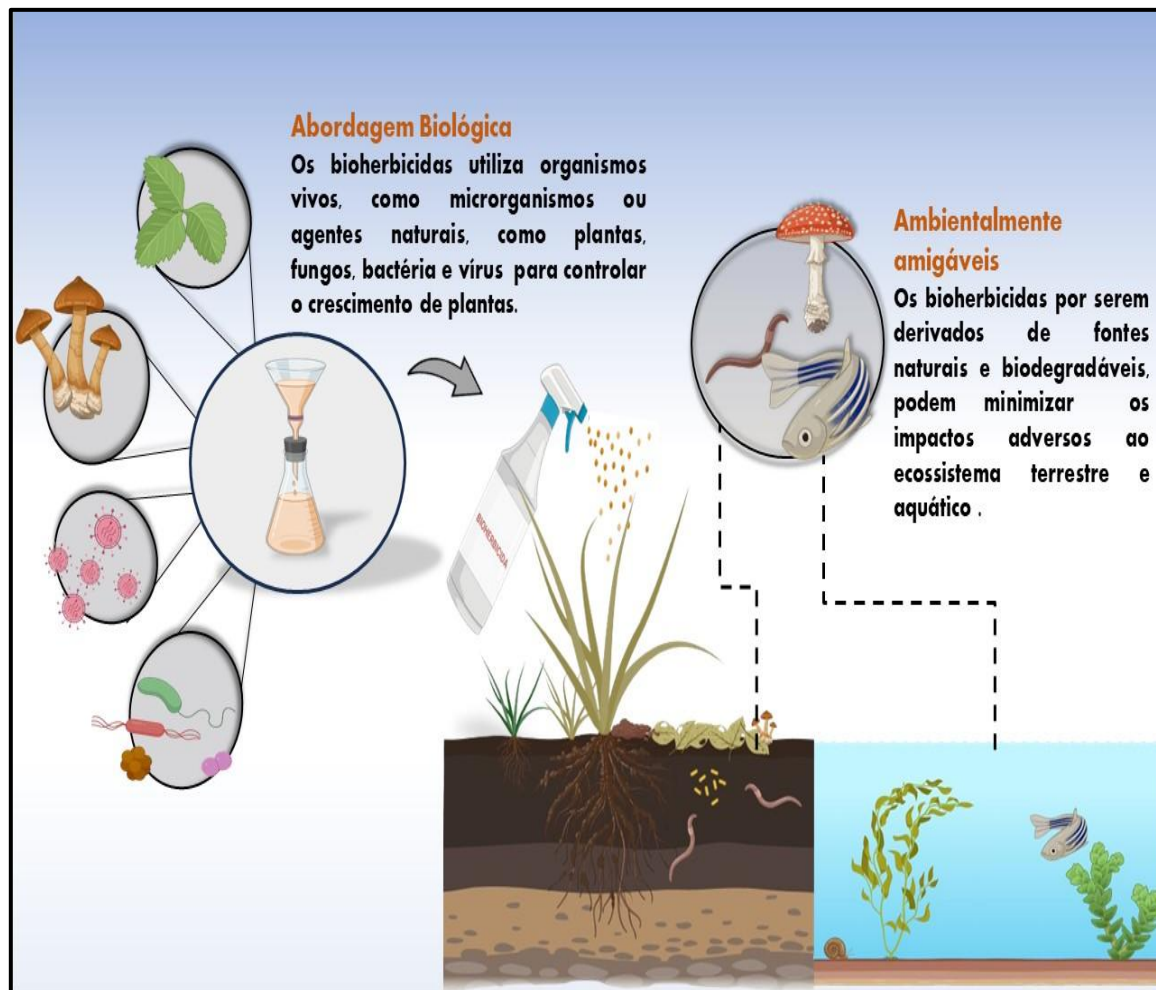
Ao integrar esses critérios, os agricultores podem planejar estratégias de manejo eficazes. A rotação de herbicidas com diferentes modos de ação é essencial para prevenir a resistência e garantir a sustentabilidade no controle de plantas daninhas (Scherer Roman et al., 2005). O conhecimento aprofundado desses critérios é fundamental para otimizar o uso de herbicidas, mantendo a produtividade e a saúde das culturas (Varah et al., 2023).

O uso excessivo de herbicidas pode levar à contaminação do solo e da água, redução da biodiversidade e efeitos negativos sobre os microrganismos do solo (Chowdhury et al., 2023; Maccario et al., 2022). A persistência de herbicidas no solo é um desafio significativo, pois pode contribuir para problemas de contaminação da água (Maccario et al., 2022).

1.3 BIOHERBICIDAS

Em contrapartida aos herbicidas químicos convencionais, surge a promissora alternativa dos bioherbicidas. Um bioherbicida é definido como um microrganismo fitopatogênico ou uma fitotoxina microbiana que pode ser aplicada a uma planta para reduzir seu vigor ou causar sua morte (Pacanoski, 2015). Esses agentes são derivados de organismos vivos e contêm compostos aleloquímicos especializados, material genético ou extratos de plantas, os quais foram projetados ou modificados para superar os mecanismos de defesa específicos das plantas-alvo (**Figura 2**) (Kremer, 2019; Pacanoski, 2015).

Figura 2 Representação da derivação Sustentável de fontes naturais e a possível contribuição ambientalmente amigável dos bioherbicidas



Fonte: Autor.

A abordagem na utilização de herbicidas de origem biológica oferece uma alternativa mais sustentável, minimizando potencialmente os impactos adversos no meio ambiente, conforme ilustrado na **Figura 2** (Pacanoski, 2015; Roberts et al., 2022). No entanto, a implementação eficaz dos bioherbicidas ainda enfrenta desafios, como a necessidade de compreender melhor as interações entre os microrganismos e as plantas, bem como otimizar sua eficácia em diferentes ambientes agrícolas (Duke, 2024).

Em contraste com o controle biológico clássico, os bioherbicidas utilizam formulações de patógenos de plantas manipuladas para produzir material infeccioso, sendo aplicados diretamente nas plantas por meio de spray líquido ou grânulo sólido (Caldwell et al., 2012; Xie et al., 2013a). Uma vez dentro da planta, os bioherbicidas iniciam a produção de enzimas, como amilases, celulasas, ligninases, pectinases, peptidases, fosfolípidos ou proteases, que degradam paredes celulares, membranas e proteínas (Xie et al., 2013b). Além disso, metabólitos

secundários e peptídeos fitotóxicos podem interferir no metabolismo e nos mecanismos de defesa das plantas-alvo (Vurro et al., 2009).

Os bioherbicidas podem causar diversas alterações metabólicas nas plantas-alvo, como a redução da função celular, enzimática e hormonal, desregulação na fotossíntese, indução de peroxidação lipídica e inibição da germinação e desenvolvimento das sementes (Caldwell et al., 2012; Lee et al., 2015). Isso pode levar a clorose, alterações nas taxas fotossintéticas, aumento do estresse oxidativo e influência no fechamento dos estômatos, reduzindo o crescimento e aumentando a senescência (Lee et al., 2015).

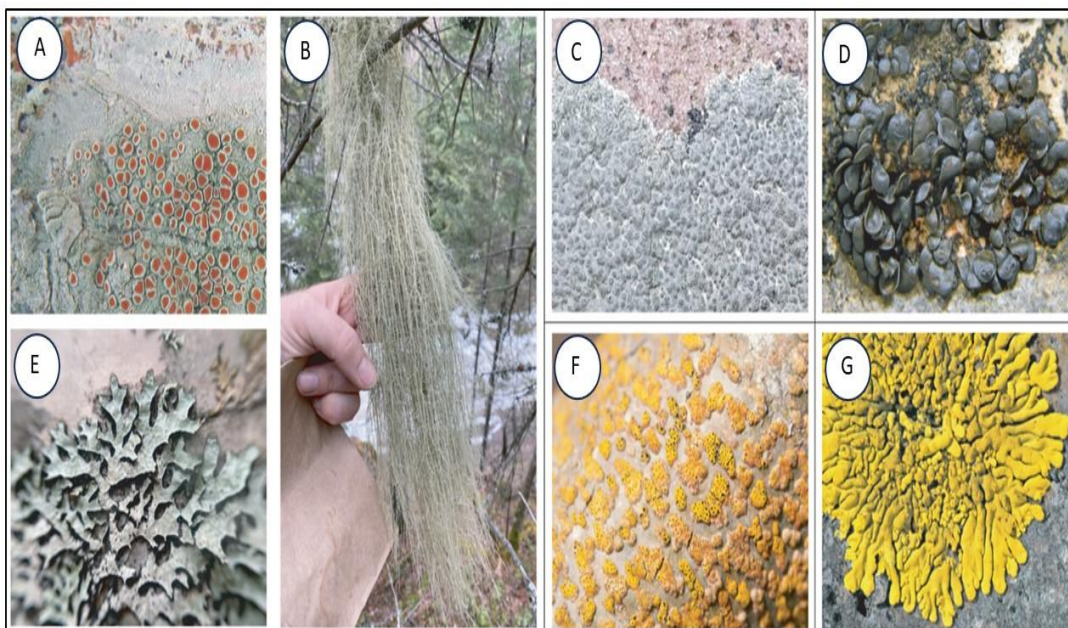
Apesar de características comuns, estudos recentes indicam que muitos patógenos podem influenciar as plantas-alvo de maneiras diferentes (Harding & Raizada, 2015). Essas informações destacam a complexidade do mecanismo de ação dos bioherbicidas e a necessidade contínua de pesquisa para compreender melhor seus efeitos específicos.

Os danos ambientais associados aos herbicidas e os bioherbicidas destacam a importância crítica de encontrar um equilíbrio entre a necessidade de controlar as plantas invasoras e a preservação da biodiversidade (M. Baltazar & Surajit K. De Datta, 2023a). Enquanto os herbicidas químicos tradicionais são eficazes, suas implicações ambientais instigam a busca por soluções mais ecológicas, como os bioherbicidas. Ao passo que avançamos na busca por métodos agrícolas mais sustentáveis, é de suma importância avaliar cuidadosamente os prós e contras de cada abordagem, garantindo que a produção de alimentos não ocorra às custas da saúde a longo prazo do nosso ecossistema.

1.4 LÍQUENS

Os líquens são organismos fascinantes que resultam de uma simbiose mutualística entre um fungo, conhecido como micobionte, e uma alga ou cianobactéria, chamada fotobionte (Q. Yang et al., 2023a). Essa parceria resulta em um organismo complexo, com características únicas que os distinguem de seus componentes individuais (Biradar et al., 2023a). Os líquens são conhecidos por sua capacidade de colonizar em uma variedade de ambientes, desde áreas árticas até desertos, desempenhando papéis cruciais na ecologia global e servem como bioindicadores de qualidade ambiental (Biradar et al., 2023a; Q. Yang et al., 2023a). Na **Figura 3**, podemos observar que os líquens exibem uma notável diversidade de formas, cores e estão presentes em uma variedade de ambientes

Figura 3 Fotos mostrando a diversidade cores e formas dos líquens.: (A), *Haematomma accolens*; (B), *Dermatocarpon*; (C), *Verrucaria*; (D), *Lempholemma*; (E), *Parmelia*; (F), *Trypethelium sp.*; (G), *Candelina sulcata*.



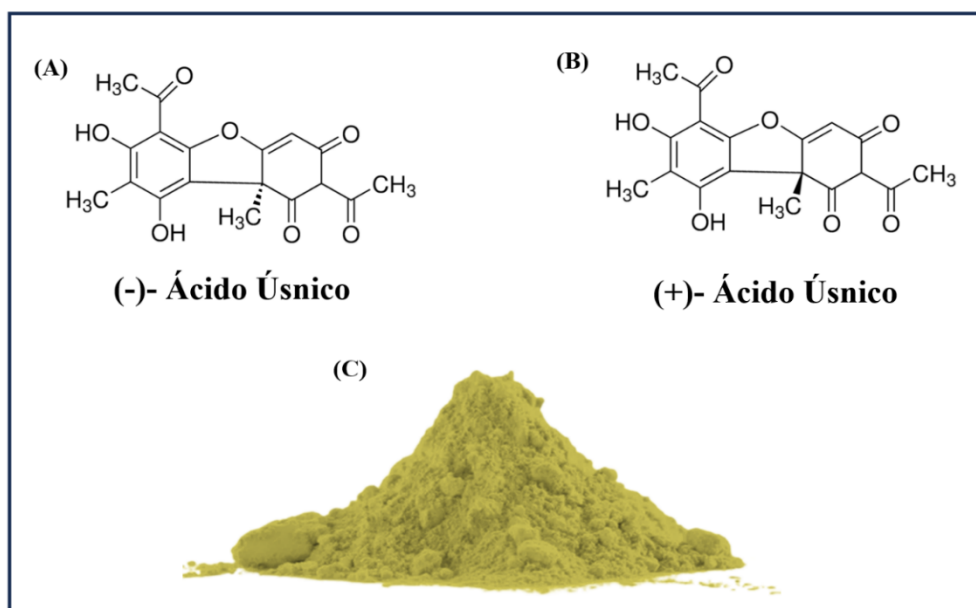
Fonte: Adaptado de (Spribille et al., 2022)

A estrutura dos líquens consiste em estruturas fúngicas entrelaçadas, fornecendo proteção e suporte, enquanto as células fotossintéticas do fotobionte realizam a fotossíntese, contribuindo com nutrientes para o organismo composto (Biradar et al., 2023b; Q. Yang et al., 2023a). Essa colaboração simbiótica permite que os líquens sobrevivam em condições extremas, muitas vezes inóspitas para outros organismos (Spribille et al., 2022).

1.5 ÁCIDO ÚSNICO: EXPLORANDO AS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DOS LÍQUENS

O ácido úsnico (AU) [2,6-diacetil-7,9-di-hidroxi-8,9b-dimetil-1,3(2H,9βH)-dibenzo-furandiona], é um metabólito secundário de polipeptídeo encontrado em várias espécies de líquens, quando extraído, tem a forma de um pó amarelado, que existe em duas formas enantioméricas, dependendo da posição do grupo metila no átomo quiral (Kulinowska et al., 2023). Este metabólito secundário desperta interesse na comunidade científica, na indústria farmacêutica e cosmética devido às suas propriedades bioativas, o que o torna objeto de estudo e aplicação em diversas áreas (Croce et al., 2022a; Kulinowska et al., 2023; H. Wang et al., 2022a).

Figura 4 (A) e (B) Imagens dos dois enantiômeros do AU, (C) Imagem do AU extraído na forma de pó



Fonte: Autor

Uma das características mais notáveis do AU é sua potente atividade antimicrobiana (Kim et al., 2018; Priya et al., 2021). Estudos demonstraram que o AU possui a capacidade de inibir o crescimento de uma ampla variedade de microrganismos, incluindo bactérias, fungos e até mesmo vírus (Filimonov et al., 2022; Galla et al., 2023). Essa propriedade antimicrobiana tem sido explorada em aplicações médicas, como tratamento de infecções cutâneas, garganta e outras condições causadas por microrganismos patogênicos (Paździora et al., 2023). Além de suas propriedades antimicrobianas, o AU também exibe atividade antioxidante significativa (Macedo et al., 2021; Paździora et al., 2023). Isso significa que ele tem a capacidade de neutralizar os radicais livres, moléculas altamente reativas que podem causar danos às células e contribuir para o envelhecimento e o desenvolvimento de várias doenças, incluindo câncer e doenças cardiovasculares (Croce et al., 2022a; Sun et al., 2021; H. Wang et al., 2022b).

Devido às suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes, o AU tem sido incorporado em uma variedade de produtos cosméticos e dermatológicos, como cremes faciais, loções corporais e produtos para cuidados com os cabelos (Croce et al., 2022a; H. Wang et al., 2022c). Sua capacidade de combater bactérias e fungos, bem como neutralizar os radicais livres, faz dele um ingrediente valioso em formulações destinadas a promover a saúde da pele e a prevenir o envelhecimento precoce (H. Wang et al., 2022c).

Estudos preliminares sugeriram que o AU pode exibir atividade anticancerígena, inibindo o crescimento de células tumorais e induzindo a apoptose (morte celular programada)

em certos tipos de câncer (Wong et al., 2023). Embora mais pesquisas sejam necessárias para entender completamente os mecanismos envolvidos e avaliar sua eficácia em modelos animais e humanos, esses achados preliminares destacam o potencial terapêutico do ácido úsnico no tratamento do câncer.

1.6 ÁCIDO ÚSNICO E SEU POTENCIAL USO PARA FINS AGRÍCOLAS

Diversas pesquisas ressaltaram a relevância dos metabólitos secundários do líquen na ecologia química, evidenciando interações como líquen-micróbio, líquen-planta e líquen-animal (Poulsen-Silva et al., 2023; Q. Yang et al., 2023b). Além do impacto ecológico, essas investigações também têm implicações comerciais, explorando o desenvolvimento de agentes antimicrobianos agrícolas, herbicidas e inseticidas (Krishna et al., 2022).

Nesse sentido o AU, exibe atividades antibacterianas e antifúngicas contra vários patógenos vegetais. Ele mostrou forte atividade antibacteriana contra *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (Paguirigan et al., 2022). Alguns estudos indicam também que o AU tem múltiplos efeitos fitotóxicos incluindo inibição da transpiração, respiração e taxas fotossintéticas, redução da atividade mitótica, desestabilização das membranas celulares e subcelulares, inibição das enzimas protoporfirinogênio oxidase (Protox) e p-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (HPPD) e diminuição dos níveis de fito hormônios em folhas e raízes (Luzina & Salakhutdinov, 2016a).

Em outra pesquisa analisou a influência do AU nas taxas de troca gasosa, incluindo fotossíntese, respiração e transpiração, durante um período prolongado de cultivo de tomate. Os resultados revelaram que, em concentrações mais elevadas de AU, as plantas cultivadas em substratos com a maior concentração do composto apresentaram reduções significativas nas taxas fotossintéticas e respiratórias (Latkowska et al., 2006a). Em uma pesquisa mais recente investigou os efeitos de quatro fitotoxinas (ácido úsnico, ácido salicílico, ácido cinâmico e ácido benzoico) no fotossistema II (PSII) de *Chlamydomonas reinhardtii*. O AU reduziu a atividade fotossintética e degradou proteínas do PSII (Y. Gao et al., 2018a). Os resultados proporcionam insights fundamentais para compreender os impactos específicos do AU na fotossíntese, esses resultados sugerem que o AU tem um potencial de ser usado como um bioherbicida.

Contudo, surgem preocupações quanto à toxicidade do AU, especialmente em relação à hepatotoxicidade (H. Wang et al., 2022d). No entanto, estudos mais recentes, incluindo aqueles que exploram a aplicação da nanotecnologia, visam não apenas entender e mitigar os efeitos adversos do ácido úsnico, mas também aprimorar sua bioatividade (Croce et al., 2022b). A nanotecnologia apresenta uma perspectiva promissora para o uso do AU, buscando minimizar

sua toxicidade e, ao mesmo tempo, maximizar sua eficácia (Chircov et al., 2023a; Vasarri et al., 2024).

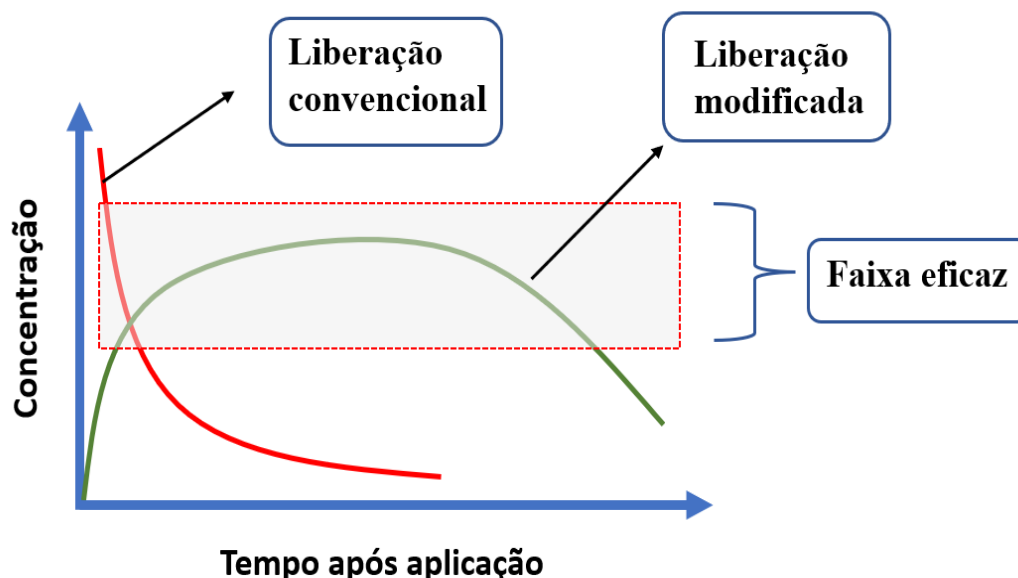
Além disso, investigações apontam para a possível aplicação do AU como biopesticida, onde a nanotecnologia desempenha um papel fundamental (Pontes et al., 2023). A Nanoencapsulação do AU poderia oferecer vantagens significativas, como maior estabilidade, liberação controlada e menor impacto ambiental (Goyal et al., 2023). Esses avanços na pesquisa ressaltam a versatilidade do AU, podendo ser introduzido não apenas como agente terapêutico, mas também como uma alternativa sustentável e eficaz no controle de pragas agrícolas.

1.7 NANOCARREADORES: SISTEMAS DE LIBERAÇÃO SUSTENTADA PARA AGROQUÍMICOS

A busca por tecnologias agrícolas sustentáveis torna-se crucial para garantir a continuidade da atividade humana no planeta. Diante do desafio de alimentar uma população global em constante crescimento, estimada entre 9 e 10 bilhões de pessoas até 2050, a necessidade de aumentar a produção de alimentos em 25 a 70% em relação aos níveis atuais é iminente (Gu et al., 2021). Os defensivos agrícolas têm sido amplamente utilizados para proteger as plantações e assegurar colheitas eficientes (H. Chen & Yada, 2011). Contudo, a aplicação excessiva desses defensivos resulta frequentemente em contaminação ambiental e exposição humana, levando a sérios problemas de saúde (Aktar, Sengupta e Chowdhury, 2009).

A nanotecnologia surge como uma alternativa promissora para mitigar esses riscos, oferecendo maior eficácia e segurança na agricultura. O uso de nanocarreadores (sistemas ou estruturas que transportam, encapsulam ou carregam agentes ativos, em uma escala nanométrica) permite uma liberação lenta e controlada dos ingredientes ativos, reduzindo a quantidade necessária de defensivos aplicados (Pontes et al., 2025)(Forini et al., 2022) Como representado na **Figura 5**

Figura 5 Representação dos sistemas de liberação de agroquímicos pelos métodos convencionais versus liberação modificada por nanocarreadores.



*Esquema representativo do ingrediente ativo nanocarreadores é liberado de forma sustentada ao longo do tempo;

Fonte: Adaptado de (Montcharles da S. Pontes, 2023).

Nos sistemas de liberação modificado por nanocarreadores na agricultura oferece diversas vantagens. Primeiramente, há uma significativa redução na quantidade de substância necessária, o que não apenas otimiza os recursos, mas também contribui para práticas mais econômicas e sustentáveis. Além disso, a diminuição no risco de contaminação ambiental é uma vantagem notável, proporcionando benefícios tanto para o ecossistema quanto para a saúde humana. Outro ponto relevante é a redução na quantidade de energia gasta nos processos agrícolas. Ao incorporar nanocarreadores, é possível minimizar o consumo energético, contribuindo para uma abordagem mais eficiente e “eco-friendly” na agricultura. Por fim, destaca-se o aumento na segurança, tanto no manuseio quanto na aplicação de substâncias. Isso não apenas protege os agricultores de potenciais riscos, mas também preserva a integridade do meio ambiente.

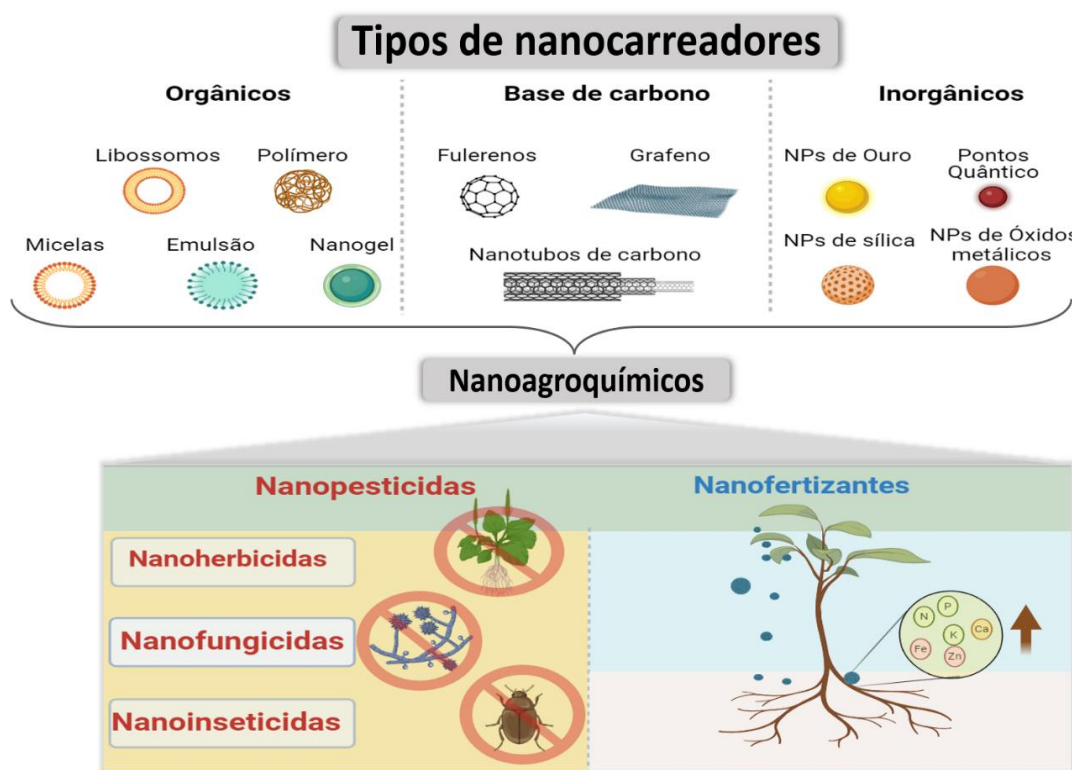
A formulação de nanoagroquímicos (nanocarreadores de produtos químicos agrícolas como herbicidas, inseticidas, acaricidas, fungicidas e fertilizantes sintéticos) permite superar obstáculos ambientais como pH, vento, temperatura, chuva e radiação UV, entre outros, que dificultar o efeito eficiente dos agroquímicos convencionais (Mishra & Khare, 2021; Wu et al., 2022). Os benefícios dos nanoagroquímicos incluem maior proteção das culturas, maior eficiência dos nutrientes e fertilidade do solo, entre outros (Kah et al., 2018). É esperado que

os nanoagroquímicos sejam mais poderosos para a produção agrícola do que seus equivalentes convencionais, com um ganho médio estimado de 20 a 30% (Rajput et al., 2021).

Nanoagroquímicos e nanopesticidas são dois tipos de agroquímicos que utilizam a nanotecnologia para melhorar as práticas agrícolas. Os nanoagroquímicos referem-se ao uso da nanotecnologia no desenvolvimento de vários insumos agrícolas, incluindo fertilizantes e nutrientes, para aumentar o crescimento e o rendimento das culturas e, ao mesmo tempo, minimizar o impacto ambiental (GUPTA et al., 2023). Por outro lado, os nanopesticidas se concentram especificamente no desenvolvimento de formulações de pesticidas (herbicidas, fungicidas e inseticidas) usando nanomateriais como transportadores de ingredientes ativos (Baliyarsingh & Pradhan, 2023).

Portanto, o termo nanoagroquímicos é um termo mais geral que abrangem uma gama mais ampla de insumos agrícolas, já os nanopesticidas visam especificamente o desenvolvimento de formulações de pesticidas usando nanomateriais para melhorar o controle de pragas, conforme apresentado na **Figura 6**.

Figura 6 Esquema representativo dos principais tipos de carreadores e algumas aplicações como nanoagroquímicos



Fonte: Autor

Apesar de ainda não haver uma definição padronizada para nanopesticidas, a maioria consiste em ingredientes ativos encapsulados. O termo também é utilizado para descrever

formulações compostas apenas por nanopartículas inorgânicas, onde a própria partícula ou sua forma dissolvida possui a atividade desejada, ou seja, existe uma grande variedade de nanopesticidas constituídos por nanocarreadores em carbono, metal, óxido metálico, orgânicos e compostos demonstraram potencial para entregar íons (por exemplo, prata, cobre, ferro) e moléculas orgânicas efetivamente por meio de raízes, folhas e revestimentos de sementes. Como representado na **Figura 6**, alguns tipos de nanocarreadores classificados como orgânicos, base de carbono e inorgânicos.

Além desses, existem, os nanocarreadores híbridos, nos quais consistem na mistura de dois (ou mais) componentes em uma só formulação. Por exemplo, fusão de nanopartículas inorgânicas dentro de nanocarreadores orgânicos. Essa configuração híbrida tem o potencial de estender significativamente a duração da liberação do ingrediente ativo em comparação com sistemas alternativos. Além disso, pode permitir uma maior taxa de absorção pelas plantas, bem como utilizar material inorgânico como macro ou micronutrientes para as culturas não-alvo (Gomes et al., 2021).

1.8 NANOCARREADORES DE AGROQUÍMICOS "INTELIGENTES"

Os sistemas sensíveis a estímulos representam uma estratégia promissora para aprimorar o desempenho das propriedades de liberação controlada, facilitando uma liberação inteligente de pesticidas em resposta a mudanças ambientais (S. Feng et al., 2020). Nanocarreadores que reagem a estímulos como variações de temperatura, pH, luz, redox e atividade enzimática desempenham um papel crucial na ampliação da resistência das culturas aos desafios ambientais. Embora essa categoria de nanocarreadores tenha surgido recentemente, seus resultados demonstram grande potencial para o controle de pragas de importância econômica. O design desses nanocarreadores, com suas propriedades sensíveis a estímulos, envolve a incorporação de um composto ativo específico capaz de detectar e reagir a alterações no ambiente circundante (A. Singh et al., 2020).

A liberação controlada de agroquímicos, viabilizada por nanocarreadores "inteligentes", ganhou destaque apenas nos últimos dez anos. A maior parte das pesquisas tem se concentrado na capacidade de resposta ao pH, com poucos estudos explorando a resposta à luz ou a enzimas. Paralelamente, tem havido um crescente interesse em desenvolver nanopesticidas com liberação responsiva, em reação a diversos estímulos ambientais ou biológicos, tais como pH, temperatura, luminosidade, potencial redox e atividade enzimática, incluindo muitos com propriedades de resposta dupla ou tripla.

A liberação controlada sensível a estímulos pode ser obtida por meio de dois mecanismos principais: (1) uma mudança estrutural reversível ou irreversível do nanocarreador após uma estimulação externa, desencadeando a liberação; e (2) a quebra das ligações químicas e/ou de hidrogênio entre o nanocarreador e o nutriente ou pesticida após a estimulação, permitindo a liberação do nutriente ou pesticida (Camara et al., 2019a; Shen et al., 2023a).

➤ **Responsivo ao pH**

Polímeros sensíveis ao pH são empregados na formulação de nanocarreadores de pesticidas devido às suas características e capacidade de resposta facilmente controláveis. Para isso, grupos funcionais ionizáveis, como aminas, fosfatos, sulfonatos, pirimidinas e carboxilatos, são incorporados na estrutura dos transportadores para estabelecer interações iônicas ou covalentes (Shen et al., 2023a). A adição desses grupos ionizáveis aos polímeros resulta na protonação ou desprotonação em um ambiente de pH específico, o que por sua vez fortalece ou enfraquece as interações eletrostáticas que controlam a liberação dos ingredientes ativos. Alterações no pH do ambiente induzem expansão ou contração nos nanocarreadores, desencadeando a liberação dos ingredientes ativos (Iavicoli et al., 2017). Por exemplo, um material sensível ao pH contendo grupos ácidos em sua estrutura, como -COOH e SO_3H , expande quando exposto a um meio básico, enquanto um material sensível ao pH com grupos básicos, como -NH_2 , expande em meio ácido (; SHEN et al., 2023).

➤ **Responsivo a temperatura**

O desenvolvimento de nanofertilizantes e nanopesticidas sensíveis à temperatura é altamente desejável devido aos efeitos diretos e indiretos que a temperatura pode ter na eficácia desses produtos. Por exemplo, em temperaturas mais altas, como durante o dia, espera-se que ocorram perdas aceleradas de nutrientes voláteis e de ingredientes ativos de pesticidas, enquanto nanofertilizantes e nanopesticidas que liberam seus componentes de maneira mais lenta em temperaturas mais baixas podem reduzir essas perdas e aumentar a eficiência de utilização dos produtos. A resposta à temperatura é principalmente alcançada através da incorporação de polímeros sensíveis à temperatura nos transportadores, como poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAm), copolímero de óxido de etileno/óxido de propileno (F-127) e PDMAEMA (J. Yang et al., 2021; Y. Zhang et al., 2020). Esses polímeros têm uma temperatura crítica de solução na qual passam por uma transição de fase, resultando em mudanças significativas em sua solubilidade em um solvente, como água (GIL e HUDSON, 2004; Xu et al., 2017).

➤ **Responsivos a redox**

Em sistemas de nanopartículas responsivos a redox, os estímulos para a liberação dos compostos ativos são fatores endógenos presentes no organismo, como moléculas antioxidantes, incluindo a glutatona (Yi et al., 2015). Esses sistemas surgiram primeiramente na área médica, onde são utilizados para a liberação de agentes quimioterápicos. As células tumorais, por exemplo, apresentam concentrações mais elevadas de agentes redutores em comparação com células normais, o que serve como gatilho para a liberação dos compostos ativos. O mecanismo de liberação baseia-se na quebra de uma ligação dissulfeto na presença do agente redutor. Portanto, é crucial funcionalizar os nanocarreadores com grupos tiol ligados ao gatekeeper por meio de ligações dissulfeto, pois são essas ligações que serão quebradas (Song et al., 2016).

➤ **Responsivos a enzimas**

Os materiais sensíveis a enzimas têm recebido considerável atenção no campo da entrega de medicamentos devido à sua alta especificidade e seletividade em resposta a estímulos biológicos internos (Hu et al., 2014). Embora os estudos sobre o uso desses materiais na entrega de agroquímicos ainda estejam em estágio inicial, as enzimas desempenham papéis cruciais em processos biológicos e metabólicos, o que torna explorar sua utilização como gatilhos para a entrega inteligente de agroquímicos vantajosa devido à especificidade, precisão e eficiência das reações químicas que ocorrem em condições ambientais amenas (Hu et al., 2014; Zelzer & Ulijn, 2014). Polímeros sensíveis a enzimas podem interagir com o ambiente biológico, gerando respostas detectáveis por meio de amplificação de sinal em condições específicas. O desenvolvimento de nanomateriais ativados por enzimas tem sido objeto de atenção recente em várias áreas, utilizando o nível de expressão de enzimas específicas como gatilho para uma resposta mediada por enzima do nanomaterial e liberação controlada de compostos ativos de forma localizada (Hu et al., 2014; Liang et al., 2017). Diversas enzimas podem ser empregadas como gatilhos para a liberação de ingredientes ativos, visando um controle eficaz de pragas. Particularmente, há interesse nas enzimas presentes nas glândulas salivares e no intestino médio de larvas e insetos, no solo e produzidas por fungos fitopatogênicos (Akbar & Sharma, 2017; Tabatabaei et al., 2011). As glândulas salivares e o intestino médio de insetos geralmente contêm principalmente carboidrases e proteases (Liang et al., 2017). No solo, as enzimas mais comuns são urease, fosfatase alcalina, desidrogenase e catalase. Fungos fitopatogênicos frequentemente liberam enzimas como pectinases e celulases, responsáveis pela degradação das paredes celulares das plantas (Tabatabaei et al., 2011). No geral muitas enzimas podem ser

utilizadas como gatilhos para a liberação de ingredientes ativos, a fim de obter um controle eficiente de pragas (Camara et al., 2019a).

➤ **Responsivos a Luz (fotorresponsivos)**

Nanopartículas sensíveis à luz, que respondem à irradiação luminosa, possibilitam o controle preciso da liberação de moléculas ativas. Essas nanopartículas têm a capacidade de absorver luz em diversas faixas de comprimento de onda, incluindo UV, visível e infravermelho, o que as torna promissoras para aplicações na indústria agrícola, onde a abundância de radiação solar pode desencadear a liberação dos agentes ativos das partículas carregadas (Esser-Kahn et al., 2011). A exposição à luz também pode induzir alterações nas propriedades das moléculas dos polímeros, como polaridade, carga, conjugação, conformação, anfifilicidade e quiralidade óptica, entre outras, resultando em mudanças macroscópicas nas propriedades dos polímeros, como forma, adesão, propriedades ópticas, condutividade e solubilidade (Bertrand & Gohy, 2017; Cui & Del Campo, 2014). Assim, a liberação de compostos ativos desses polímeros sensíveis à luz em resposta à irradiação luminosa ocorre imediatamente após a modificação estrutural do nanocarreador no comprimento de onda específico adequado (Bertrand & Gohy, 2017).

Os sistemas controlados por luz podem ser criados incorporando moléculas fotoativas, como azobenzeno, orto-nitrobenzil, cumarina e espiropirano, em materiais à base de polímeros (Camara et al., 2019a). Essas moléculas atuam como agitadores ativados pela luz, estimulando a liberação dos compostos contidos nos materiais (Camara et al., 2019a; Shen et al., 2023a). Isso pode ocorrer de duas maneiras: por meio da degradação do polímero ou de um ligante entre o polímero e uma molécula pequena, ou por alterações na polaridade do polímero (P. Xiao et al., 2017). Os polímeros que contêm grupos como cumarina e o-nitrobenzil podem ser quebrados em moléculas menores, enquanto as estruturas de polímeros de azobenzeno e espiropirano podem ser reversivelmente induzidas na presença de um comprimento de onda específico de luz (Bertrand & Gohy, 2017; P. Xiao et al., 2017).

Por exemplo, (Z. Gao et al., 2017) e (Z. Xu et al., 2018) investigaram o uso da cumarina como um foto-gatilho para a administração de inseticidas. A cumarina apresenta propriedades vantajosas, incluindo estabilidade aprimorada das moléculas, atividade pesticida, forte fluorescência, taxas de liberação rápida, ampla faixa de comprimento de onda de absorção e alta biocompatibilidade. Em ambos os estudos, foi desenvolvido um sistema fotorresponsivo por meio de uma ligação covalente entre a cumarina e o inseticida (fipronil ou espirotetramato-enol), resultando em liberação controlada dependente da luz. Os resultados demonstraram que

a exposição à luz azul ou à luz solar levou a uma liberação eficiente do inseticida, proporcionando um controle eficaz das larvas de *Aedes* ou *Aphis craccivora*. Em contraste, a atividade inseticida foi significativamente reduzida no escuro.

Em outro trabalho, (Tong et al., 2018) propuseram o uso de nanocompósitos sensíveis a estímulos infravermelhos para evitar perdas de pesticidas hidrofílicos e aprimorar sua eficácia. Eles carregaram óxido de grafeno (GO) com hymexazol (Hy) por absorção e depois revestiram a superfície do GO com polidopamina (PDA). O nanocompósito resultante, Hy-GO@PDA, mostrou resposta ao aquecimento fototérmico quando exposto a um laser de infravermelho próximo (NIR) a 808 nm. O comportamento de liberação indicou que o Hy-GO@PDA respondia tanto ao pH quanto ao NIR, permitindo que a liberação de Hy fosse controlada pela variação do pH ou pela irradiação NIR. Sob irradiação NIR em pH 9,0, a maior liberação de Hy foi de 75% após 120 horas.

As formulações responsivas à luz têm vasto potencial na indústria agrícola. Nesse campo em crescimento, a criação de novos dispositivos de distribuição ativados pela luz solar, com uma boa relação custo-benefício, é altamente desejável para encapsular fertilizantes, pesticidas e reguladores de crescimento de plantas. No entanto, a pesquisa nessa área ainda está em estágios iniciais, e é essencial considerar cuidadosamente parâmetros como dose, estratégia de entrega e condições experimentais para avaliar esses produtos.

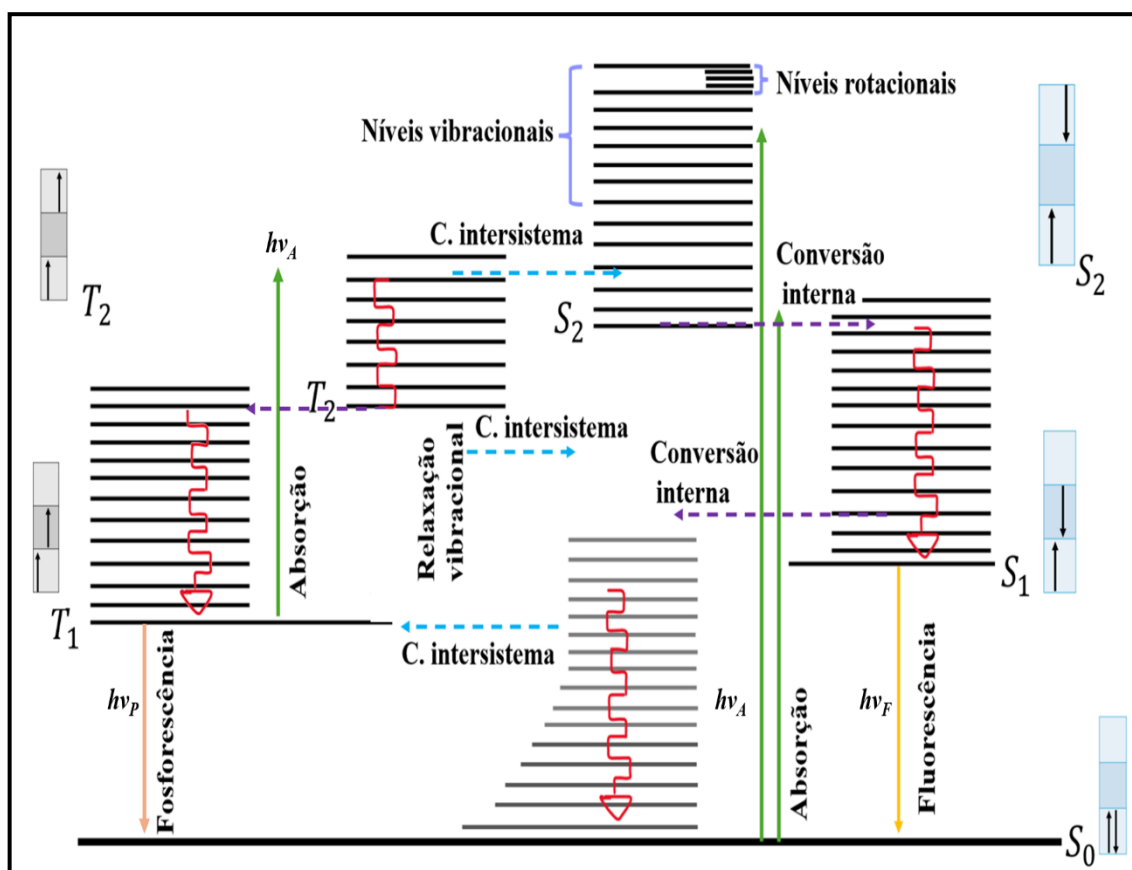
Os pesquisadores estão atualmente concentrados no desenvolvimento de nanocarreadores seguros e eficientes para a liberação sustentável de nutrientes e pesticidas, visando otimizar seus efeitos no organismo alvo e minimizar perdas. Embora os nanoagroquímicos ofereçam benefícios significativos, é crucial avaliar seus riscos ambientais, interações com organismos não-alvo e seus efeitos ao longo do tempo em condições de campo (Grillo et al., 2021).

1.9 ANÁLISE DE PLANTAS VIA ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

A fluorescência é um evento óptico que pode se manifestar em uma molécula após absorver energia luminosa ($h\nu_A$), conhecida como fótons. Durante esse processo, os fótons absorvidos aumentam a energia eletrônica da molécula para estados excitados e instáveis, os quais, ao retornarem ao estado fundamental, liberam a energia de volta ao meio na forma de luz, ou seja, fótons emitidos. O diagrama de Jablonski simplificado, apresentado na Figura 8, retrata os diferentes estados de energia de uma molécula e as transições possíveis entre eles. Para alcançar uma estabilidade maior, a molécula libera a energia absorvida por meio de processos de decaimento radiativo e/ou não-radiativo. O decaimento radiativo implica na

emissão de fótons, podendo ocorrer sob os fenômenos de fluorescência ou fosforescência ($h\nu_F$ ou $h\nu_P$). Na fluorescência, o decaimento ocorre em uma escala de tempo da ordem de nanossegundos, originando-se de níveis de energia no estado singlete, enquanto na fosforescência, o tempo de decaimento é da ordem de microssegundos à segundos e a emissão ocorre a partir de níveis de energia no estado tripleto, devido a um processo conhecido como cruzamento Intersistema. Por outro lado, os processos não-radiativos acontecem por meio de conversão interna, que inclui relaxamento vibracional, rotacional ou pela transferência de energia para moléculas vizinhas através de colisões (Lakowicz, 2006).

Figura 7 Diagrama de Jablonski. S são os níveis de energia no estado singlete, e T no estado tripleto; h é a constante de Planck e ν_A , ν_F e ν_P são as frequências das radiações da absorção, fluorescência e fosforescência.



Fonte: Autor

A absorção da radiação luminosa pelas plantas é essencial para a realização da fotossíntese, na qual moléculas como clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides desempenham um papel crucial como pigmentos fotossintéticos. A energia luminosa absorvida é então convertida em energia química durante a fotossíntese, um processo que ocorre em duas etapas: a fase fotoquímica (ou fase clara), na qual a energia luminosa é utilizada para a síntese de ATP (adenosina trifosfato) e NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido); e a

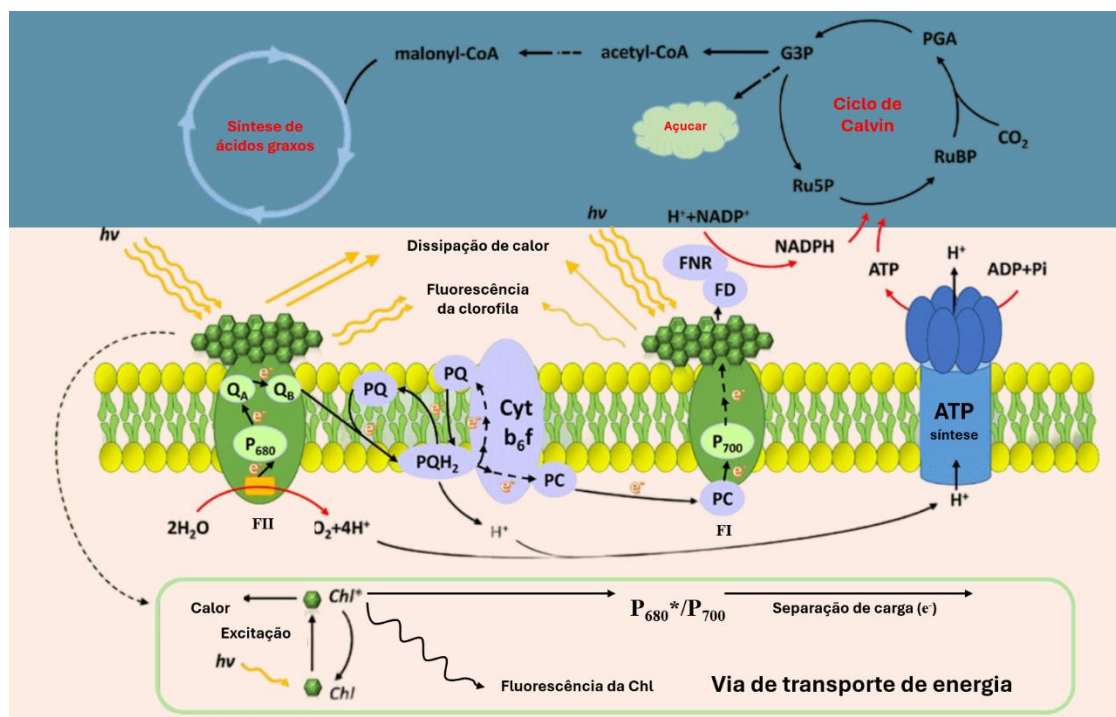
fase química (ou fase escura, também conhecida como ciclo de Calvin), onde ocorre a fixação de CO₂. Nesta etapa, o CO₂, juntamente com o ATP e NADPH produzidos anteriormente, são usados para a síntese de glicose (Kluge et al., 2015; Qi et al., 2023). Além de promover a fotossíntese, os pigmentos, ao absorverem luz ultravioleta e visível podem induzir fluorescências em duas regiões de comprimentos de onda distintas. Uma delas, entre 400 e 600 nm, está associada a diversos fluoróforos, como ácidos hidroxicinâmicos, flavonóis e outros compostos. A outra faixa, entre 600 e 800 nm, é produzida exclusivamente, *in vivo*, pela clorofila *a* (Chla).

Os pigmentos responsáveis pela absorção luminosa na etapa fotoquímica são encontrados nos tilacóides, estruturas presentes dentro dos cloroplastos, as organelas presentes nas células vegetais. Esses pigmentos são divididos em dois grupos com funções distintas: os pigmentos acessórios, como a clorofila *b* (Chlb) e os carotenoides, auxiliam na absorção da radiação luminosa e transferem a energia radiante para o Chla que é o pigmento principal, em um processo conhecido como complexo antena. Por sua vez, o pigmento principal que não apenas absorve luz do ambiente, mas também desempenha o papel crucial de capturar a energia dos pigmentos acessórios e entregá-la aos centros de reação para a ocorrência da fotossíntese (Kluge et al., 2015).

Nas plantas, a fotossíntese ocorre em dois centros de reação (Figura 9): o fotossistema II (FSII) e o fotossistema I (FSI), que interagem por meio do transporte de elétrons. A radiação luminosa é absorvida pelos pigmentos, que, junto com proteínas estruturais, formam o complexo antena. Este complexo direciona a energia para os centros de reação no que é chamado de "esquema Z". A energia amplificada pelo complexo antena inicia a cadeia de transporte de elétrons (CTE) no FSII, permitindo a transferência de elétrons da Chla excitada para a feofitina, uma porfirina semelhante à clorofila, mas sem o íon magnésio central. A feofitina inicia a CTE, seguida pelas plastoquinonas, pelo complexo citocromo e pela plastocianina. Os elétrons provenientes da fotólise da água são usados para manter a CTE, enquanto a quebra da água produz prótons de hidrogênio (H⁺), oxigênio molecular (O₂) e elétrons que estabilizam a Chla (Silveira et al., 2015). A energia dissipada na CTE promove a transferência de H⁺ do estroma para o lúmen, impulsionando a síntese de ATP por meio da ATP sintase. Esta enzima converte ADP em ATP durante o fluxo de H⁺. A CTE continua com a transferência de elétrons para o FSI por meio das plastocianinas. No FSI, a energia luminosa absorvida pelo complexo antena eleva novamente a energia dos elétrons, que são transferidos

por carreadores específicos, como ferredoxinas, para o NADP, reduzindo-o a NADPH (Kluge, Tezotto-Uliana e Silva, 2015; Silveira, Ana e Viana, 2015).

Figura 8 Esquema representativo do mecanismo de fotossíntese que consiste em processos biofísicos e bioquímicos (fase escura e fase clara).



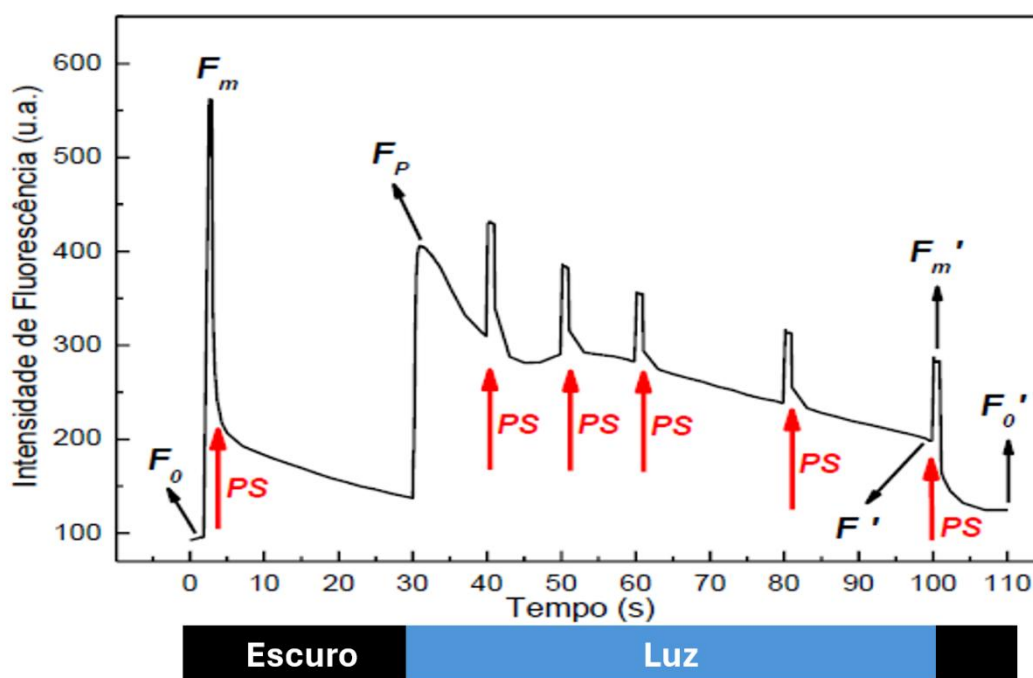
Fonte: adaptado de (Yang et al., 2020).

O estudo da fluorescência da clorofila fornece uma abordagem indireta para avaliar o estado dos aparatos fotossintéticos das plantas, pois a intensidade da fluorescência está relacionada à concentração de clorofila, à captura de fótons pelos fotossistemas e ao funcionamento dos centros de reação. Portanto, investigar a fluorescência da clorofila permite identificar como as condições ambientais afetam o desempenho bioquímico das plantas. Dado que as clorofilas são abundantes nas plantas adultas, seu estudo oferece uma alternativa viável para detectar alterações na planta causadas por fatores bióticos ou abióticos (HERPPICH, 2021; Swoczyna et al., 2022).

A técnica de imagem de fluorescência modulada por pulsos é altamente eficaz para o estudo da atividade fotossintética (Gorbunov & Falkowski, 2021). Baseia-se na captura da emissão de luz na região de 680 nm usando uma câmera CCD (Charge-Coupled Device), o que gera imagens que fornecem informações espaciais sobre a fluorescência da folha analisada. Cada pixel da imagem corresponde a um valor dessa emissão, permitindo não apenas avaliar o comportamento médio da fluorescência em toda a folha, mas também monitorar de forma precisa com resolução espacial as mudanças provocadas pelos agentes em estudo. A coleta das imagens é realizada ao longo do tempo, gerando uma fluorescência cinética característica.

Durante essa cinética, a emissão de fluorescência é medida várias vezes, começando na fase em que a planta está adaptada ao escuro, sendo monitorada após a incidência de pulsos saturantes e durante a exposição à luz. Essa medição das intensidades de emissão de fluorescência ao longo da cinética possibilita a determinação de parâmetros cruciais no estudo do funcionamento do aparato fotossintético das plantas. Embora os parâmetros possam ser medidos a cada pulso saturante, é importante realizá-los ao longo de períodos mais longos para atingir o estado estacionário de adaptação à luz (Gorbunov & Falkowski, 2021; Murchie & Lawson, 2013).

Figura 9 Cinética característica da emissão de fluorescência. F_0 : fluorescência mínima da planta adaptada ao escuro. F_m : fluorescência máxima da planta adaptada ao escuro. F_P : pico de fluorescência no início da iluminação. F' : fluorescência



Fonte: adaptado de (Ferreira, 2017).

A energia luminosa absorvida pelos fotossistemas pode ser utilizada de três formas distintas: 1) fotoquímica, onde a energia é usada na produção bioquímica durante a fotossíntese; 2) não-fotoquímica, que é a parte da energia dissipada, principalmente como calor em forma de radiação infravermelha; e 3) fluorescência, onde a energia é convertida em emissão de luz para o ambiente. Essas três formas de energia competem entre si. Quando a planta está adaptada ao escuro, a parcela de energia fotoquímica é mínima. Assim, a incidência de um pulso saturante logo após a adaptação ao escuro induz um máximo rendimento da emissão de fluorescência (F_m). Ao trabalhar com essas três vias de consumo de energia da planta, é possível estudar o

estado do aparato fotossintético por meio da análise comparativa das intensidades de emissão do FSII medidas durante a cinética (Murchie & Lawson, 2013).

Em condições de temperatura ambiente, as variações no sinal de fluorescência são atribuídas exclusivamente ao FSII. A emissão do FSI é desconsiderada porque seu sinal não contribui significativamente para a intensidade de fluorescência em comprimentos de onda inferiores a 700 nm, que é a região comumente avaliada pelos equipamentos experimentais (Murchie & Lawson, 2013).

O parâmetro mais importante e amplamente citado no estudo do estresse em plantas através da fluorescência cinética é o F_v/F_m , conforme definido na Equação 1, onde F_v representa a diferença entre a fluorescência máxima durante o primeiro pulso saturante (F_m) e a fluorescência mínima (F_0) medida antes do pulso saturante. O parâmetro F_v/F_m quantifica a eficiência máxima de funcionamento do FSII medida na fase de adaptação ao escuro da planta, fornecendo uma indicação altamente sensível da capacidade fotossintética da planta. Plantas saudáveis geralmente apresentam valores de F_v/F_m em torno de 0,83. Em condições de estresse, esse valor pode diminuir drasticamente devido a danos que desativam o FSII, indicando uma redução no processo de fotossíntese (Sommer et al., 2023; Q. Xia et al., 2023).

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{F_m - F_0}{F_m} \quad \text{Equação (1)}$$

Durante a fase da cinética em que a planta é exposta à luz, ocorre um rápido aumento na dissipação de energia, principalmente na forma de calor, o que é medido usando um parâmetro chamado supressão não-fotoquímica (NPQ, do inglês: *Non Photochemical Quenching*), conforme definido na Equação 2. É crucial notar que a intensidade da fluorescência máxima da planta na fase exposta à luz (F_m') é menor do que a fluorescência máxima na fase adaptada ao escuro (F_m). Isso ocorre porque, durante a fase clara, parte da energia é consumida pelo NPQ, ao contrário do primeiro pulso saturante, em que a planta está completamente adaptada ao escuro. Portanto, o NPQ é um parâmetro importante no estudo do aparato fotossintético das plantas, fornecendo informações essenciais sobre a dissipação de energia na forma não fotoquímica (Joliot & Finazzi, 2010; van Oort et al., 2018).

$$NPQ = \frac{F_m - F_m'}{F_m'} \quad \text{Equação (2)}$$

O coeficiente de diminuição relativa da fluorescência (Rfd), também conhecido como índice de vitalidade do FSII, é outro parâmetro que pode ser obtido pela análise da fluorescência modulada por pulsos “PAM (Pulse-Amplitude-Modulation)”, que auxilia na interpretação dos processos fotossintéticos. Ele é calculado pela Equação 3, onde FP representa o pico de

fluorescência no início da fase em que a planta é exposta à luz, e F' é a intensidade de fluorescência imediatamente antes do pulso saturante de luz (**Figura 10**). O parâmetro R_{fd} caracteriza a interação das reações dependentes da luz com as reações da fase escura e é utilizado para avaliar a atividade do ciclo de Calvin, que é a fase não luminosa da fotossíntese. Portanto, os valores de R_{fd} fornecem informações adicionais sobre o funcionamento da atividade fotossintética e estão diretamente relacionados à taxa de assimilação de CO_2 pelas folhas (Horgan & Zabkiewicz, 2008; Lichtenthaler et al., 2005; Murchie & Lawson, 2013).

$$R_{fd} = \frac{F_P - F'}{F'} \quad \text{Equação (3)}$$

A análise da fluorescência PAM da clorofila desempenha um papel fundamental na compreensão dos mecanismos de funcionamento dos nanocarreadores de herbicidas. Essa técnica oferece informações valiosas sobre a eficácia desses nanocarreadores. Ao avaliar parâmetros como F_v/F_m , NPQ e R_{fd} , podemos entender melhor como os nanocarreadores afetam a atividade fotossintética das plantas. Portanto, a análise da fluorescência PAM, emerge como uma ferramenta essencial na avaliação do potencial dos nanocarreadores, possibilitando a otimização de sua eficácia.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo deste trabalho foi sintetizar e caracterizar nanocarreadores compostos pelo polímero conjugado CNPPV (matriz polimérica foto-ativável) e ácido úsnico (princípio ativo) no desenvolvimento de um nanobioherbicida fotorresponsivo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS (NA ORDEM DOS CAPÍTULOS)

Capítulo 2 - Desenvolvimento dos nanocarreadores por nanoprecipitação (variação de quantidade de polímero):

- Padronizar a quantificação de AU e CNPPV por UV-Vis.
- Caracterizar físico-quimicamente as formulações (EE%, UV-Vis/fluorescência, AFM, DLS/PDI, e potencial zeta) e avaliar estabilidade.
- Avaliar cinética de liberação in vitro do AU e fotorresponsividade em 450 nm, ajustando modelos matemáticos.
- Avaliar efeitos do AU-livre e dos NBHs na Chl e nas *Lemna minor* (Fv/Fm, Rfd, NPQ).

Capítulo 3 - Desenvolvimento dos nanocarreadores microfluídica (comparativo e otimização):

- Desenvolver sistemas microfluídicos por impressora 3D e replicação em PMDS.
- Sintetizar NBHs por microfluídica (com e sem Tween 20) e otimizar taxa de fase para minimizar diâmetro hidrodinâmico e PDI.
- Caracterizar físico-quimicamente as formulações (UV-Vis/fluorescência, AFM, DLS, tamanho/PDI e potencial zeta) e comparar com síntese tradicional de nanoprecipitação.
- Avaliar efeitos foto-fisiológicos em *Lemna minor* (Fv/Fm, Rfd, NPQ) das NBHs (com e sem Tween 20) desenvolvidas por microfluídica.

Capítulo 4 - Avaliação da Toxicidade dos NBHs em ZFET:

- Caracterizar físico-quimicamente as formulações NBHs (UV-Vis/fluorescência, MEV, DLS/PDI, FTIR).
- Investigar toxicidade aguda e subletal dos em ZFET para AU livre e para NBHs.
- Investigar capacidade cardiotóxica e neurotóxica dos AU-livre e dos NBHs
- Investigar internalização nos NBHs em ZFET, por microscopia confocal.

3 REFERÊNCIAS

- Ahmed, I., Zakiya, A., & Fazio, F. (2022). Effects of aquatic heavy metal intoxication on the level of hematocrit and hemoglobin in fishes: A review. *Frontiers in Environmental Science*, 10, 919204. <https://doi.org/10.3389/FENVS.2022.919204/BIBTEX>
- Akbar, S. M., & Sharma, H. C. (2017). Alkaline serine proteases from *Helicoverpa armigera* : potential candidates for industrial applications. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 94(1). <https://doi.org/10.1002/arch.21367>
- Aktar, W., Sengupta, D., & Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, 2(1), 1–12. <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>
- Ashraf, M. A., & Faheem, M. (2020). Environmental toxicology and biogeochemistry of ecosystems. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(30), 37173–37175. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08699-z>
- Baliyarsingh, B., & Pradhan, C. K. (2023). Prospects of plant-derived metallic nanopesticides against storage pests - A review. *Journal of Agriculture and Food Research*, 14, 100687. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100687>
- Bertrand, O., & Gohy, J.-F. (2017). Photo-responsive polymers: synthesis and applications. *Polymer Chemistry*, 8(1), 52–73. <https://doi.org/10.1039/C6PY01082B>
- Biradar, S., Ramya, R., & Sankaranarayanan, A. (2023a). Mycobionts interactions in lichen. In *Microbial Symbionts* (pp. 215–233). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99334-0.00040-2>
- Biradar, S., Ramya, R., & Sankaranarayanan, A. (2023b). Mycobionts interactions in lichen. In *Microbial Symbionts* (pp. 215–233). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99334-0.00040-2>
- Bojarski, B., & Witeska, M. (2020). Blood biomarkers of herbicide, insecticide, and fungicide toxicity to fish—a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(16), 19236–19250. <https://doi.org/10.1007/S11356-020-08248-8/TABLES/6>
- Caldwell, C. J., Hynes, R. K., Boyetchko, S. M., & Korber, D. R. (2012). Colonization and bioherbicidal activity on green foxtail by *Pseudomonas fluorescens* BRG100 in a pest formulation. *Canadian Journal of Microbiology*, 58(1), 1–9. <https://doi.org/10.1139/w11-109>
- Camara, M. C., Campos, E. V. R., Monteiro, R. A., do Espirito Santo Pereira, A., de Freitas Proença, P. L., & Fraceto, L. F. (2019). Development of stimuli-responsive nano-based

- pesticides: emerging opportunities for agriculture. *Journal of Nanobiotechnology*, 17(1), 100. <https://doi.org/10.1186/s12951-019-0533-8>
- Chen, H., & Yada, R. (2011). Nanotechnologies in agriculture: New tools for sustainable development. *Trends in Food Science & Technology*, 22(11), 585–594. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.09.004>
- Chircov, C., Bîrcă, A. C., Dănciulescu, L. A., Neacșu, I. A., Oprea, O.-C., Trușcă, R.-D., & Andronescu, E. (2023). Usnic Acid-Loaded Magnetite Nanoparticles—A Comparative Study between Synthesis Methods. *Molecules*, 28(13), 5198. <https://doi.org/10.3390/molecules28135198>
- Chowdhary, P., Kumar, V., Kumar, S., & Hare, V. (2022). *Environmental Management Technologies*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003239956>
- Chowdhury, I., Doran, G. S., Stodart, B. J., & Wu, H. (2023). *Fate of herbicide residues in soil-Australian context: insights towards mechanism, aspects, and recent advancements*. <https://doi.org/10.21203/RS.3.RS-2685000/V1>
- Croce, N., Pitaro, M., Gallo, V., & Antonini, G. (2022a). Toxicity of Usnic Acid: A Narrative Review. *Journal of Toxicology*, 2022, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2022/8244340>
- Croce, N., Pitaro, M., Gallo, V., & Antonini, G. (2022b). Toxicity of Usnic Acid: A Narrative Review. *Journal of Toxicology*, 2022, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2022/8244340>
- Cui, J., & Del Campo, A. (2014). Photo-responsive polymers: properties, synthesis and applications. In *Smart Polymers and their Applications* (pp. 93–133). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9780857097026.1.93>
- Dara, D., & Drabovich, A. P. (2023). Assessment of risks, implications, and opportunities of waterborne neurotoxic pesticides. *Journal of Environmental Sciences*, 125, 735–741. <https://doi.org/10.1016/J.JES.2022.03.033>
- Délye, C., Jasieniuk, M., & Le Corre, V. (2013). Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. *Trends in Genetics*, 29(11), 649–658. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.06.001>
- Duke, S. O. (2024). Why are there no widely successful microbial bioherbicides for weed management in crops? *Pest Management Science*, 80(1), 56–64. <https://doi.org/10.1002/ps.7595>
- Esser-Kahn, A. P., Odom, S. A., Sottos, N. R., White, S. R., & Moore, J. S. (2011). Triggered Release from Polymer Capsules. *Macromolecules*, 44(14), 5539–5553. <https://doi.org/10.1021/ma201014n>

- Feng, S., Wang, J., Zhang, L., Chen, Q., Yue, W., Ke, N., & Xie, H. (2020). Coumarin-Containing Light-Responsive Carboxymethyl Chitosan Micelles as Nanocarriers for Controlled Release of Pesticide. *Polymers*, 12(10), 2268. <https://doi.org/10.3390/polym12102268>
- Ferreira, W. (2017). *UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA Avaliação das Alterações Fisiológicas em Plantas de Vicia faba Induzidas por Nanopartículas de Prata*.
- Filimonov, A. S., Yarovaya, O. I., Zaykovskaya, A. V., Rudometova, N. B., Shcherbakov, D. N., Chirkova, V. Yu., Baev, D. S., Borisevich, S. S., Luzina, O. A., Pyankov, O. V., Maksyutov, R. A., & Salakhutdinov, N. F. (2022). (+)-Usnic Acid and Its Derivatives as Inhibitors of a Wide Spectrum of SARS-CoV-2 Viruses. *Viruses*, 14(10), 2154. <https://doi.org/10.3390/v14102154>
- Galla, R., Ferrari, S., Ruga, S., Mantuano, B., Rosso, G., Tonello, S., Rosa, L., Valenti, P., & Uberti, F. (2023). Effects of Usnic Acid to Prevent Infections by Creating a Protective Barrier in an In Vitro Study. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3695. <https://doi.org/10.3390/ijms24043695>
- Gao, Y., Liu, W., Wang, X., Yang, L., Han, S., Chen, S., Strasser, R. J., Valverde, B. E., & Qiang, S. (2018). Comparative phytotoxicity of usnic acid, salicylic acid, cinnamic acid and benzoic acid on photosynthetic apparatus of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 128, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.04.037>
- Gao, Z., Yuan, P., Wang, D., Xu, Z., Li, Z., & Shao, X. (2017). Photo-controlled release of fipronil from a coumarin triggered precursor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27(11), 2528–2535. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.03.091>
- GIL, E., & HUDSON, S. (2004). Stimuli-responsive polymers and their bioconjugates. *Progress in Polymer Science*, 29(12), 1173–1222. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2004.08.003>
- Gomes, D. G., Pieretti, J. C., Rolim, W. R., Seabra, A. B., & Oliveira, H. C. (2021). Advances in nano-based delivery systems of micronutrients for a greener agriculture. In *Advances in Nano-Fertilizers and Nano-Pesticides in Agriculture* (pp. 111–143). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820092-6.00005-7>
- Gorbunov, M. Y., & Falkowski, P. G. (2021). Using chlorophyll fluorescence kinetics to determine photosynthesis in aquatic ecosystems. *Limnology and Oceanography*, 66(1), 1–13. <https://doi.org/10.1002/lno.11581>

- Goyal, M. R., Mishra, S. K., & Kumar, S. (2023). *Nanotechnology Horizons in Food Process Engineering*. Apple Academic Press. <https://doi.org/10.1201/9781003305408>
- Gu, D., Andreev, K., & E. Dupre, M. (2021). Major Trends in Population Growth Around the World. *China CDC Weekly*, 3(28), 604–613. <https://doi.org/10.46234/ccdcw2021.160>
- GUPTA, R., SAXENA, T., MEHRA, N., ARORA, R., & SAHGAL, A. (2023). Nanopesticides: Promising Future in Sustainable Pest Management. *JOURNAL OF ADVANCED APPLIED SCIENTIFIC RESEARCH*, 5(2). <https://doi.org/10.46947/joaasr522023515>
- Harding, D. P., & Raizada, M. N. (2015). Controlling weeds with fungi, bacteria and viruses: a review. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00659>
- HERPPICH, W. B. (2021). Chlorophyll fluorescence imaging for process optimisation in horticulture and fresh food production. *Photosynthetica*, 59(SPECIAL ISSUE), 422–437. <https://doi.org/10.32615/ps.2021.033>
- Horgan, D. B., & Zabkiewicz, J. A. (2008). Fluorescence decline ratio comparison with quantum yield ratio for plant physiological status and herbicide treatment responses. *New Zealand Plant Protection*, 61, 169–173. <https://doi.org/10.30843/nzpp.2008.61.6802>
- Hu, Q., Katti, P. S., & Gu, Z. (2014). Enzyme-responsive nanomaterials for controlled drug delivery. *Nanoscale*, 6(21), 12273–12286. <https://doi.org/10.1039/C4NR04249B>
- Iavicoli, I., Leso, V., Beezhold, D. H., & Shvedova, A. A. (2017). Nanotechnology in agriculture: Opportunities, toxicological implications, and occupational risks. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 329, 96–111. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.05.025>
- Joliot, P. A., & Finazzi, G. (2010). Proton equilibration in the chloroplast modulates multiphasic kinetics of nonphotochemical quenching of fluorescence in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(28), 12728–12733. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006399107>
- Kah, M., Kookana, R. S., Gogos, A., & Bucheli, T. D. (2018). A critical evaluation of nanopesticides and nanofertilizers against their conventional analogues. *Nature Nanotechnology*, 13(8), 677–684. <https://doi.org/10.1038/s41565-018-0131-1>
- Karimi, H., Mahdavi, S., Asgari Lajayer, B., Moghiseh, E., Rajput, V. D., Minkina, T., & Astatkie, T. (2022). Insights on the bioremediation technologies for pesticide-contaminated soils. *Environmental Geochemistry and Health*, 44(4), 1329–1354. <https://doi.org/10.1007/s10653-021-01081-z>

- Kim, K.-J., Jeong, M.-H., Lee, Y., Hwang, S.-J., Shin, H.-B., Hur, J.-S., & Son, Y.-J. (2018). Effect of Usnic Acid on Osteoclastogenic Activity. *Journal of Clinical Medicine*, 7(10), 345. <https://doi.org/10.3390/jcm7100345>
- Kluge, R. A., Tezotto-Uliana, J. V., & Silva, P. P. M. da. (2015). Physiological and Environmental Aspects of Photosynthesis. *Revista Virtual de Química*, 7(1). <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150004>
- Kremer, R. J. (2019). Bioherbicides and nanotechnology: Current status and future trends. In *Nano-Biopesticides Today and Future Perspectives* (pp. 353–366). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815829-6.00015-2>
- Krishna, B. R., Gundaju, N. R., Somasekhar, T., Elkhateeb, W., & Daba, G. (2022). Biologically active orcinol-based secondary metabolites originated from lichens. *Nova Biotechnologica et Chimica*, e1075. <https://doi.org/10.36547/nbc.1075>
- Kulinowska, M., Dresler, S., Skalska-Kamińska, A., Hanaka, A., & Strzemiński, M. (2023). Methodological Aspects of Green Extraction of Usnic Acid Using Natural Deep Eutectic Solvents. *Molecules*, 28(14), 5321. <https://doi.org/10.3390/molecules28145321>
- Lakowicz, J. (2006). Instrumentation for Fluorescence Spectroscopy. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (pp. 27–61). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4_2
- Latkowska, E., Lechowski, Z., Białczyk, J., & Pilarski, J. (2006). Photosynthesis and Water Relations in Tomato Plants Cultivated Long-Term in Media Containing (+)-Usnic Acid. *Journal of Chemical Ecology*, 32(9), 2053–2066. <https://doi.org/10.1007/s10886-006-9128-6>
- Lee, S.-M., Radhakrishnan, R., Kang, S.-M., Kim, J.-H., Lee, I.-Y., Moon, B.-K., Yoon, B.-W., & Lee, I.-J. (2015). Phytotoxic mechanisms of bur cucumber seed extracts on lettuce with special reference to analysis of chloroplast proteins, phytohormones, and nutritional elements. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 122, 230–237. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.07.015>
- Liang, Y., Guo, M., Fan, C., Dong, H., Ding, G., Zhang, W., Tang, G., Yang, J., Kong, D., & Cao, Y. (2017). Development of Novel Urease-Responsive Pendimethalin Microcapsules Using Silica-IPTS-PEI As Controlled Release Carrier Materials. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 5(6), 4802–4810. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b00208>

- Lichtenthaler, H. K., Buschmann, C., & Knapp, M. (2005). How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio R_{fd} of leaves with the PAM fluorometer. *Photosynthetica*, 43(3), 379–393. <https://doi.org/10.1007/s11099-005-0062-6>
- Luzina, O. A., & Salakhutdinov, N. F. (2016). Biological activity of usnic acid and its derivatives: Part 2. effects on higher organisms. Molecular and physicochemical aspects. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 42(3), 249–268. <https://doi.org/10.1134/S1068162016030109>
- M. Baltazar, & Surajit K. De Datta. (2023a). Biological Control and Use of Bioherbicides. In *Weed Science and Weed Management in Rice and Cereal-Based Cropping Systems* (pp. 455–507). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119737582.ch9>
- M. Baltazar, & Surajit K. De Datta. (2023b). Chemical Control. In *Weed Science and Weed Management in Rice and Cereal-Based Cropping Systems* (pp. 240–292). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119737582.ch6>
- M. Baltazar, & Surajit K. De Datta. (2023c). Herbicides. In *Weed Science and Weed Management in Rice and Cereal-Based Cropping Systems* (pp. 293–376). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119737582.ch7>
- Maccario, S., Lucotte, M., Moingt, M., Samson-Brais, É., Smedbol, É., & Labrecque, M. (2022). Impact of Soil Characteristics and Weed Management Practices on Glyphosate and AMPA Persistence in Field Crops Soils from the St. Lawrence Lowlands (Quebec, Canada). *Agronomy* 2022, Vol. 12, Page 992, 12(5), 992. <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY12050992>
- Macedo, D. C. S., Almeida, F. J. F., Wanderley, M. S. O., Ferraz, M. S., Santos, N. P. S., López, A. M. Q., Santos-Magalhães, N. S., & Lira-Nogueira, M. C. B. (2021). Usnic acid: from an ancient lichen derivative to promising biological and nanotechnology applications. *Phytochemistry Reviews*, 20(3), 609–630. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09717-1>
- Mishra, D., & Khare, P. (2021). *Emerging Nano-agrochemicals for Sustainable Agriculture: Benefits, Challenges and Risk Mitigation* (pp. 235–257). https://doi.org/10.1007/978-3-030-63249-6_9
- Montcharles da S. Pontes. (2023). Nanoformulations for controlled release of herbicides targeted to photosynthesis inhibition. *Tese Doutorado*. <https://drive.google.com/file/d/1ZdbMzMOR3ISK1a8X5eHGMT4WPJep-cp9/view>

- Murchie, E. H., & Lawson, T. (2013). Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany*, 64(13), 3983–3998. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert208>
- Ollinaho, O. I., Pedlowski, M. A., & Kröger, M. (2023). Toxic turn in Brazilian agriculture? The political economy of pesticide legalisation in post-2016 Brazil. *Third World Quarterly*, 44(3), 612–630. <https://doi.org/10.1080/01436597.2022.2153031>
- Pacanoski, Z. (2015). Bioherbicides. In *Herbicides, Physiology of Action, and Safety*. InTech. <https://doi.org/10.5772/61528>
- Paguirigan, J. A., Liu, R., Im, S. M., Hur, J.-S., & Kim, W. (2022). Evaluation of Antimicrobial Properties of Lichen Substances against Plant Pathogens. *The Plant Pathology Journal*, 38(1), 25–32. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.12.2021.0176>
- Paz De Lima, P. J., & Nery, T. de C. dos S. (2022). Diseases and deaths from pesticides in Brazil. *ISEE Conference Abstracts*, 2022(1). <https://doi.org/10.1289/isee.2022.O-SY-013>
- Paździora, W., Podolak, I., Grudzińska, M., Paśko, P., Grabowska, K., & Galanty, A. (2023). Critical Assessment of the Anti-Inflammatory Potential of Usnic Acid and Its Derivatives—A Review. *Life*, 13(4), 1046. <https://doi.org/10.3390/life13041046>
- Pelosi, C., Barriuso, E., Bedos, C., Benoit, P., Mamy, L., & Mougin, C. (2017). Fate and impact of pesticides: new directions to explore. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(8), 6841–6843. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8383-0>
- Pereira, A. K. S., Silva, L. F., Barbosa, G. A. F., Miranda, T. G., Sousa, R. R., Sarmiento, R. A., Souza, N. L. G. D., Pereira, D. H., & Cavallini, G. S. (2023). The Socio-Environmental and Human Health Problems Related to the Use of Pesticides and the Use of Advanced Oxidative Processes for Their Degradation: Brazil. *Water*, 15(8), 1608. <https://doi.org/10.3390/w15081608>
- Perković, S., Paul, C., Vasić, F., & Helming, K. (2022). Human Health and Soil Health Risks from Heavy Metals, Micro(nano)plastics, and Antibiotic Resistant Bacteria in Agricultural Soils. *Agronomy*, 12(12), 2945. <https://doi.org/10.3390/agronomy12122945>
- Perlatti, B., Souza Bergo, P. L. de, Fernandes da Silva, M. F. das G., Batista, J., & Rossi, M. (2013). Polymeric Nanoparticle-Based Insecticides: A Controlled Release Purpose for Agrochemicals. In *Insecticides - Development of Safer and More Effective Technologies*. InTech. <https://doi.org/10.5772/53355>
- Pompermaier, A., Varela, A. C. C., Mozzato, M. T., Soares, S. M., Fortuna, M., Alves, C., Tamagno, W. A., & Barcellos, L. J. G. (2022). Impaired initial development and behavior

- in zebrafish exposed to environmentally relevant concentrations of widely used pesticides. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 257, 109328. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109328>
- Pontes, M. S., Santos, J. S., da Silva, J. L., Miguel, T. B. A. R., Miguel, E. C., Souza Filho, A. G., Garcia, F., Lima, S. M., da Cunha Andrade, L. H., Arruda, G. J., Grillo, R., Caires, A. R. L., & Felipe Santiago, E. (2023). Assessing the Fate of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Carrying Usnic Acid as Chemical Cargo on the Soil Microbial Community. *ACS Nano*, 17(8), 7417–7430. <https://doi.org/10.1021/acsnano.2c11985>
- Poulsen-Silva, E., Gordillo-Fuenzalida, F., Atala, C., Moreno, A. A., & Otero, M. C. (2023). Bioactive Lichen Secondary Metabolites and Their Presence in Species from Chile. *Metabolites*, 13(7), 805. <https://doi.org/10.3390/metabo13070805>
- Priya, A., Kumar, C. B. M., Valliammai, A., Selvaraj, A., & Pandian, S. K. (2021). Usnic acid deteriorates acidogenicity, acidurance and glucose metabolism of *Streptococcus mutans* through downregulation of two-component signal transduction systems. *Scientific Reports*, 11(1), 1374. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80338-6>
- Qi, M., Zhao, Z., & Nixon, P. J. (2023). The Photosynthetic Electron Transport Chain of Oxygenic Photosynthesis. *Bioelectricity*, 5(1), 31–38. <https://doi.org/10.1089/bioe.2023.0003>
- Rajput, V. D., Singh, A., Minkina, T., Rawat, S., Mandzhieva, S., Sushkova, S., Shuvaeva, V., Nazarenko, O., Rajput, P., Komariah, Verma, K. K., Singh, A. K., Rao, M., & Upadhyay, S. K. (2021). Nano-Enabled Products: Challenges and Opportunities for Sustainable Agriculture. *Plants*, 10(12), 2727. <https://doi.org/10.3390/plants10122727>
- Rasool, S., Rasool, T., & Gani, K. M. (2022). A review of interactions of pesticides within various interfaces of intrinsic and organic residue amended soil environment. *Chemical Engineering Journal Advances*, 11, 100301. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.100301>
- Rico-Martínez, R., Rivera-Dávila, O. L., Santos-Medrano, G. E., Robles-Vargas, D., Carbajal-Hernández, A. L., Alvarado-Flores, J., Pérez-Legaspi, I. A., & Garza-León, C. V. (2022). Fate and adverse effects of pesticides in the environment. *Pesticides in the Natural Environment: Sources, Health Risks, and Remediation*, 65–119. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90489-6.00004-5>
- Roberts, J., Florentine, S., Fernando, W. G. D., & Tennakoon, K. U. (2022). Achievements, Developments and Future Challenges in the Field of Bioherbicides for Weed Control: A Global Review. *Plants*, 11(17), 2242. <https://doi.org/10.3390/plants11172242>

- Sargent, R. D., Carrillo, J., & Kremen, C. (2023). Common pesticides disrupt critical ecological interactions. *Trends in Ecology and Evolution*, 38(3), 207–210. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2022.12.002>
- Scherer Roman, E., Vargas, L., Antonio Rizzardi, M., Hall, L., Beckie, H., & Wolf, T. M. (2005). *COMO FUNCIONAM OS HERBICIDAS DA BIOLOGIA À APLICAÇÃO*.
- Shen, M., Liu, S., Jiang, C., Zhang, T., & Chen, W. (2023). Recent advances in stimuli-response mechanisms of nano-enabled controlled-release fertilizers and pesticides. *Eco-Environment & Health*, 2(3), 161–175. <https://doi.org/10.1016/j.eehl.2023.07.005>
- Silveira, M. T., Ana, P., & Viana, M. (2015). *Fisiologia Vegetal*.
- Singh, A., Dhiman, N., Kar, A. K., Singh, D., Purohit, M. P., Ghosh, D., & Patnaik, S. (2020). Advances in controlled release pesticide formulations: Prospects to safer integrated pest management and sustainable agriculture. *Journal of Hazardous Materials*, 385, 121525. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121525>
- Singh, Y., & Saxena, M. K. (2022). Insights into the recent advances in nano-bioremediation of pesticides from the contaminated soil. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.982611>
- Sommer, S. G., Han, E., Li, X., Rosenqvist, E., & Liu, F. (2023). The Chlorophyll Fluorescence Parameter Fv/Fm Correlates with Loss of Grain Yield after Severe Drought in Three Wheat Genotypes Grown at Two CO₂ Concentrations. *Plants*, 12(3), 436. <https://doi.org/10.3390/plants12030436>
- Song, Y., Li, Y., Xu, Q., & Liu, Z. (2016). Mesoporous silica nanoparticles for stimuli-responsive controlled drug delivery: advances, challenges, and outlook. *International Journal of Nanomedicine, Volume 12*, 87–110. <https://doi.org/10.2147/IJN.S117495>
- Spribille, T., Resl, P., Stanton, D. E., & Tagirdzhanova, G. (2022). Evolutionary biology of lichen symbioses. *New Phytologist*, 234(5), 1566–1582. <https://doi.org/10.1111/nph.18048>
- Sun, T. X., Li, M. Y., Zhang, Z. H., Wang, J. Y., Xing, Y., Ri, M., Jin, C. H., Xu, G. H., Piao, L. X., Jin, H. L., Zuo, H. X., Ma, J., & Jin, X. (2021). Usnic acid suppresses cervical cancer cell proliferation by inhibiting <sc>PD-L1</sc> expression and enhancing T-lymphocyte tumor-killing activity. *Phytotherapy Research*, 35(7), 3916–3935. <https://doi.org/10.1002/ptr.7103>

- Swoczyna, T., Kalaji, H. M., Bussotti, F., Mojski, J., & Pollastrini, M. (2022). Environmental stress - what can we learn from chlorophyll a fluorescence analysis in woody plants? A review. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1048582>
- Tabatabaei, P. R., Hosseiniaveh, V., Goldansaz, S. H., & Talebi, K. (2011). Biochemical characterization of digestive proteases and carbohydrases of the carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 14(2), 187–194. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2010.12.010>
- Tong, Y., Shao, L., Li, X., Lu, J., Sun, H., Xiang, S., Zhang, Z., Wu, Y., & Wu, X. (2018). Adhesive and Stimulus-Responsive Polydopamine-Coated Graphene Oxide System for Pesticide-Loss Control. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(11), 2616–2622. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05500>
- van Oort, B., Roy, L. M., Xu, P., Lu, Y., Karcher, D., Bock, R., & Croce, R. (2018). Revisiting the Role of Xanthophylls in Nonphotochemical Quenching. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 9(2), 346–352. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.7b03049>
- Varah, A., Ahodo, ;, Kwadjo, Childs, ;, Dylan Z, Comont, ;, David, Crook, ;, Laura, Freckleton, ;, Rob P, Goodsell, ;, Rob, Hicks, ;, Helen L, Hull, ;, Richard, Neve, ;, Paul, ... Ken 1. (2023). Managing herbicide resistance doesn't pay - but acting pre-emptively does. *AgriRxiv*, 2023. <https://doi.org/10.31220/AGRIRXIV.2023.00183>
- Vasarri, M., Ponti, L., Degl'Innocenti, D., & Bergonzi, M. C. (2024). Liposomal Formulation Improves the Bioactivity of Usnic Acid in RAW 264.7 Macrophage Cells Reducing its Toxicity. *Current Drug Delivery*, 21(1), 91–103. <https://doi.org/10.2174/156720182066623011112415>
- Vurro, M., Boari, A., Evidente, A., Andolfi, A., & Zermane, N. (2009). Natural metabolites for parasitic weed management. *Pest Management Science*, 65(5), 566–571. <https://doi.org/10.1002/ps.1742>
- Wahab, S., Muzammil, K., Nasir, N., Khan, M. S., Ahmad, M. F., Khalid, M., Ahmad, W., Dawria, A., Reddy, L. K. V., & Busayli, A. M. (2022). Advancement and New Trends in Analysis of Pesticide Residues in Food: A Comprehensive Review. *Plants*, 11(9), 1106. <https://doi.org/10.3390/plants11091106>
- Wang, H., Xuan, M., Huang, C., & Wang, C. (2022a). Advances in Research on Bioactivity, Toxicity, Metabolism, and Pharmacokinetics of Usnic Acid In Vitro and In Vivo. *Molecules*, 27(21), 7469. <https://doi.org/10.3390/molecules27217469>

- Wang, H., Xuan, M., Huang, C., & Wang, C. (2022b). Advances in Research on Bioactivity, Toxicity, Metabolism, and Pharmacokinetics of Usnic Acid In Vitro and In Vivo. *Molecules*, 27(21), 7469. <https://doi.org/10.3390/molecules27217469>
- Wang, H., Xuan, M., Huang, C., & Wang, C. (2022c). Advances in Research on Bioactivity, Toxicity, Metabolism, and Pharmacokinetics of Usnic Acid In Vitro and In Vivo. *Molecules*, 27(21), 7469. <https://doi.org/10.3390/molecules27217469>
- Wang, H., Xuan, M., Huang, C., & Wang, C. (2022d). Advances in Research on Bioactivity, Toxicity, Metabolism, and Pharmacokinetics of Usnic Acid In Vitro and In Vivo. *Molecules*, 27(21), 7469. <https://doi.org/10.3390/molecules27217469>
- Wong, K. K. V., Roney, M., Uddin, N., Imran, S., Gazali, A. M., Zamri, N., Rullah, K., & Aluwi, M. F. F. M. (2023). Usnic acid as potential inhibitors of BCL2 and P13K protein through network pharmacology-based analysis, molecular docking and molecular dynamic simulation. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 41(23), 13632–13645. <https://doi.org/10.1080/07391102.2023.2178506>
- Wu, L., Pan, H., Huang, W., Hu, Z., Wang, M., & Zhang, F. (2022). pH and Redox Dual-Responsive Mesoporous Silica Nanoparticle as Nanovehicle for Improving Fungicidal Efficiency. *Materials*, 15(6), 2207. <https://doi.org/10.3390/ma15062207>
- Xia, Q., Tang, H., Fu, L., Tan, J., Govindjee, G., & Guo, Y. (2023). Determination of F_v / F_m from Chlorophyll *a* Fluorescence without Dark Adaptation by an LSSVM Model. *Plant Phenomics*, 5. <https://doi.org/10.34133/plantphenomics.0034>
- Xiao, P., Zhang, J., Zhao, J., & Stenzel, M. H. (2017). Light-induced release of molecules from polymers. *Progress in Polymer Science*, 74, 1–33. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2017.06.002>
- Xie, C., Wang, C., Wang, X., & Yang, X. (2013a). Proteomics-based analysis reveals that *Verticillium dahliae* toxin induces cell death by modifying the synthesis of host proteins. *Journal of General Plant Pathology*, 79(5), 335–345. <https://doi.org/10.1007/s10327-013-0467-1>
- Xie, C., Wang, C., Wang, X., & Yang, X. (2013b). Proteomics-based analysis reveals that *Verticillium dahliae* toxin induces cell death by modifying the synthesis of host proteins. *Journal of General Plant Pathology*, 79(5), 335–345. <https://doi.org/10.1007/s10327-013-0467-1>
- Xu, X., Bai, B., Wang, H., & Suo, Y. (2017). A Near-Infrared and Temperature-Responsive Pesticide Release Platform through Core-Shell Polydopamine@PNIPAm

- Nanocomposites. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(7), 6424–6432. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b15393>
- Xu, Z., Gao, Z., & Shao, X. (2018). Light-triggered release of insecticidally active spirotetramat-enol. *Chinese Chemical Letters*, 29(11), 1648–1650. <https://doi.org/10.1016/j.cclet.2018.01.025>
- Yadav, S. L., Birla, D., Inwati, D. K., Yadav, M., Yadav, I. R., Makwana, S. N., Lakshman, & Papnai, N. (2023). Impact of Agrochemicals on Soil Biota and Ways to Mitigate it: A Review. *International Journal of Environment and Climate Change*, 13(5), 366–375. <https://doi.org/10.9734/ijecc/2023/v13i51779>
- Yang, J., Feng, J., He, K., Chen, Z., Chen, W., Cao, H., & Yuan, S. (2021). Preparation of thermosensitive buprofezin-loaded mesoporous silica nanoparticles by the sol–gel method and their application in pest control. *Pest Management Science*, 77(10), 4627–4637. <https://doi.org/10.1002/ps.6502>
- Yang, Q., Song, Z., Li, X., Hou, Y., Xu, T., & Wu, S. (2023a). Lichen-Derived Actinomycetota: Novel Taxa and Bioactive Metabolites. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8), 7341. <https://doi.org/10.3390/ijms24087341>
- Yang, Q., Song, Z., Li, X., Hou, Y., Xu, T., & Wu, S. (2023b). Lichen-Derived Actinomycetota: Novel Taxa and Bioactive Metabolites. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8), 7341. <https://doi.org/10.3390/ijms24087341>
- Yang, X., Liu, L., Yin, Z., Wang, X., Wang, S., & Ye, Z. (2020). Quantifying photosynthetic performance of phytoplankton based on photosynthesis–irradiance response models. *Environmental Sciences Europe*, 32(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s12302-020-00306-9>
- Yi, Z., Hussain, H. I., Feng, C., Sun, D., She, F., Rookes, J. E., Cahill, D. M., & Kong, L. (2015). Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles with Redox-Responsive Short-Chain Gatekeepers for Agrochemical Delivery. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7(18), 9937–9946. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b02131>
- Zelzer, M., & Ulijn, R. V. (2014). Enzyme-responsive polymers: properties, synthesis and applications. In *Smart Polymers and their Applications* (pp. 166–203). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9780857097026.1.166>
- Zhang, Y., Yan, J., Avellan, A., Gao, X., Matyjaszewski, K., Tilton, R. D., & Lowry, G. V. (2020). Temperature- and pH-Responsive Star Polymers as Nanocarriers with Potential for *in Vivo* Agrochemical Delivery. *ACS Nano*, 14(9), 10954–10965. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c03140>

Capítulo 2 - Nanobioherbicidas de CNPPV para entrega de ácido úsnico: Estabilidade, Caracterização e Liberação Fotorresponsiva

RESUMO

Vários modelos de nanocarreadores foram projetadas para facilitar o transporte e a liberação controlada de pesticidas nos últimos anos. Essas plataformas demonstraram um potencial promissor na mitigação do impacto ecológico desses produtos químicos, ao mesmo tempo em que aumentam a eficácia dos pesticidas em ambientes agrícolas. No entanto, há um conhecimento limitado sobre o destino, a toxicidade e os mecanismos de ação desses materiais no meio ambiente. O objetivo deste estudo foi fabricar nanobioherbicidas de liberação modificada encapsulando o ácido úsnico (AU) como um bioherbicida, em nanocarreadores de polímero conjugado de poly(2.5-di(hexyloxy)cyanoterephthalylidene) CNPPV. Esse polímero possui características ópticas interessantes, facilitando assim a criação de um sistema de liberação que é rastreável e responsivo à luz. Para o desenvolvimento das nanoformulações a técnica de nanoprecipitação com adaptações foi aplicada e diversos métodos físico-químicos foram empregados para a sua caracterização. Duas nanoformulações, nomeadas como nanobioherbicida 1 (NBH₁) e nanobioherbicida 2 (NBH₂), foram criadas, diferenciando-se apenas nas concentrações de polímero, em que o NBH₂ tem uma concentração cinco vezes maior que o NBH₁. Os NBHs permaneceram relativamente estáveis por mais de 90 dias à temperatura ambiente. Além disso, os nanobioherbicidas demonstraram ter índice de polidispersão (PDI) < 0,25, potencial zeta de $-6,02 \pm 3,09$ e $-20,05 \pm 4,48$ mV e a eficiência de encapsulação maior que 80 % para as ambas as formulações. As análises de microscopia de força atômica revelaram uma morfologia esférica dos NBHs. Os resultados de DLS mostraram que os NBHs apresentaram tamanho médio $148,8 \pm 76,30$ nm, e $162,6 \pm 75,56$ nm, respectivamente. Os ensaios de cinética de liberação *in vitro* foi realizada, revelando mecanismos de transporte não-Fickiano caso anômalo. Além disso, os nossos resultados também demonstraram que os NBH₂ apresentaram uma liberação fotorresponsivos, obedecendo o modelo não-Fickiano (Super Caso II) quando submetidos a irradiação da luz azul (450 nm). Avaliou-se também o efeito dos NBHs em plantas aquática (*Lemna minor*), e observou-se uma redução na eficiência quântica fotoquímica do fotosistema II e no índice de vitalidade das plantas expostas às nanoformulações, onde verificamos efeitos em função da concentração e ao longo do tempo. Em síntese, os resultados obtidos neste capítulo fornecem insights valiosos sobre o potencial dos NBHs que transportam o AU como bioherbicidas e o CNPPV como agente fotorresponsivo.

Palavras chaves: Ácido úsnico, polímero conjugado, nanobioherbicida, liberação fotorresponsiva.

ABSTRACT

Several nanocarrier designs have been developed in recent years to facilitate the transport and controlled release of pesticides. These platforms have shown promising potential to mitigate the ecological impact of these chemicals while enhancing pesticide efficacy in agricultural settings. However, limited knowledge remains regarding the environmental fate, toxicity, and mechanisms of action of such materials. This study aimed to fabricate modified-release nanobioherbicides by encapsulating usnic acid (UA) as a bioherbicide within conjugated-polymer nanocarriers of poly(2,5-di(hexyloxy)cyanoterephthalylidene) (CNPPV). Owing to its advantageous optical properties, this polymer enables a delivery system that is both traceable and light-responsive. The nanoformulations were developed via an adapted nanoprecipitation method and characterized by multiple physicochemical techniques. Two nanoformulations—nanobioherbicide 1 (NBH₁) and nanobioherbicide 2 (NBH₂)—were prepared, differing only in polymer content, with NBH₂ containing five times more polymer than NBH₁. The NBHs remained relatively stable for over 90 days at room temperature. They also exhibited polydispersity index (PDI) values < 0.25, zeta potentials of -6.02 ± 3.09 mV and -20.05 ± 4.48 mV, and encapsulation efficiencies > 80% for both formulations. Atomic force microscopy confirmed spherical morphology. Dynamic light scattering (DLS) showed mean sizes of 148.8 ± 76.30 nm and 162.6 ± 75.56 nm, respectively. In vitro release assays revealed non-Fickian (anomalous) transport mechanisms. Moreover, NBH₂ displayed light-triggered release consistent with a non-Fickian Super Case II model under blue irradiation (450 nm). The effects of NBHs were also evaluated in the aquatic plant *Lemna minor*, where a decrease in the photochemical quantum efficiency of photosystem II and in the vitality index was observed for exposed plants, with concentration- and time-dependent responses. Altogether, the results reported in this chapter provide valuable insights into the potential of UA-loaded NBHs as bioherbicides and of CNPPV as a light-responsive carrier.

Keywords: Usnic acid; conjugated polymer; nanobioherbicide; light-responsive release.

1 INTRODUÇÃO

A projeção de 9,7 bilhões de pessoas em 2050 impõe a necessidade de elevar a produtividade agrícola em mais de 70%, enquanto as ervas daninhas seguem como principal fator de perda, cerca de 31,5% da produção global, com impacto anual de aproximadamente de US\$ 32 bilhões (Fuglie, 2021; Kubiak et al., 2022; Rojas et al., 2022). Ao mesmo tempo, as formulações convencionais de pesticidas apresentam baixa eficiência de uso, com mais de 70% do ingrediente ativo perdido por deriva, volatilização e lixiviação, o que, somado ao atraso no desenvolvimento de novos herbicidas, favorece aplicações repetidas que degradam a biodiversidade, intensificam a resistência de plantas daninhas e elevam riscos à saúde via cadeia alimentar (Goswami et al., 2017; Ofosu et al., 2023; Pathak et al., 2022). Nesse cenário, formular herbicidas mais eficientes e ambientalmente seguros tornou-se urgente.

A nanotecnologia surge como via promissora para uma agricultura de precisão e mais sustentável, impulsionando os nanopesticidas por meio da integração entre nanomateriais e ciência de formulações (Pathak et al., 2022). Reconhecidos em 2019 como tecnologia emergente pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), os nanopesticidas englobam sistemas que incorporam entidades <500 nm (conforme UE/EPA) ou exibem propriedades novas atribuíveis ao tamanho reduzido, abrindo espaço para maior eficácia, controle de liberação e menor impacto ambiental (Kah et al., 2013a; D. Wang et al., 2022).

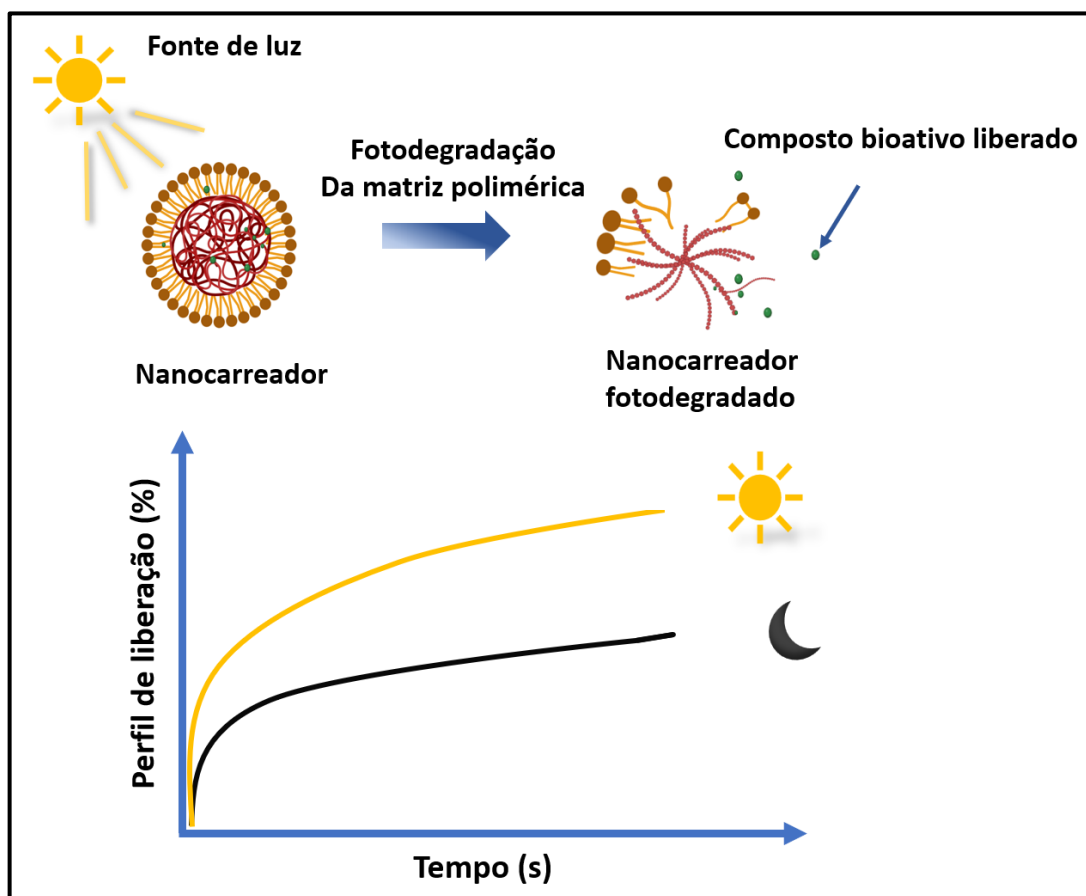
Além disso, para o crescimento das culturas os fatores ambientais (temperatura, luz, pH do solo, umidade) são essenciais e que, ao mesmo tempo, favorecem a proliferação de ervas daninhas e patógenos, impondo dupla pressão sobre o rendimento agrícola (Gougherty & Davies, 2021). Nesse contexto, sistemas de liberação responsivos a estímulos (luz, temperatura, pH, enzimas, redox, íons) e têm ganhado destaque por elevar a eficiência de uso dos pesticidas, reduzir desperdício/poluição e viabilizar entrega precisa com menor impacto sobre organismos não alvo (Shen et al., 2023b; Y. Wang et al., 2022). Exemplos recentes ilustram o avanço, por exemplo um sistema fotorresponsivo para glifosato baseado em azobenzeno que também aumenta a adesão foliar, e melhora a precisão do composto ativo (C. Chen et al., 2018); além disso, outro trabalho com nanopartículas poliméricas biodegradáveis e fotorresponsivas para 2,4-D com alta atividade herbicida e menor toxicidade a não alvos (Shan P et al., 2022), e um outro exemplo é um trabalho que desenvolveu um nanocarreador do tipo núcleo-casca

termossensível para glifosato usando nanocompósito de atapulgita/ NH_4HCO_3 /óleo de aminosílica/PVA(Chi et al., 2017).

Em particular, a fotorresponsividade tem apelo especial por viabilizar acionamento externo e doseamento fino via intensidade/tempo de iluminação (**Figura 1**), com potencial de minimizar efeitos fora-alvo quando comparada a estímulos difusos(Shen et al., 2023c).

Limitados pelos elevados custos e pela complexidade dos processos de fabricação, os sistemas de liberação controlada fotorresponsivos têm sido amplamente aplicados no campo médico, mas ainda são pouco explorados na agricultura (X. Xu et al., 2017b). Além disso, a maioria desses sistemas é acionada por radiação ultravioleta, que corresponde a apenas cerca de 5% da irradiância solar total, restringindo sua aplicabilidade em condições ambientais. Assim, ampliar a janela espectral de acionamento tende a aumentar de forma significativa o potencial de uso desses sistemas sensíveis à luz. Nesse contexto, com o avanço dos materiais fotocatalíticos, diversas composições inovadoras vêm sendo empregadas em degradação por adsorção e em conversão fotorresponsivos, oferecendo rotas promissoras para superar essas limitações (Saravanan et al., 2013, 2015).

Figura 1: Esquema representativo de funcionamento de um sistema de liberação Fotorresponsiva.



Fonte: Autor

Nesse sentido o polímero conjugado CNPPV pode ser um candidato promissor para compor sistemas fotoresponsivos acionáveis por luz visível, superando a limitação de gatilhos em UV. Do ponto de vista eletrônico, a introdução do grupo CN no PPV confere um tipo acceptor (tipo n) que favorece a transferência de elétrons sob iluminação, o que é uma via útil para acionar processos de liberação ou comutação fotoquímica (Chi et al., 2017). Além disso, CNPPV forma nanopartículas de polímero semiconductor (CPNs) altamente emissivas e estáveis em água, com desempenho foto-óptico robusto em bioimagem/fotoluminescência, e atividade fotodinâmica em bactérias, (Caires et al., 2023a). Isso evidencia o manuseio de estados excitados, o que é pré-requisitos para dispositivos de liberação ativados por luz natural e/ou LEDs (Feng et al., 2018).

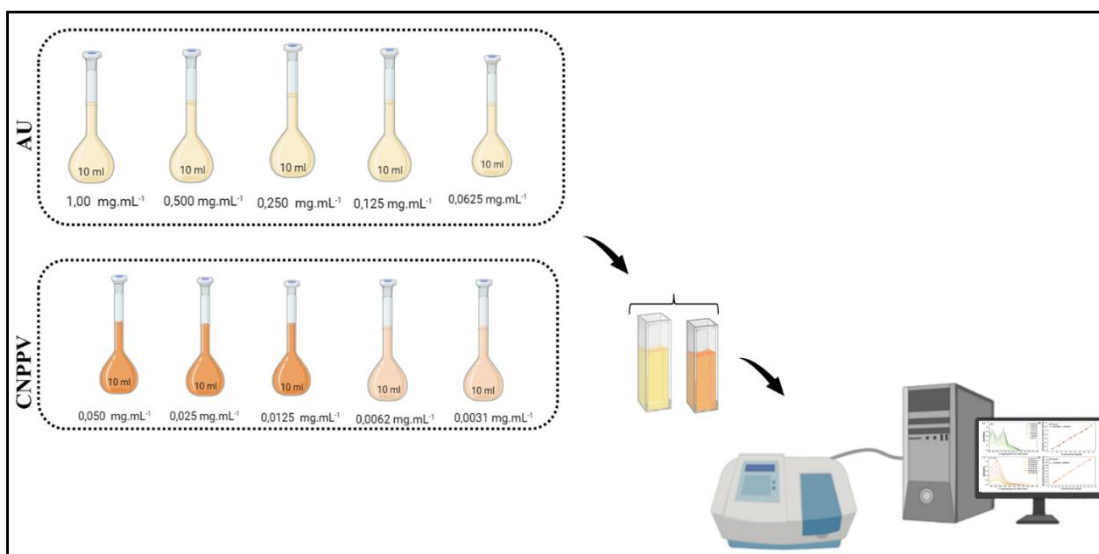
Neste contexto, propomos o ácido úsnico (AU) como candidato a bioherbicida de interesse, por ser um metabólito natural com reconhecida atividade bioativa, porém limitado por solubilidade, estabilidade e potenciais efeitos fora-alvo, quando aplicado de forma convencional, e introduzimos ele como nanobioherbicidas (NBHs) à base poliméricas de CNPPV como plataforma para carrear e rastrear o AU, explorando sua viabilidade como agroquímico fotorresponsivo. Ao combinar as propriedades ópticas do CNPPV e possibilidade de modulação por luz visível com o AU encapsulado. Portanto este capítulo busca evidenciar sistemas nanoestruturados acionáveis por luz como alternativa para aumentar seletividade e controle da ação herbicida, alinhando desempenho e segurança ambiental.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA O AU E O CNPPV

As curvas de calibração foram realizadas em espectrofotômetro absorção UV-visível. Para a análise quantitativa do ácido úsnico e do polímero conjugado CNPPV foram preparadas soluções nas concentrações de 0,0625; 0,125; 0,250; 0,500; 1,00 mg.mL⁻¹ em (água deionizada) e 0,0031; 0,0062; 0,0125; 0,025; 0,050 mg.mL⁻¹ (em água deionizada com 2,5% de THF) analisadas em triplicata, no comprimento de onda de absorção máxima do composto (290 nm) e (457 nm) respectivamente, obtido através de uma varredura desde a região do visível ao ultravioleta (UV), conforme representado na Figura 2. Após a determinação das absorbâncias nas diversas concentrações, foi construído um gráfico de absorbância em função de concentração do AU e o CN-PPV e em seguida realizou-se a análise do comportamento matemático da curva (regressão linear), utilizando o programa Origin 9.

Figura 2. Esquema representativo para padronização da metodologia analítica para o AU e o CNPPV.



Fonte: Autor

Além disso, o limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram realizadas a partir de dados obtidos com a regressão linear da curva analítica e aplicados às Equações 1 e 2, respectivamente (ANVISA, 2003).

$$LD = \frac{Dp \times 3}{IC} \quad \text{Equação (1)}$$

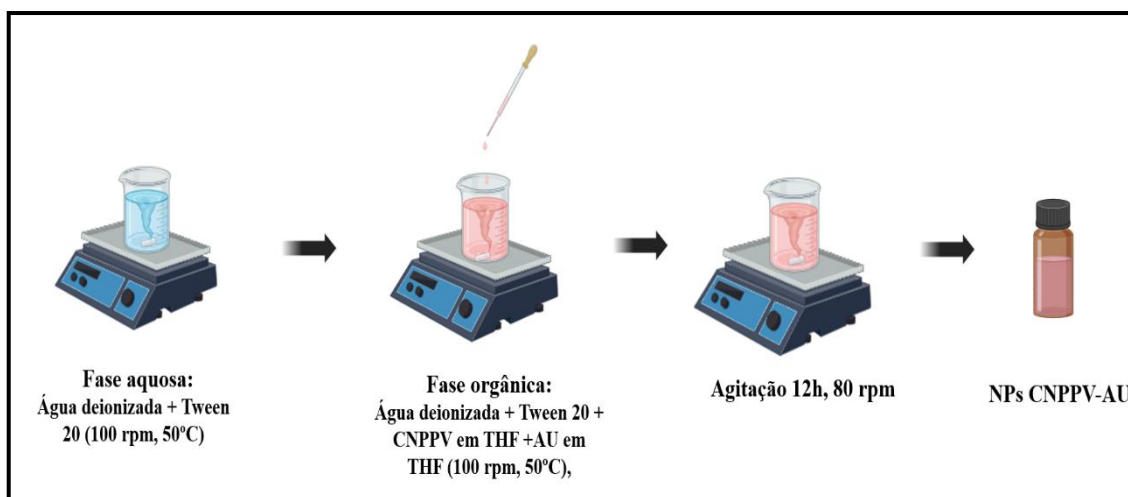
$$LQ = \frac{Dp \times 10}{IC} \quad \text{Equação (2)}$$

Onde, DP é o desvio padrão do intercepto com o eixo y e IC é a inclinação da curva analítica média.

2.2 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS

A síntese das NPs CNPPV-AU foi realizada através do método de nanoprecipitação com adaptações (Caires et al., 2023a)(Khanbeigi et al., 2015). Essa técnica consiste no preparo de duas soluções, sendo uma delas orgânica e a outra uma solução aquosa, em seguida precipita-se a solução orgânica na solução aquosa sob agitação vigorosa, conforme representado na Figura 15. Nesse sentido, a solução orgânica foi preparada misturando 1 mL da solução estoque de Ácido úsnico (AU) à 2,5 mg.mL⁻¹ com 50 µL da solução estoque de CNPPV poly(2.5-di(hexyloxy)cyanoterephthalylidene) (Sigma-Aldrich) 2,5 mg.mL⁻¹ todas em Tetraidrofurano (THF, IMPEX).

Figura 3. Esquema representativo do processo de preparo das nanopartículas NPs CNPPV-AU



Fonte: autor

A solução aquosa foi preparada utilizando 1 mL Polisorbato 20 (Tween 20, Quimesp Química) da solução estoque de 100 mg.mL⁻¹ e 30µL de NaOH da concentração estoque de 20 mg.mL⁻¹ adicionados em uma solução de 9 mL de água deionizada e mantida sob agitação magnética a 100 rpm durante 10 minutos temperatura de 50°C. Em sequência, gotejou-se 1 mL da solução orgânica contendo o CNPPV e AU nos 9 mL da solução aquosa contendo 1,2 mg.mL⁻¹ de Tween 20 e NaOH. Após adicionar a fase orgânica na aquosa sob agitação e temperatura de 50°C, esperou-se por mais 10 minutos para desligar a temperatura e reduzir a agitação para 60 rpm, a solução foi protegida da luz e ficou sob agitação constante de 80 rpm, durante 12h para evaporação completa do solvente após esse processo completou-se o volume de 10 mL com água deionizada. Essa

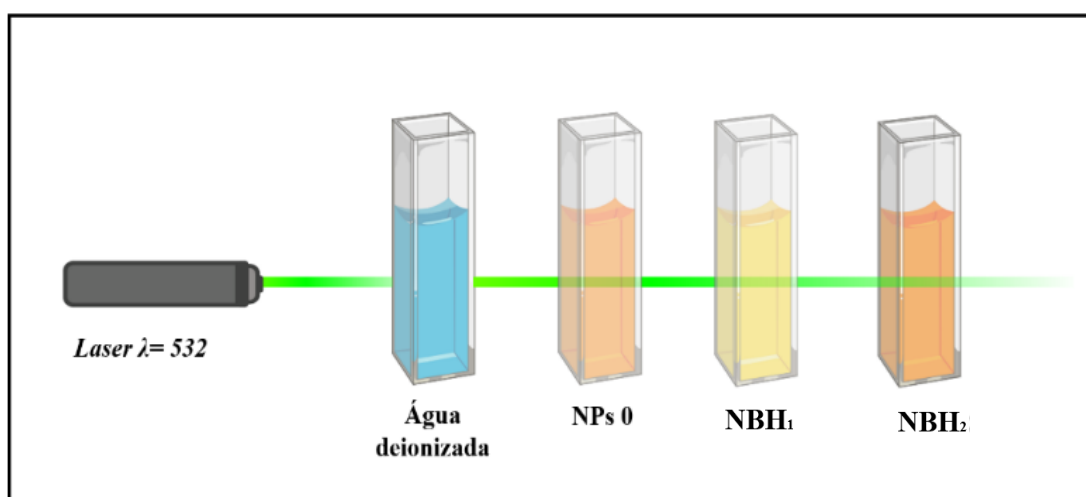
solução final foi nomeada de formulação de trabalho **NBH₁**. Ademais, também foi realizada uma síntese com 5 vezes mais concentrada de polímero e nomeada de **NBH₂**, que possui a mesma concentração de AU e os outros reagente, para os fins de caracterizações dos efeitos da concentração do polímero, na formação das nanopartículas. Adicionalmente, também foi feito uma amostra sem AU, mas com a mesma concentração de polímero que a NBH₂, nomeada de **NPs 0**. Por fim as NPs foram armazenadas em temperatura ambiente em frasco âmbar protegidas da luz.

2.2.1 ANÁLISE DO EFEITO TYNDALL

O Efeito Tyndall, nome dado em homenagem ao físico britânico Jonh Tyndall do século XIX, é definido como o “caminho de luz visível” formado quando um feixe de luz é incidido em uma solução e ocorre a dispersão das partículas coloidais na luz. A intensidade desse efeito depende do tamanho ou da concentração dessas partículas coloidais (Chen et al., 2021; Yuan et al., 2022). Quando incidido em água deionizada, feixe de laser se torna invisível sem a presença dessas partículas (XIAO et al., 2019).

Para este teste foi utilizado um feixe de laser de comprimento de onda de 532 ± 10 nm com potência máxima de 5000 mW da marca JD. Para verificar visualmente a presença de nanopartículas o laser foi incidido sobre as amostras das NPs 0, NBH₁, NBH₂, e uma amostra de água deionizada a fim de comparação, para verificação qualitativa do efeito Tyndall.

Figura 4. Análise qualitativa do Efeito Tyndall



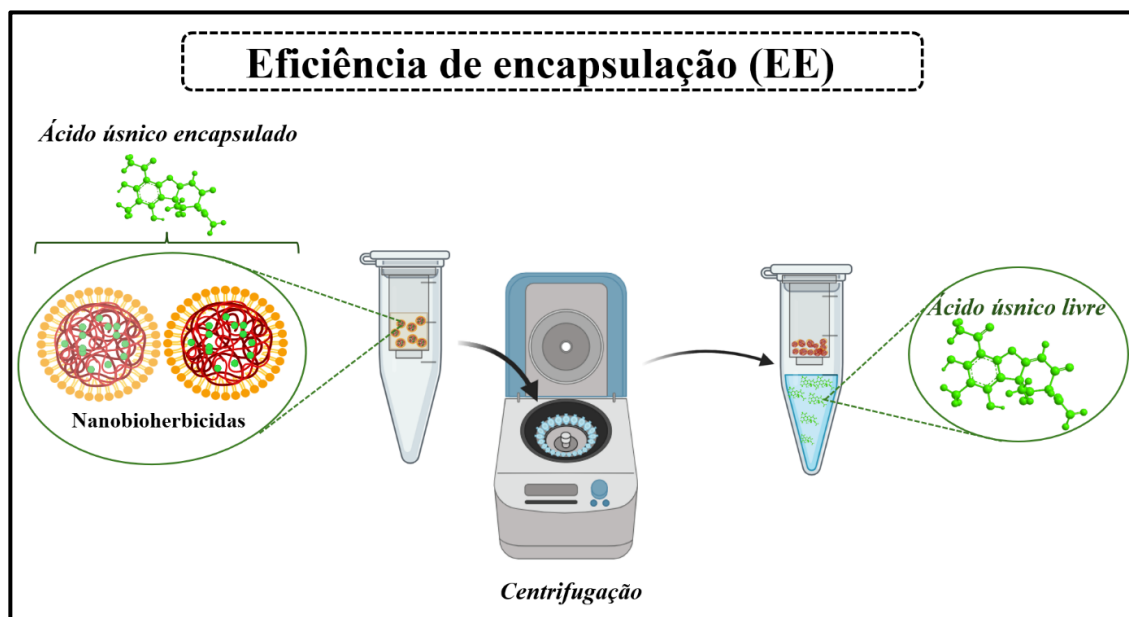
Fonte: Autor

2.3 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DO ÁCIDO ÚSNICO (AU)

O método utilizado para determinar a eficiência de encapsulação do AU e dos NBH₁ e NBH₂, foi o de ultrafiltração/centrifugação, onde 500 µL das soluções de nanopartículas são depositadas em dispositivos de ultrafiltração constituídos de celulose regenerada de 30 kDa (Microcon, Amicon, Beverly USA). Em seguida são levadas para centrífuga refrigerada (Kasvi), em temperatura de 25 °C durante 30 minutos a 5000 rpm. Após o processo de centrifugação é realizada a medida de absorbância do filtrado por espectrofotometria de absorção UV-visível (LAMBDA™ 265 UV/Vis). Apenas o AU livre atravessa a membrana, portanto a quantidade quantificada representa a concentração de AU. Dessa forma, pela diferença entre o 100% teórico do AU utilizado na síntese e a quantidade quantificada após a centrifugação é possível quantificar a eficiência de encapsulação do AU, através da equação (3).

$$EE(\%) = \frac{AU(\text{teórico}) - AU(\text{filtrado})}{AU(\text{teórico})} \times 100 \quad \text{Equação (3)}$$

Figura 5. Procedimento experimental da eficiência de encapsulação (EE)



Fonte: Autor.

2.4 CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES

A fim de avaliar a estabilidade das formulações, algumas propriedades físico-química como, tamanho (diâmetro hidrodinâmico), índice de polidispersão e potencial zeta foram estudadas em função do tempo (0, 30, 60 e 90 dias). A técnica de espectroscopia de correlação de fótons (DLS) foi empregada para avaliação do diâmetro médio das

nanopartículas, onde o movimento aleatório das nanopartículas (movimento browniano) é analisado através da interação entre o feixe de luz e a suspensão coloidal (Farkas & Kramar, 2021).

As avaliações do diâmetro hidrodinâmico médio, potencial zeta (carga superficial das nanopartículas na presença da água) e do índice de polidispersão (PDI) foram realizadas diluindo 1:100 a amostra em uma solução de NaCl 10 mM, utilizando uma cubeta de eletroforese (DTS1070) e o equipamento ZetaSizer Nano (Malvern) a um ângulo de 90° e 173° e um laser com comprimento de onda de 633nm, temperatura de 25 °C. Cada resultado foi expresso como média de três determinações. As amostras foram armazenadas em temperatura ambiente protegidas da luz durante todo o teste.

2.5 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (MFA)

Para obtenção das imagens topográficas com resolução atômica foi utilizado o equipamento AFM Workshop TT2, com o objetivo de realizar estudo da morfologia das amostras. Para realização desta análise foi depositado 10 µL das NBH1 e NBH2, diluídas de 1:10, em um substrato de silício. As soluções de NBH1 e NBH2 foram mantidas em substrato por 24h em temperatura ambiente de 25°C em placa de Petri de vidro para secagem da amostra. As varreduras da amostra foram realizadas pelo modo não-contato (vibrating), equipado com um Cantiléver de silício revestido de alumínio com uma constante de mola de 5.0N/m com frequência de 160 KHz. O tratamento e ajuste das imagens foi feito por meio do software Gwyddion (64bit) e o cálculo da distribuição de tamanho das NBH1 e NBH2 pelo *software* ImageJ.

2.6 ABSORÇÃO UV-VIS E FLUORESCÊNCIA

Para realização da medida de espectrofotometria de absorção UV-visível (LAMBDA™ 265 UV/Vis) foram utilizados 100 µL de todas as amostras (NPs 0, NBH1, NBH2 e AU livre) na concentração 0,25 mg.mL⁻¹ (referente ao AU) e foi completado o volume de 2 mL com água deionizada na cubeta. Inicialmente foi realizado o baseline (“blank”) com o diluente e em seguida coletado o espectro de absorção da amostra diluída. Posteriormente, foi realizada a medida de fluorescência (Scinco FluoroMate FS-2) das amostras, com os parâmetros apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros da medida de fluorescência

Voltagem (V)	600
Tempo de integração (ms)	20
Velocidade de digitalização (nm/min)	600
Largura da fenda de excitação (nm)	5
Largura de fenda de emissão (nm)	5
Excitação (nm)	465
Emissão (nm)	475-850

Fonte: Autor.

Para ambas medidas, UV-vis e fluorescência, foi utilizada uma cubeta de quartzo com quatro faces polidas com 10 mm de caminho óptico contendo um volume de 2 mL da amostra com água.

2.7 ESTUDO DE FOTODEGRADAÇÃO

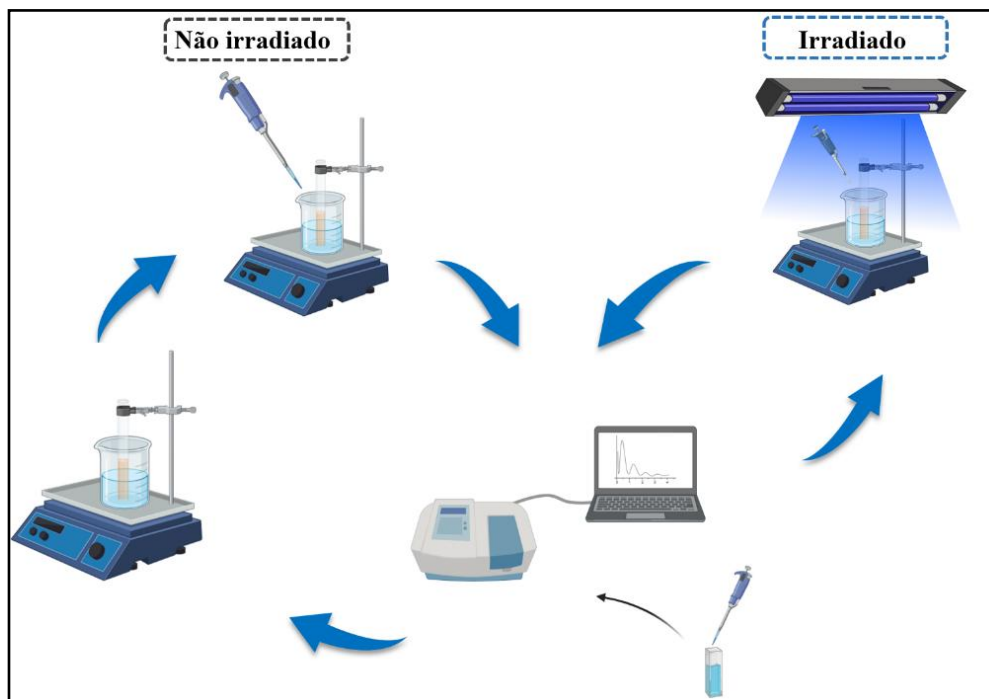
Para analisar o efeito da fotodegradação do CNPPV e dos nanocarreadores foi utilizado espectrofotômetro de absorção UV-visível (LAMBDA™ 265 UV/Vis) e o espectro fluorímetro de bancada da marca (Scinco FluoroMate FS-2). As amostras foram preparadas como indicado no item anterior (2.6). Para essa medida as amostras foram irradiadas em uma cubeta de quartzo de quatro faces polidas, em um sistema LED com luz azul (450 nm; 28,82 mW.cm⁻²), e foram medidas a absorção e fluorescência a cada 5 minutos de irradiação, durante um total de 30 minutos.

2.8 CINÉTICA DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DO ÁCIDO ÚSNICO E ANÁLISE DE FOTORRESPONSIVIDADE.

Para verificar a cinética de liberação do AU livre e associada aos nanocarreadores foi utilizado um modelo de dois compartimentos (um compartimento doador e outro aceptor), unidos por uma membrana de celulose (Spectrapore®, com poro para exclusão molecular de 1 KDa.). Os nanobioherbicidas foram dispostas no compartimento doador (1,0 mL) enquanto o compartimento receptor contendo o solvente (15 mL de água), sob agitação leve, alíquotas foram retiradas em intervalos de tempo, durante 33 h. As alíquotas foram analisadas por espectroscopia de UV-visível e devolvida no compartimento receptor, e os resultantes foram plotados em porcentagem de liberação em função do tempo.

Posteriormente foi realizado a liberação do AU sob irradiação de luz azul (450 nm; 28,82 mW.cm⁻²). De maneira semelhante como a liberação convencional foi avaliada absorbância do AU liberado no compartimento receptor, durante um período de 9 horas, foi utilizado, como grupo controle a amostra NBH₂, como ilustrado na Figura 6.

Figura 6. Modelo de dois compartimentos (um compartimento doador e outro receptor).



Fonte: Autor

A partir das curvas de liberação do AU, utilizou-se o software Origin 9.0 para testar diferentes modelos matemáticos de dissolução (Tabela 2), para ambos os experimentos, tanto irradiado quanto não irradiado. Portanto, tais modelos foram utilizados a fim de compreender como se comporta o mecanismo de liberação deste ativo. Deste modo, o melhor modelo foi selecionado a partir do coeficiente de determinação (R^2) mais próximo de 1 e calculou-se a constante de velocidade (K) e o tempo de liberação de cada nanoformulação.

Tabela 2. Modelos cinéticos aplicados ao perfil de liberação do AU.

Modelos cinéticos	Equações Matemáticas*
Cinética de ordem zero	$Q_t = Q_0 + Kt$
Cinética de primeira ordem	$\ln Q_t = \ln Q_0 + Kt$
Higuchi	$Q_t = Kt^{1/2}$
Hixson-Crowell	$Q_t = 100 [1 - (1 - k \cdot t)^3]$
Korsmeyer-Peppas	$Q_t/Q_\infty = Kt^n$

* Onde Q_t é a quantidade de Ácido úsnico liberada em um determinado tempo t , Q_∞ é a quantidade de herbicida liberada em um tempo infinito, k é a constante cinética de liberação de acordo com cada modelo e n é o expoente de liberação.

Fonte: Autor

2.9 ESTUDO DA INTERAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS E EXTRATO DE CLOROFILA

O processo de extração de clorofila (Chl) foi realizado baseando-se na metodologia proposta por Richards & Thompson (FRANCIS RICHARDS; THOMAS THOMPSON,). Foram coletadas as folhas de mostarda (*Brassica juncea*) picotadas e adicionadas 3 g de folhas em 30 mL de Metanol PA, macerando-se por 2 min. Posteriormente, a mistura foi agitada a frio por 20 min e então, centrifugada a 2000 RPM por 5 min. Para utilização dos espectrofotômetros de absorção e de fluorescência, 1 mL do extrato de clorofila foi diluído em 10 mL de Metanol PA.

Através das medidas de absorção molecular, foi calculado o teor da clorofila total [Chl a + b] das amostras de extrato de clorofila baseando-se no método de Arnon adaptado por Porra et al (Robert J. Porra, 2002). Para extração metanólica, descrito pela Equação 7, onde [Chl a + b] é a concentração das clorofilas a e b, A_{652} é a absorbância em 652 nm, $A_{665,2}$ é a absorbância em 665,2 nm e as constantes 24,23 e 3,26 são os coeficientes de extinção específica da Chl em 652 e 665,2 nm, respectivamente.

$$[\text{Chl a} + \text{b}] = 24,23 A_{625} + 3,26 A_{665,2} \quad \text{Equação (4)}$$

Para o estudo da interação nanocarreadores e o AU livre com clorofila isolada, 0,2 mL do extrato da clorofila a $8,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$ foi diluído em 2,0 mL da solução de metanol na cubeta. Posteriormente foi adicionado na solução com extrato de clorofila diferentes concentrações do AU livre e dos nanocarreadores (com base no AU 18; 35,733; 70,676;

104,942; 138,548; 203,858; 327,35; 442,18 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). Tais soluções foram analisadas no mesmo dia do preparo.

Para análise foi medido a absorbância, fluorescência e tempo de vida de cada amostra após adição do AU livre e dos nanocarreadores. Para as medidas de absorção foi utilizado o equipamento espectrofotômetro de absorção UV-visível de bancada da marca (LAMBDA™ 265 UV/Vis) e o espectrofluorímetro de bancada da marca (Scinco FluoroMate FS-2) com os parâmetros representados na tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros da medida de fluorescência da clorofila

Voltagem (V)	600
Tempo de integração (ms)	20
Velocidade de digitalização (nm/min)	600
Largura da fenda de excitação (nm)	5
Largura de fenda de emissão (nm)	5
Excitação (nm)	405
Emissão (nm)	600-800

Fonte: Autor.

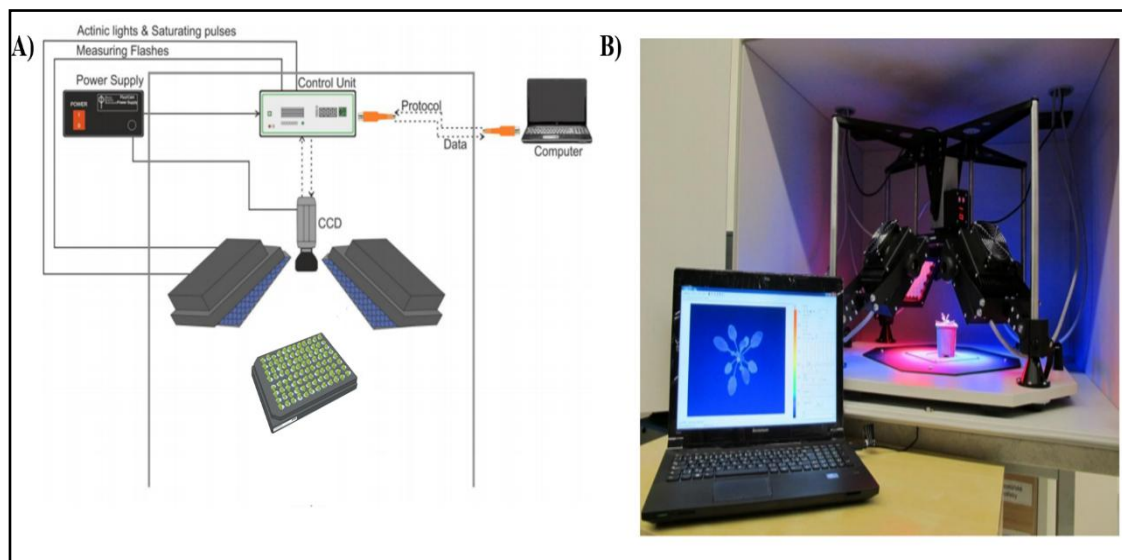
Para as medidas de tempo de vida foi utilizado o fluorímetro FluoTime 100 da PicoQuant (Berlim, Alemanha). Com sistema de detecção operando em modo de contagem de um único fóton (TCSPC, do inglês Time correlated single-photon counting). Nestes experimentos foi utilizado um laser pulsado com comprimento de onda de 630 nm como fonte de excitação para amostras de clorofila. A janela temporal utilizada para a aquisição da intensidade de fluorescência em função do tempo foi de 100 ns. Um filtro com transmitância foi utilizado antes da entrada para o monocromador de emissão, para garantir a exclusão de luz proveniente da fonte de excitação. Para todas as medidas foi usado uma cubeta de quartzo de 1 cm de espessura e 4 faces polidas.

2.10 IMAGEM DE FLUORESCÊNCIA DA *Chla Lemna Minor*

Parte dos experimentos envolvendo a técnica de imagem por fluorescência cinética, aplicada para realizar o estudo da influência dos nanocarreadores sobre o aparato fotossintético das plantas in vivo. Foi utilizado o equipamento FluorCam FC 800- O/1010-GFP - Open Version da marca Photon Systems Instruments, (Figura 7-B), que é composto basicamente por 4 painéis de LED, onde dois deles são de luz azul (445 nm) e dois de luz vermelha (620 nm) usados como fonte de excitação com intensidade de luz próxima de 3000 $\mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$ e pulso saturante de 6000 $\mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$. O equipamento possui também

uma câmera CCD que coleta a fluorescência da planta na região entre 400 - 1000 nm fornecendo imagens com resolução de 512 x 512 pixels a uma frequência máxima de 50 frames por segundo (Figura 7 A)).

Figura 7. (A) Ilustração dos componentes do FluorCam; (B) foto do equipamento Fluorcan funcionando



Fonte: adaptado de (Photon Systems, 2019)

Antes das medidas, as plantas eram adaptadas ao escuro por meia hora garantindo que todos os centros de reação nas folhas estivessem abertos. Um filtro foi utilizado para selecionar somente a emissão da clorofila (a) na região em torno de 680 nm. Além disso, as medidas foram realizadas na parte superior da planta, visto que essa é a região foliar que se encontra exposta a radiação solar em condições ambientais naturais. Vale salientar também que o protocolo aplicado na obtenção da cinética de fluorescência nos experimentos realizados utilizava média intensidade de luz incidente ($1800 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) e tempos curtos (até 190 s) para a adaptação da planta a condições de luz.

A culturas de *Lemna valdiviana* foram mantidos em uma estufa. Neste estudo foi utilizado placas de 96 poções contendo 3 a 6 plantas por poço, foi utilizado 12 poços por tratamento. Os grupos foram expostos a nanoformulações por um período de 162 h, e foram medidas as fluorescências cinéticas desses grupos a cada 24h. Além disso um novo teste variando a concentração foi realizado com 3 concentrações ($C_3=125 \text{ ppm}$, $C_2= 62,5 \text{ ppm}$ e $C_1=31,25 \text{ ppm}$), durante 48h, e as medidas foram coletadas a cada 24h.

2.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados exibidos correspondem aos valores médios associados a uma série de medições e diferentes amostras. Inicialmente os dados foram submetidos ao teste de normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Os dados que apresentaram distribuição

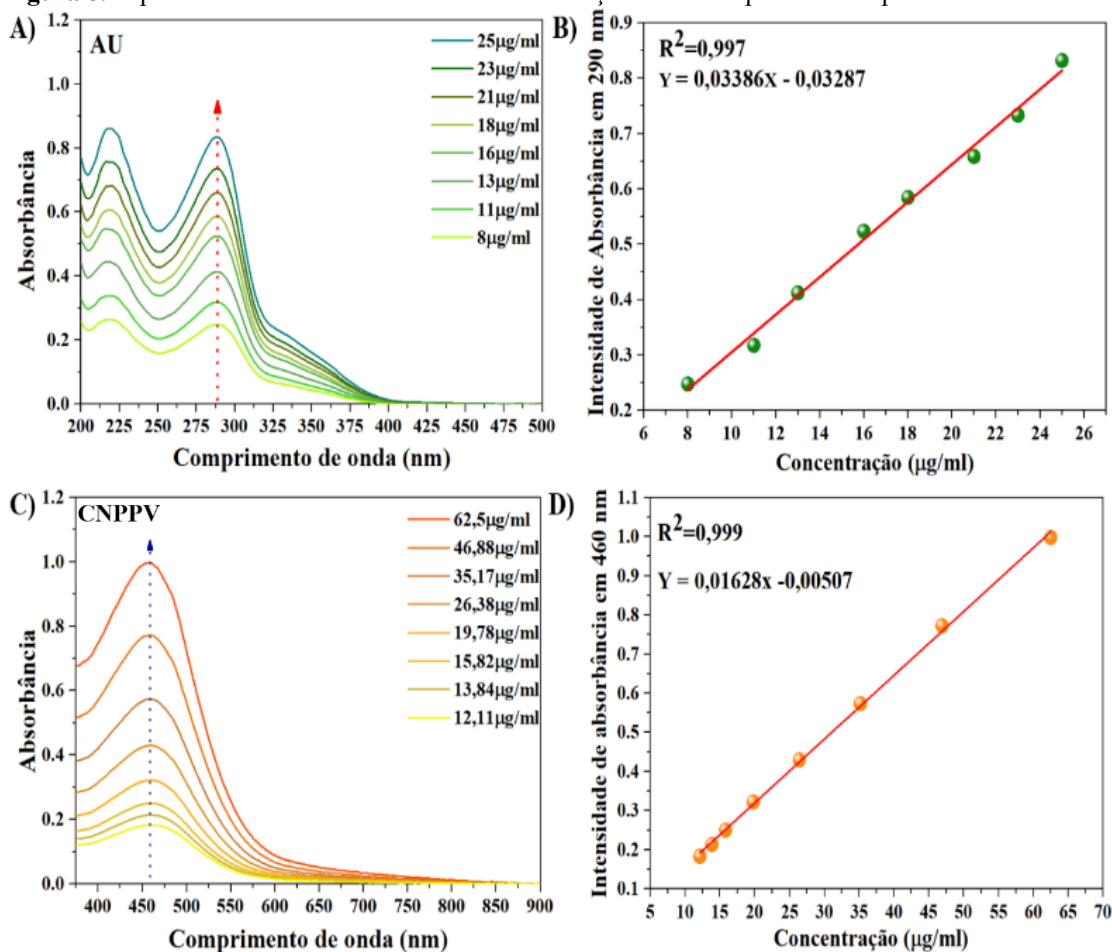
normal foram utilizados o teste-t ($p < 0,05$). Os dados que não apresentaram distribuição normal adotaram o teste não paramétrico Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). A análise estatística foi realizada utilizando dois softwares origin9.0 e Bioestat 5.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DO AU E DO CNPPV

As curvas de calibração mostram a resposta de um método analítico para quantidades conhecidas das amostras. Para o AU e o CNPPV esta metodologia já foi aplicada e comprovada sua eficiência em outros trabalhos (Morassuti et al., 2022; Siqueira-Moura et al., 2008). Para a análise quantitativa do AU e do CNPPV foram preparadas soluções nas concentrações de $8\mu\text{g/mL}$ a $25\mu\text{g/mL}$ e $12,11\mu\text{g/mL}$ a $62,5\mu\text{g/mL}$, respectivamente em seguida analisadas por espectrofotômetro UV-Visível. A média das curvas analíticas foi calculada e está apresentada na **Figura 8**, a qual possui um comportamento linear, com coeficiente de correlação linear (R^2) próximo a 1.

Figura 8. Espectros de absorbância e Curvas de calibração analíticas para o AU e para CNPPV



Fonte: Autor.

Os limites de detecção e quantificação dos métodos foram calculados de acordo com as **Equações 1 e 2**, e estão apresentados na **Tabela 4**.

Tabela 4. Limite de detecção e limite de quantificação dos métodos analíticos para o AU e o CNPPV

Limite de detecção do AU ($\mu\text{g/mL}$)	1,71
Limite de quantificação do AU ($\mu\text{g/mL}$)	5,86
Limite de detecção do CNPPV ($\mu\text{g/mL}$)	1,33
Limite de quantificação CNPPV ($\mu\text{g/mL}$)	4,45

Fonte: Autor

É importante ressaltar que as curvas de calibração são usadas para quantificar a concentração do estoque de AU e CNPPV antes das sínteses, uma vez que esses estoques estão em solução de THF que é muito volátil e, portanto, é necessário a correção das concentrações antes das sínteses de nanopartículas.

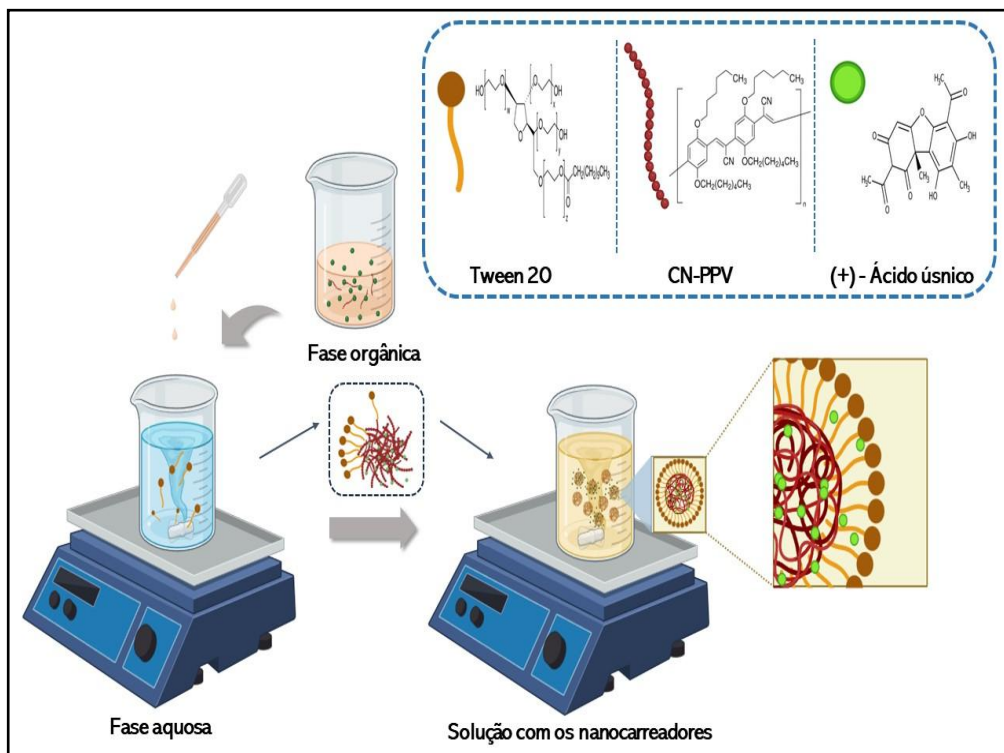
3.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS NANOCARREADORES

O AU, apesar de ser considerado um possível agente terapêutico, teve seu uso limitado devido a propriedades físico-químicas desfavoráveis. No entanto, diversas pesquisas têm investigado a incorporação do AU em transportadores nano e micro dimensionados, como sistemas de liberação de medicamentos.

A utilização de polímeros como carreadores de pesticidas não apenas aumenta a absorção e a bioatividade, mas também contribui para a redução de resíduos (Marimuthu et al., 2022; Scher, 2023; Z. Zhang et al., 2023). Adicionalmente, nanocarreadores baseados em polímeros sensíveis à luz foram desenvolvidos, proporcionando uma liberação inteligente sob demanda de pesticidas (Marimuthu et al., 2022). Nesse sentido as nanopartículas de polímeros conjugados (NPsPC) compostas de poli(2,5-di(hexiloxi)cianotereftalilideno) (CNPPV) com o surfactante polissorbato 20 (tween® 20) tem demonstrado ser uma ótima opção, uma vez que tem trabalhos relatando propriedades ópticas interessantes (Caires et al., 2023).

Em vista disso, no presente trabalho, com objetivo de aproveitar da melhor maneira as propriedades do AU e viabilizar seu uso, além de trazer novas propriedades ópticas. Foi realizado a síntese pelo método de nanoprecipitação, para formação de nanopartículas de polímero conjugado (NPs-CNPPV) junto com polissorbato 20 (tween® 20) que foi fundamental como surfactante na formação das nanopartículas. Podemos observar na

Figura 9 a representação esquemática da formação das nanopartículas de CNPPV carregando AU (NPs CNPPV-AU).



Fonte: Autor.

A síntese bem-sucedida das nanopartículas, utilizando o polímero conjugado CNPPV como veículo para o AU e o surfactante Tween 20 como estabilizador, pode ser justificada por diversas interações entre os componentes. A natureza apolar do AU provavelmente favoreceu a afinidade com as regiões hidrofóbicas do surfactante e do CNPPV, durante a formação das nanopartículas, **Figura 9**. A interação apolar, possivelmente mediada por forças de Van der Waals e tween 20, e a compatibilidade química entre CNPPV e AU, envolvendo principalmente ligações de hidrogênio, podem ter facilitado a incorporação eficiente do AU nas nanopartículas. Além disso, a presença do surfactante Tween 20 pode ter desempenhado um papel de grande importância ao formar uma camada estabilizadora em torno das partículas, evitando aglomeração e proporcionando estabilidade coloidal.

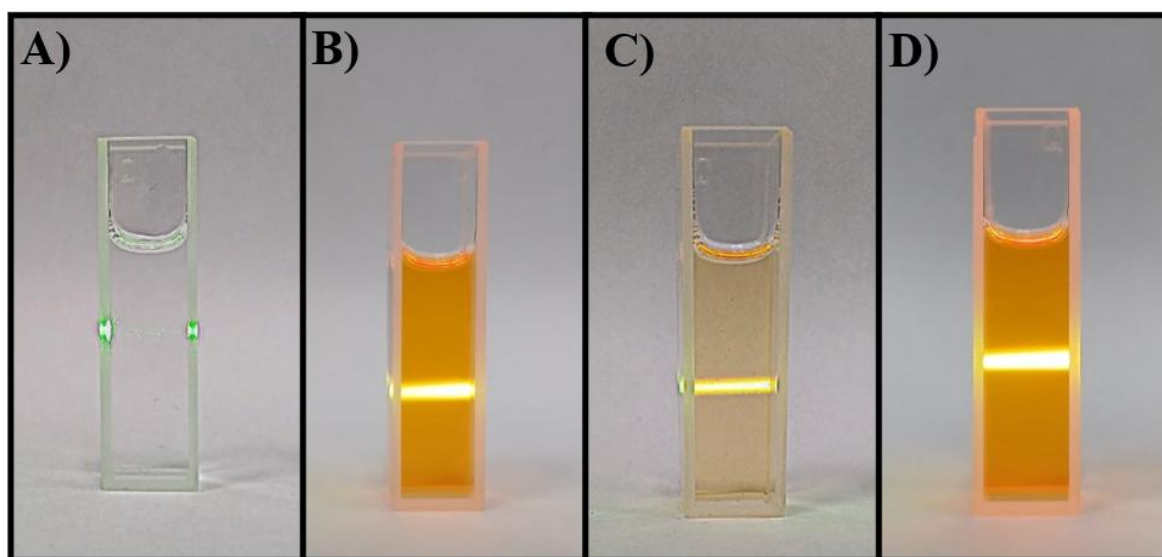
3.2.1 Verificação qualitativa do efeito Tyndall

O efeito Tyndall é utilizado para realizar uma análise qualitativa da presença de nanopartículas, pois este procedimento é capaz de caracterizar uma suspensão coloidal.

Nessa análise inicial podemos observar que o feixe de luz do laser se torna visível ao atravessar a suspensão coloidal, por causa do fenômeno de dispersão de luz causado pela dispersão das partículas.

Na **Figura 10**, os resultados mostram a obtenção de uma solução coloidal para as NPs (**Figura 10B, C e D**), diferentemente da solução de água deionizada (**Figura 10A**), na qual temos um exemplo de solução homogênea e não coloidal.

Figura 10 Avaliação do efeito Tyndall nas soluções: A) água deionizada; B) NPs 0; C) NBH₁ e D) NBH₂.

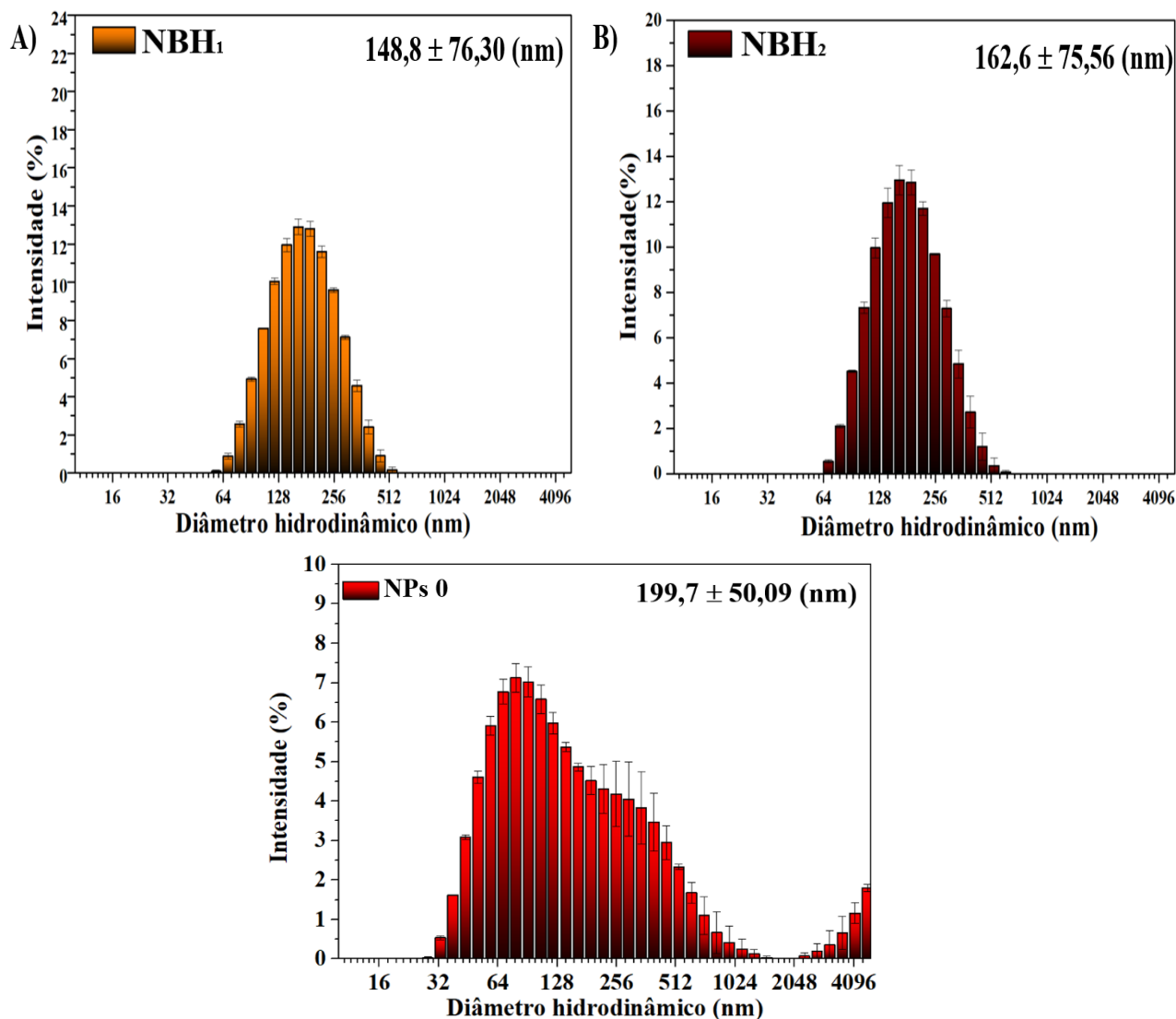


Fonte: Autor.

3.2.2 Espalhamento dinâmico de luz (EDL) e Potencial Zeta (ζ).

As Nanoformulações foram caracterizadas pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (EDL). Os NBH₁ e NBH₂ apresentam distribuições monomodais (única população de partículas), indicando uma consistência nesse aspecto, **Figura 10 A) e B)**; entretanto a NPs 0 tem a formação de agregados, e uma distribuição bimodal. As NBH₂ mostram um aumento no diâmetro para 162,6 nm, em comparação com as demais, sugerindo uma influência direta da quantidade de polímero nas propriedades de tamanho das nanopartículas e por carrear o AU.

Figura 11. Distribuição de tamanho pelo EDL, realizado a uma temperatura de 25 °C em triplicata.



Fonte: Autor.

No que se refere ao índice de polidispersividade (PDI), as NPs 0 exibem uma distribuição mais ampla (PDI = 0,410), enquanto as NBH₁ e NBH₂ apresentam valores mais baixos (PDI = 0,182 e 0,245, respectivamente) (**Tabela 5**), indicando uma distribuição mais homogênea quando comparadas. Em relação ao potencial Zeta, observamos uma variação significativa. Enquanto as NPs 0 e NBH₁ apresentam potenciais Zeta negativos de -3,00 mV e -6,02 mV, respectivamente, as NBH₂ exibem um potencial Zeta de -20,05 mV, indicando uma influência da quantidade de polímero com a interação do AU na carga superficial, uma vez que o polímero e o AU possuírem cargas superficiais negativas, o aumento da concentração de ambos eleva negativamente a carga resultante do NBH.

Tabela 5. Tamanho, índice de polidispersão (PDI) e potencial Zeta nas nanoformulações

Amostras	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Potencial Zeta (mV)	PDI
NPs 0	199,7 ± 50,09	-3,01 ± 5,94	0,410
NBH ₁	148,8 ± 76,30	-6,02 ± 3,09	0,182
NBH ₂	162,6 ± 75,56	-20,05 ± 4,48	0,245

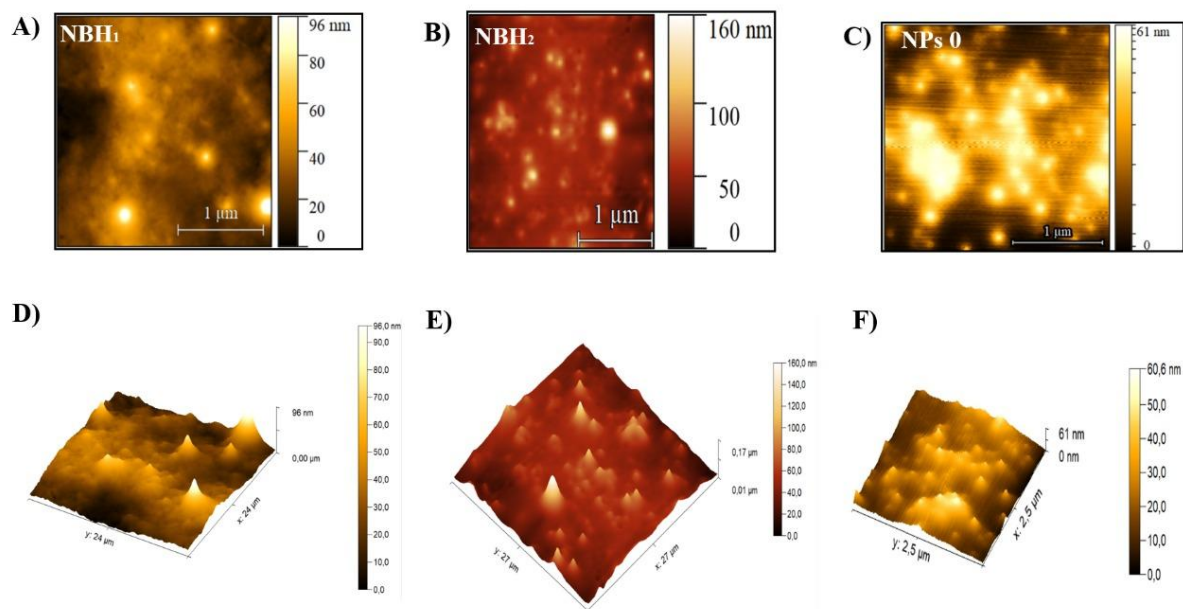
Fonte: Autor.

Nossos resultados estão condizentes com o estudo realizado por (Garg et al., 2019), onde foi realizada a síntese de nanopartículas de Goma gelana modificada com heparina (HAG) como carreadores de AU, para utilizar contra células cancerígenas A549, o diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas que eles obtiveram foram de $83,38 \pm 1,18$ nm à $155,10 \pm 0,15$ nm. Além disso eles avaliaram que o aumento na concentração de polímero também resultou um aumento do tamanho dos nanocarreadores para $196,58 \pm 1,19$ nm e potencial zeta foi de -12,6 mV, o que também está de acordo com nossos resultados, apesar de terem uma matriz polimérica diferente da estudada neste trabalho. Essa análise destaca a importância da formulação e quantidade de polímero na determinação das propriedades físicas das nanopartículas.

3.2.3 Microscopia de força atômica (MFA)

A análise por MFA foi realizada para verificação dos aspectos morfológicos e topográficos dos nanocarreadores, as imagens obtidas podem ser observadas na **Figura 12**. Na imagem mostrada nas **Figuras 12A, B e C** podemos observar os aspectos morfológicos em ambos nanocarreadores e na NPs 0, em 2D, indicando um aspecto esférico. As imagens topográficas em 3D, **Figuras 12D, E e D**, reforçam que o NBH₁ e NBH₂, respectivamente, apresentam formato esférico, todavia, a distribuição de tamanho não é muito uniforme em concordância com os resultados de DLS.

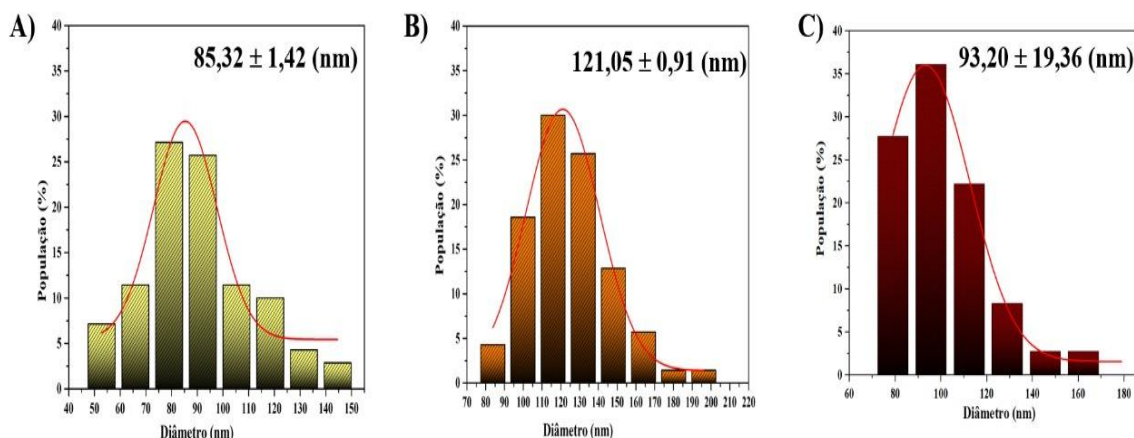
Figura 12. Imagens do Microscópio de Força Atômica: A) B) e C) Imagem morfológica do NBH₁, NBH₂ e NPs 0 respectivamente; D), E) e F) Imagem topográfica das NBH₁, NBH₂ e NPs 0.



Fonte: Autor.

A partir das imagens 2D, foi feito o cálculo da distribuição de tamanho representado na Figura 12A e B, para o cálculo da distribuição de tamanho foram utilizadas 100 partículas de diferentes imagens 2D, feita da mesma amostra.

Figura 13. Distribuição de tamanho A), B) e C) dos NBH₁, NBH₂ e NPs



Fonte: Autor.

Note que, existe uma variação de 50 a 150 nm para NBH₁ com média de 85, 32 nm, e de 80 a 200 nm para NBH₂, com diâmetro médio de 121,05 nm. Esse valor maior (~ 42%) para a NBH₂ é esperado visto que utilizamos 5 vezes mais polímero que o NBH₁

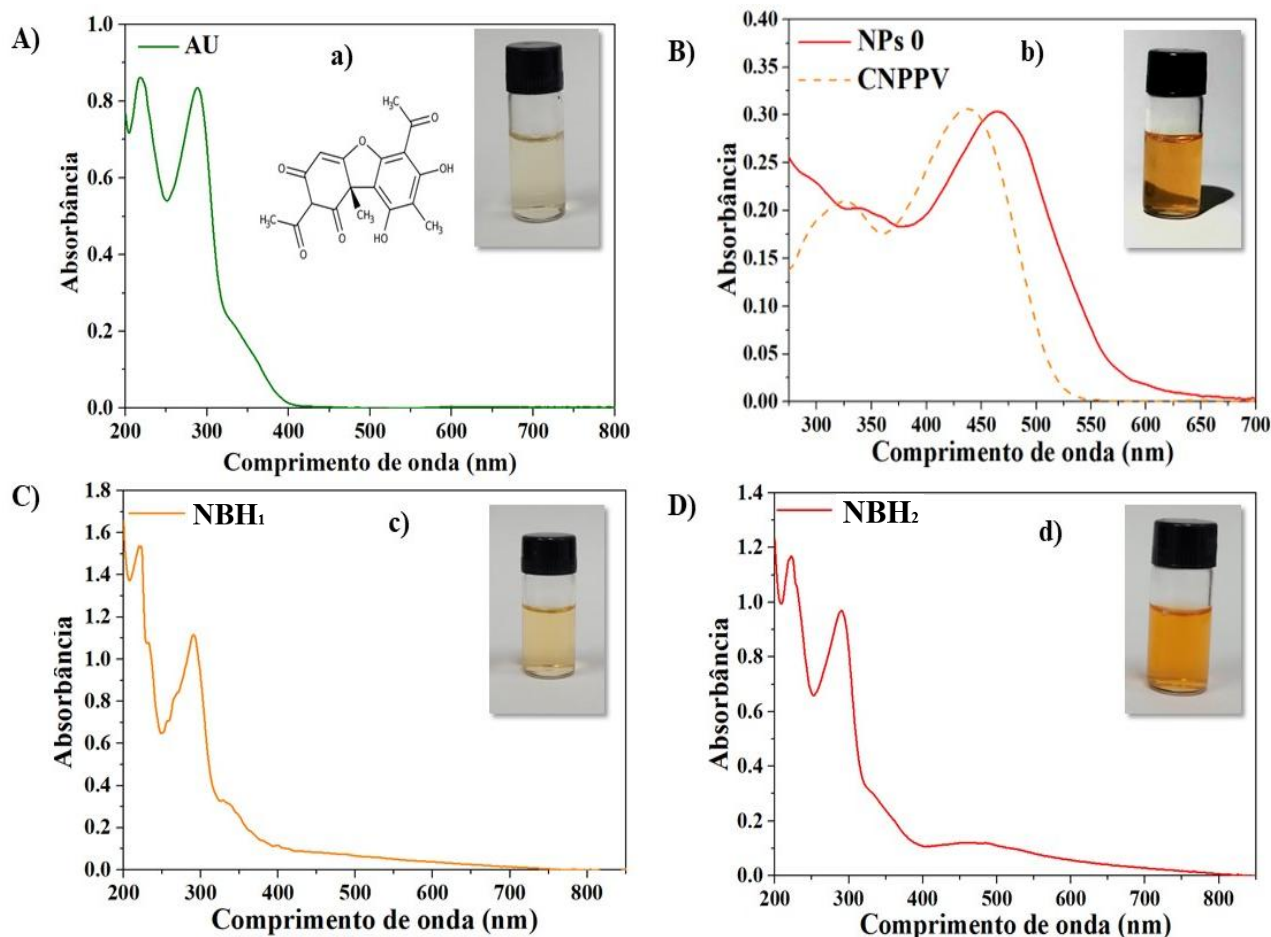
para fazer as sínteses, já a NPs o se mostrou com menor tamanho, possivelmente por não ter AU. Entretanto a formação e o tamanho das nanopartículas poliméricas podem ser influenciados por outros fatores além da concentração do polímero, e material nanoencapsulado. A escolha do solvente usado no processo de nanoprecipitação desempenha um papel crucial no controle do tamanho das nanopartículas (Schmitt et al., 2022). Aumentar a concentração da solução da matéria-prima pode aumentar a taxa de formação de nanopartículas, resultando em partículas maiores (Tanaka et al., 2023). Além disso, o volume da solução de matéria-prima também afeta a taxa de formação e o diâmetro da partícula (Schneider et al., 2013).

É importante notar que esses tamanhos são ligeiramente menores em ambos os nanocarreadores do que os resultados do DLS, visto que para fazer essas medidas do MFA as nanopartículas passam por um processo de secagem e, portanto, não possuem um raio hidrodinâmico, o que consequentemente leva um tamanho reduzido.

3.2.5 Absorção UV-vis e fluorescência

A análise das bandas de absorção UV-vis e fluorescência oferece uma visão detalhada das propriedades ópticas das nanopartículas desenvolvidas, com destaque para a influência da formação das nanopartículas no espectro visível. Na **Figura 14 A** podemos observar no espectro de absorção, duas bandas características do AU na faixa de 200 a 400 nm, quando solubilizado em uma solução aquosa, levemente alcalina. Também é importante notar o deslocamento para o vermelho das bandas de absorção do CNPPV, de 550 para 700 nm, **Figura 14B**, ao formar nanopartículas, o que pode indicar modificações na conjugação molecular ou nas interações intermoleculares, mas também pode estar relacionado por estarem solubilizados em meios diferentes; água para NPs 0 e THF para o CNPPV.

Figura 14. Espectros de absorção do AU, figura A) e a foto da solução insert a) espectro de absorção do CNPPV em THF e da NPs 0 figura B) e a foto da solução de NPs 0 figura b), espectro de absorção da NBH₁ em água figura C) e a foto da solução de NBH₁ figura c), espectro de absorção da NBH₂ em água figura D) e a foto da solução de NBH₂ figura d).



Fonte: Autor.

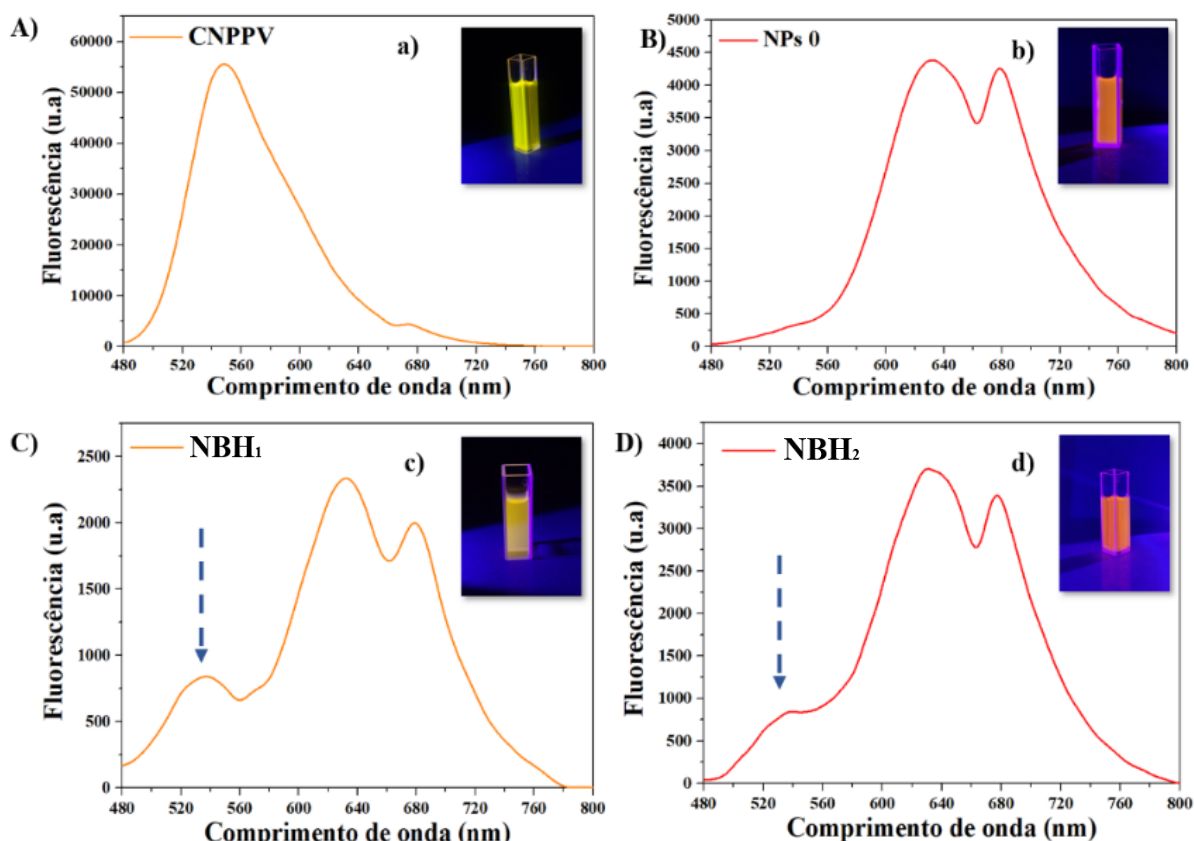
Os espectros de absorção da NBH₁ e da NBH₂, são muito semelhantes, possuem o espectro do AU no ultravioleta, mas possuem a adição de uma banda no espectro visível que se estende até 700 nm, na NBH₂ é mais evidente a banda do CNPPV, que surge quando a banda no AU acaba, na NBH₂, isso ocorre por ter uma concentração de CNPPV 5 vezes maior. Além das duas formulações possuírem um grande alargamento das bandas chegando entorno de 750 e 800 nm. Outra característica importante da formação dos nanocarreadores é que a segunda banda (280 ~ 290 nm), característica do AU, fica menor que primeira (230nm), essa pode ser mais uma evidência interação entre o AU e CNPPV na formação de nanopartículas.

A fluorescência do CNPPV em THF, **Figura 15A**, inicialmente com máximo de emissão na região do amarelo (~ 560nm), sugere alterações nas propriedades ópticas do polímero conjugado, quando comparado com as nanoformulações. Quando formadas as

nanopartículas (NPs 0), **Figura 15B**, a mudança para duas bandas entre 480 e 800 nm, indica uma modificação nas propriedades luminescentes, indicando a complexidade das interações durante a formação das nanopartículas.

O carregamento do AU (NBH₁ e NBH₂) , **Figura 15 C) e D)**, acentua essa mudança, com a emergência de uma terceira banda em torno de 525 nm. Isso pode ser atribuído a alterações nos estados excitados do CNPPV devido à presença do AU, indicando uma influência significativa nas transições eletrônicas envolvidas na fluorescência. A mudança na fluorescência é um indício direto das modificações na estrutura e nas propriedades eletrônicas das nanopartículas, afetando os estados excitados e a emissão de luz visível.

Figura15. Espectros de fluorescência A), B), C) e D), do CNPPV e das NPs 0, NBH₁ e NBH₂ respectivamente, inserts a), b) c) e d) fotos das respectivas soluções sob irradiação UV .



Fonte: Autor.

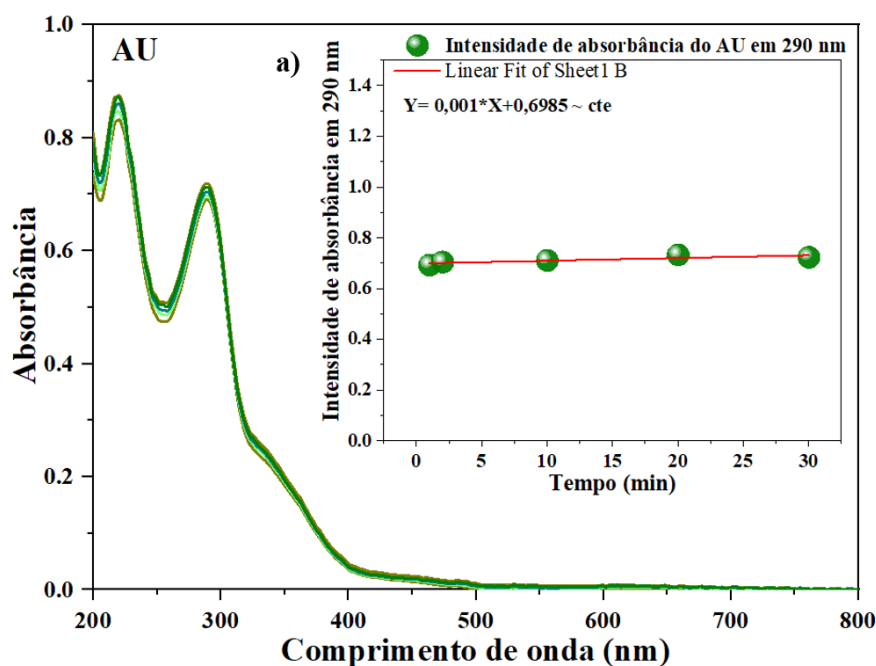
Essas modificações nas bandas de fluorescência e absorção estão diretamente ligadas em como o polímero se dobra, durante a formação de nanopartículas, permitindo que mudanças eletrônicas novas ocorram e consequentemente modificando a interação com luz (Caires et al., 2023b). As características úteis dos polímeros conjugados são altamente dependentes da sua composição química, grau de polimerização, conformação

e comprimento da cadeia lateral (Schwartz, 2003; Urbano et al., 2018a). Vale ressaltar que, diferentemente de moléculas convencionais, os polímeros conjugados são macromoléculas, como consequência, suas propriedades eletrônicas e ópticas dependem da conformação física das cadeias poliméricas e de seu empacotamento, que pode variar em solução, filmes e estruturas de nanopartículas (Fedatto Abelha & Rodrigues Lima Caires, 2021; Grey et al., 2006; L. Wang et al., 2018).

3.2.6 Fotodegradação

A investigação da fotodegradação sob irradiação de luz azul é um estudo importante sobre possíveis mecanismos subjacentes à fotorresponsividade dos nanocarreadores desenvolvidos. Ao considerar o espectro de absorção do AU, na **Figura 16**, note que ele praticamente não absorve em 450 nm, resultando na ausência de degradação durante os 30 minutos de irradiação, figura a).

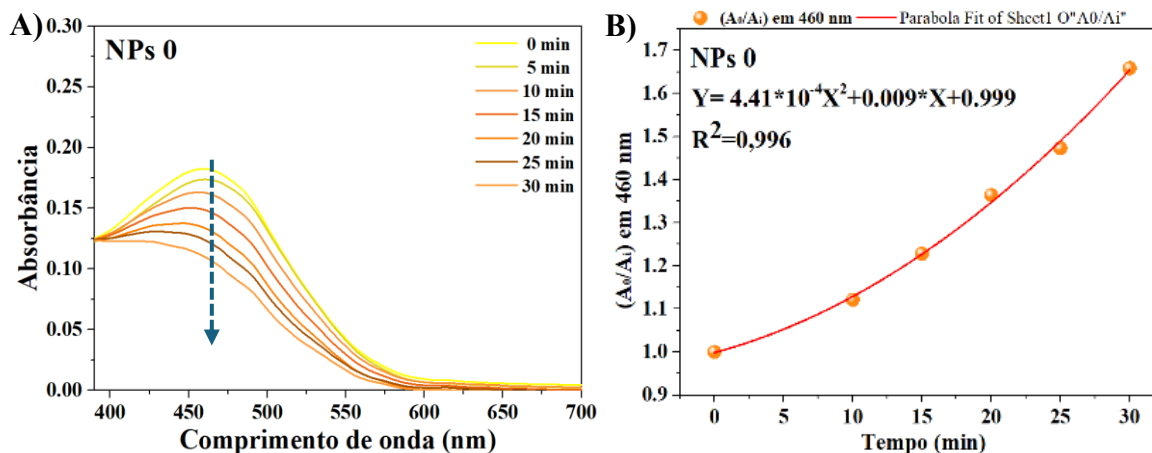
Figura 16. Espectros de Absorbância do AU A) sobre irradiação (450 nm) a) intensidade de Absorbância do AU em 290 nm ao longo do tempo de irradiação.



Fonte: Autor.

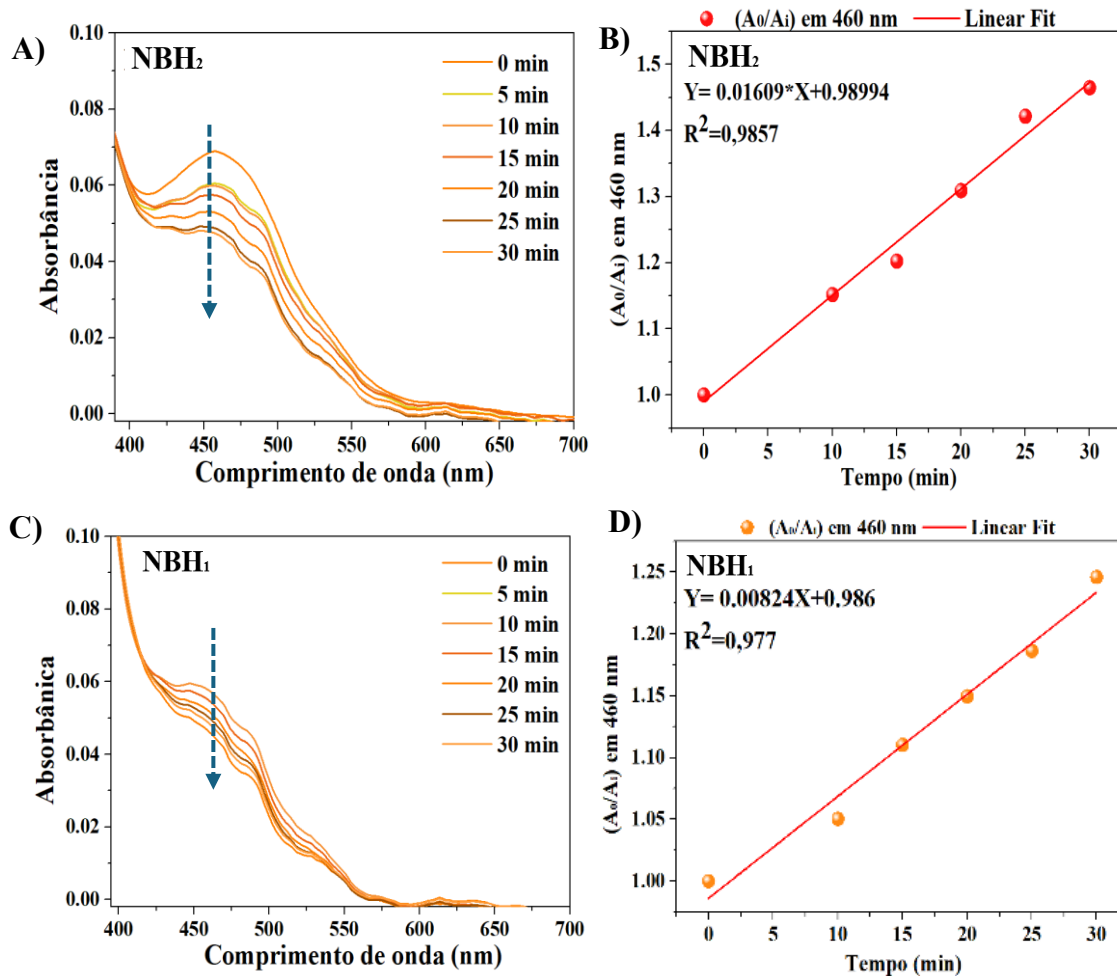
No entanto, ao analisar as nanopartículas, observamos uma queda significativa na absorbância da NPs 0 durante a irradiação de luz azul, **Figura 17A**, indicando um processo de fotodegradação. Esta queda na absorbância, expressa pela relação A_0/A_i , apresenta um perfil quadrático, sugerindo uma degradação mais acentuada **Figura 17B**.

Figura 17. Espectros de Absorbância da NPs 0 A) sobre irradiação (450 nm) B) intensidade de Absorbância da NPs 0 em 460 nm ao longo do tempo de irradiação.



Fonte: Autor.

Figura 18. Espectros de Absorbância da NBH₂ e NBH₁ durante a irradiação (450 nm) A) e C) respectivamente, B) e D) intensidade de Absorbância da NBH₂, e NBH₁, respectivamente em 460 nm ao longo do tempo de irradiação.

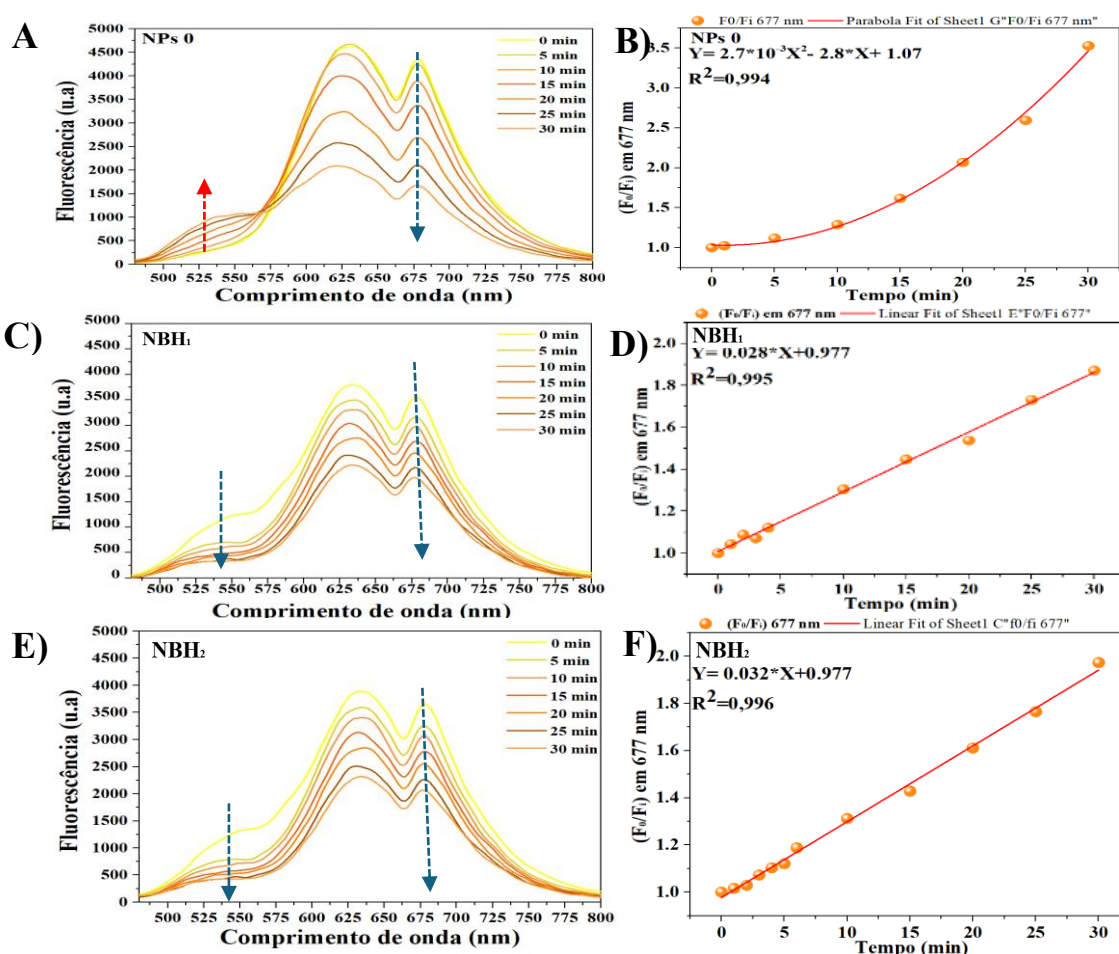


Fonte: Autor.

É interessante notar que, nas NBH₁ e NBH₂, também ocorre uma redução na absorbância, porém com um perfil linear, na relação A_0/A_i , **Figura 18B**. Esta diferença de comportamento entre as nanopartículas sugere que o AU na nanoformulação está deixando as amostras mais fotoestáveis.

Além disso, a análise da fluorescência revela padrões distintos entre as amostras. Na NPs 0, que inicialmente não apresentava banda de fluorescência na região de 530 nm, observamos a formação e um aumento gradual dessa banda durante a irradiação, enquanto as bandas em 625 nm e 675 nm diminuem de forma quadrática. Por outro lado, nos NBH₁ e NBH₂, a banda na região de 530 nm já estava presente desde o início da irradiação e diminui junto com suas bandas características, mantendo uma degradação uniforme e linear para ambas.

Figura 19. Espectros de Fluorescência A), C) e E) das NPs 0, NBH₁ e NBH₂ respectivamente, irradiadas em 450 nm; B), D) e F) são as Intensidades de fluorescência (F_0/F_i) em 677 nm das NPs 0, NBH₁ e NBH₂, respectivamente, ao longo do tempo de irradiação.



Fonte: Autor.

Esses resultados indicam que a presença do AU na nanoformulação pode estar desempenhando um papel protetor contra a fotodegradação, minimizando os efeitos adversos da irradiação de luz azul. Esses resultados fornecem uma compreensão mais profunda dos processos de degradação das nanopartículas quando irradiadas com luz azul (450 nm), e destacam o potencial das nanoformulações para degradar o CNPPV em um determinado comprimento de onda, possivelmente proporcionar uma liberação sob condições específicas de iluminação.

3.2.7 Eficiência de encapsulação do AU

Os valores de eficiência de encapsulação (E.E) para os nanocarreadores de AU (NBH₁ e NBH₂), estão descritos na Tabela 6, podemos observar que os valores de E.E estão acima de 80%, o que mostra uma boa afinidade do AU com a matriz polimérica para ambos nanocarreadores.

Tabela 2. Valores obtidos da eficiência de encapsulação das NBH₁ e NBH₂

Nanocarreadores	E.E (%)
NBH ₁	80,7
NBH ₂	82,9

Fonte: Autor.

A avaliação da eficiência de encapsulação é um parâmetro importante para sistemas de entrega de nanocarreadores, devido ao impacto na qualidade e segurança (Marques et al., 2020). Uma alta taxa de encapsulação indica uma boa eficiência de encapsulação, e quando apresenta taxas abaixo de 20% indica fraca eficiência de encapsulação (Ghosh, Sarkar e Thongmee, 2022).

No entanto, há uma ampla gama de estudos com variações significativas nos valores de eficiência de encapsulamento do AU. Por exemplo, Francolini et al., 2019, focou na entrega direcionada de nanolipossomas catiônicos carregados com AU a biofilmes de *Staphylococcus epidermidis*. Diferentes formulações de lipossomas foram preparadas, variando os componentes e os métodos de encapsulamento. Observou-se que o tipo de anfifílico glicosilado não afetou a eficiência de encapsulamento, porém, a técnica de carregamento influenciou significativamente. Notavelmente, a maior eficiência de encapsulamento (aproximadamente 85%) foi alcançada com o protocolo B, superando a eficácia do carregamento ativo (cerca de 65%). Esse achado foi atribuído à menor solubilidade do ácido úsnico em água, resultando em uma maior captura no pH mais baixo

utilizado no protocolo de carga ativa. Os resultados destacam a importância do método de encapsulamento na eficiência do ácido úsnico.

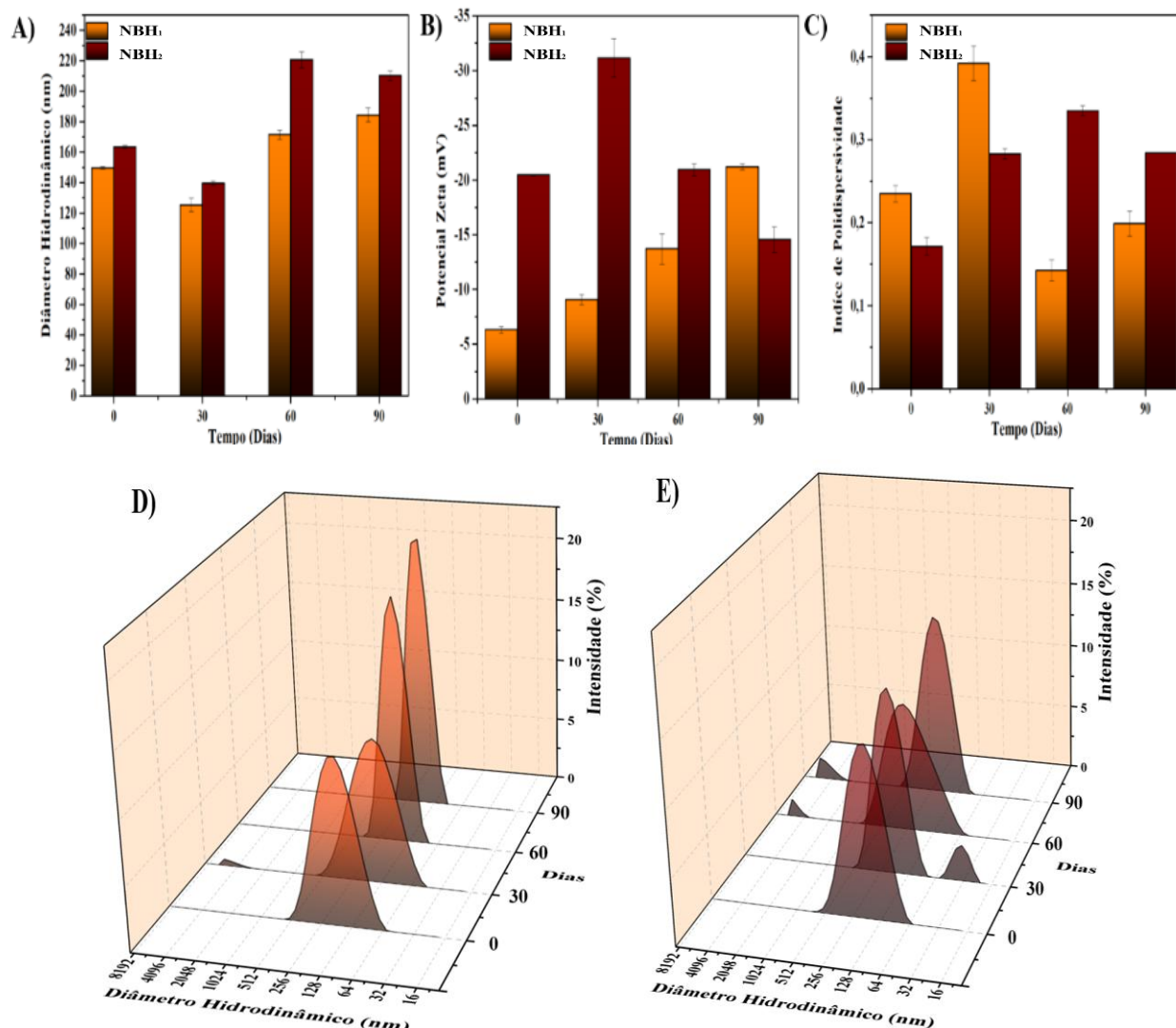
Em outro estudo conduzido por Barbosa et al., 2017, fez o encapsulamento do AU em microesferas de poli- ϵ -caprolactona (PCL), utilizando o método de emulsão múltipla seguido de evaporação do solvente. As microesferas PCL foram notáveis pela sua alta eficiência de encapsulamento, alcançando 97,72%. Esses resultados estão fortemente ligados ao método de síntese utilizado, bem como à matriz polimérica ou ao mecanismo de afinidade química com o AU.

3.5 MEDIDAS DE ESTABILIDADE DOS NANOCARREDORES

3.5.1 Medidas de estabilidade dos nanocarreadores (DLS, PDI, potencial zeta)

Para melhor entendimento da conservação dos nanocarreadores longo do tempo, foi feito um estudo com relação a estabilidade em temperatura ambiente. Para este estudo foi avaliado o diâmetro hidrodinâmico, o potencial Zeta e o índice de polidispersividade das amostras ao longo de 90 dias. A avaliação da estabilidade das revelou tendências distintas. Durante esse período, observou-se um aumento leve no diâmetro hidrodinâmico do NBH₁, enquanto o NBH₂ apresentou um aumento mais considerável (**Figura 20 A**), alcançando quase 200 nm. Além disso, foi possível notar a formação de agregados, especialmente a partir de 60 dias, pelas curvas de distribuição de tamanho (**Figura 20E**), principalmente para o NBH₂, enquanto a NBH₁ não apresentou essa formação.

Figura 20. Estabilidade das nanopartículas ao longo do tempo: A) diâmetro hidrodinâmico; B) potencial Zeta; C) PDI; D)NBH₁ distribuição de tamanho 3D ao longo do tempo e E) NBH₂ distribuição de tamanho 3D ao longo do tempo.



Fonte: Autor.

Também analisamos o potencial zeta, que pode ser influenciado pela composição dos nanocarreadores e pelo meio dispersante, pH e força iônica do meio, e, portanto, é um bom indicativo de estabilidade dos nanocarreadores (Inam et al., 2022). É observado que as nanopartículas com um potencial zeta de aproximadamente ± 30 mV são mais estáveis em suspensão (Liu, 2015), devido à repulsão de cargas entre as partículas, impedindo sua agregação e coalescência (Kralchevsky et al., 2016). Estudos indicam que o potencial zeta é influenciado pela carga dos componentes dos nanocarreadores, especialmente os surfactantes, localizados na interface com o meio dispersante (Dukhin & Xu, 2020).

Em relação ao potencial zeta do nosso estudo, houve uma variação significativa ao longo do tempo, para a NBH₂, um aumento inicial na eletronegatividade, seguido por uma

queda considerável até -15 mV após 60 dias, esse resultado sugere que a estabilidade cai depois de 30 dias, provavelmente existe uma instabilidade por causa da concentração alta de polímero. Já a NBH₁ apresentou um aumento gradual no potencial zeta, variando de -5 mV a -20 mV tendendo a ter uma melhor estabilidade ao longo do tempo, o que foi confirmada pela distribuição de tamanho que também se mostrou muito uniforme ao longo dos 90 dias.

Um outro aspecto analisado foi o índice de polidispersão, que mede o quão uniforme é a distribuição de tamanho das nanopartículas em relação à média. Quanto menor o índice de polidispersão, mais uniforme é essa distribuição. Valores elevados indicam uma distribuição não uniforme, que pode ser causada pela presença de diferentes tamanhos de partículas ou pela formação de agregados. Índices de polidispersão menores que 0,2 são indicativos de uma distribuição uniforme no tamanho das partículas (Leung & Shen, 2018; Moraes et al., 2009).

Quanto ao índice de polidispersividade (PDI), a NBH₂ manteve-se relativamente estável em torno de 0,3 ao longo dos 90 dias, indicando uma distribuição de tamanho mais homogênea. Por outro lado, a NBH₁ mostrou uma grande flutuação no PDI, variando de 0,2 a 0,4 e depois diminuindo para 0,1 ou seja a NBH₁ manteve a tendência de ficar mais estável com o tempo, assim como já observado nos resultados anteriores. Possivelmente a NBH₁, por ter uma menor proporção de polímero, fez com que o núcleo polimérico se mantém mais estável no interior da micela, não se alterando com o tempo; entretanto os polímeros que não formaram nanopartículas, e o AU que não foi carregado, possivelmente foi precipitando com o tempo o que pode ter influenciado essas flutuações de estabilidade nos primeiros dias, mas melhorando a estabilidade coloidal com o tempo.

Os resultados indicam uma relação entre a estabilidade dos NBHs e sua composição e formulação. Enquanto as NBH₂ apresentaram estabilidade nos primeiros 30 dias, posteriormente houve uma perda gradual dessa estabilidade, resultando em um aumento mais significativo de tamanho e uma tendência à formação de agregados. Por outro lado, as NBH₁ mantiveram uma distribuição de tamanho mais homogênea ao longo do tempo. Além disso, as variações no potencial Zeta e no PDI corroboram essa tendência de estabilidade ao longo do tempo para as NBH₁.

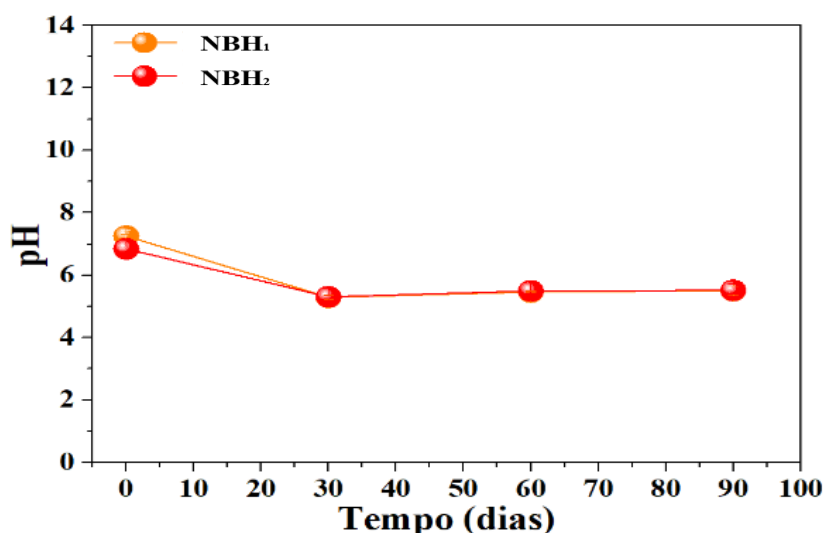
3.5.2 Medida de estabilidade do pH dos nanocarreadores

A análise da estabilidade química das formulações ao longo de 90 dias em temperatura ambiente, com base no monitoramento do valor de pH, Figura 21, fornece

informações importantes sobre a integridade e a viabilidade das nanopartículas em condições de armazenamento prolongado (Umar et al., 2018). Durante esse período, observou-se uma tendência de variação no pH das formulações, o que pode refletir diferentes processos químicos e interações ocorrendo dentro do sistema das nanopartículas.

É importante destacar que variações no pH podem ter várias origens, incluindo reações de degradação dos componentes das nanopartículas, interações com os componentes do meio circundante (Verma et al., 2017). Portanto, o monitoramento contínuo do pH ao longo do tempo permite avaliar a estabilidade química das nanoformulações e identificar quaisquer alterações que possam comprometer a qualidade ou eficácia das nanopartículas.

Figura 21. Estudo da estabilidade química do AU e dos nanocarreadores, através de valores de pH



Fonte: Autor.

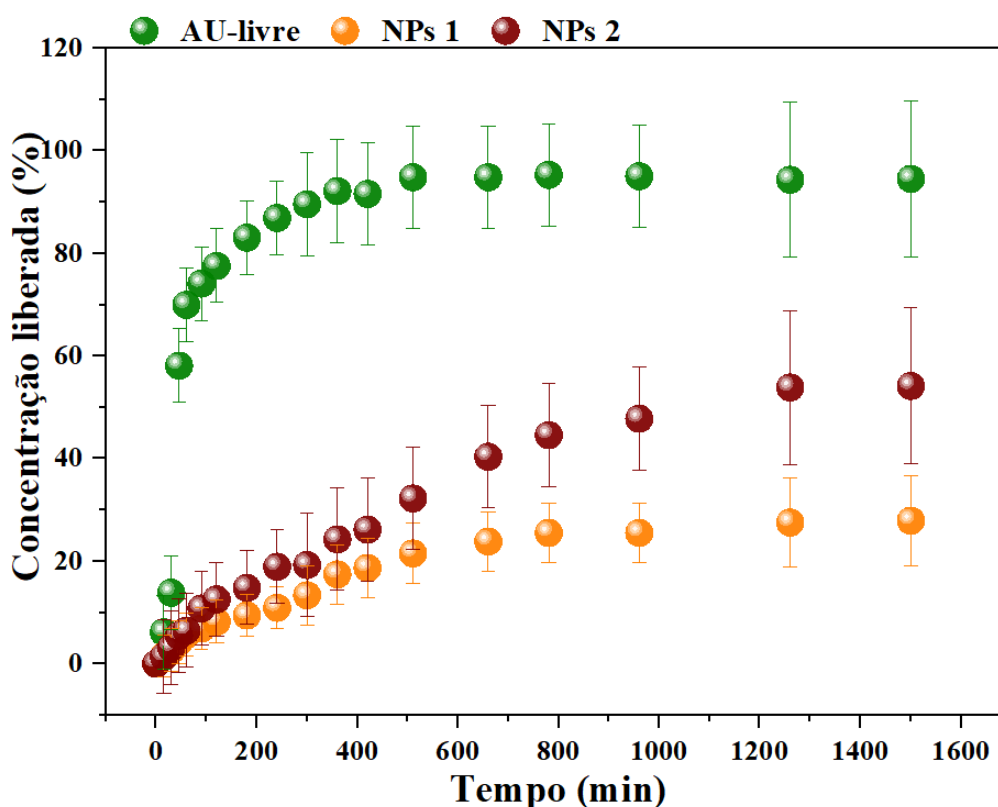
Observa-se que o pH caiu para ambos nanocarreadores, isto é, o meio ficou mais ácido, provavelmente, esse efeito esteja relacionado a uma parcela de AU, que possivelmente estava fracamente ligado a superfície das partículas com o tween20 e estejam liberando de maneira semelhante nos primeiros momentos pós síntese, visto que em ambos nanocarreadores a eficiência encapsulação foi muito próximas, e as concentrações de AU e tween20 são as mesmas, logo nos primeiros dias essa liberação pode acidificar o meio. Em geral, variações significativas no pH podem indicar instabilidade das formulações e possíveis problemas de degradação ou contaminação, mas não foi o caso observado nas amostras.

3.6 CINÉTICA DE LIBERAÇÃO *VITRO* E RESPONSIVIDADE A LUZ

3.6.1 Cinética de liberação *in vitro* do AU

A investigação da cinética de liberação das amostras revela informações sobre a eficácia e o perfil de liberação do AU. A análise dos dados cinéticos proporciona uma melhor compreensão sobre os mecanismos de liberação e as características de transporte das nanopartículas. Com base nos resultados da cinética de liberação, observou-se uma diferença significativa na taxa e no perfil de liberação entre o AU livre e os nanocarreadores desenvolvidos. Enquanto o AU livre demonstrou uma liberação muito mais rápida, com cerca de 90% liberado em apenas 90 minutos, as nanopartículas apresentaram uma liberação mais gradual e prolongada ao longo do tempo. Especificamente, a NBH₂ liberou aproximadamente 55% do AU após 1250 minutos, enquanto a NBH₁ liberou apenas 27% nesse mesmo intervalo de tempo, como apresentado na Figura 22.

Figura 22. Cinética de liberação *in vitro* dos nanocarreadores e do AU livre.



Fonte: Autor

Tabela 7. Modelos matemáticos de cinética aplicados ao perfil de liberação do AU nos nanocarreadores.

Formulações	Modelos (R^2)			
	Ordem zero	Primeira Ordem	Higuchi	Korsmeyer - Peppas
NBH ₁	0,822	0,822	0,958	0,961
NBH ₂	0,918	0,746	0,961	0,980

Fonte: Autor

A escolha do Modelo de Korsmeyer-Peppas (**Equação 8**) para análise da cinética de liberação foi fundamentada na sua capacidade de descrever adequadamente o perfil de liberação observado, demonstrando um melhor ajuste aos dados experimentais com um valor mais alto do coeficiente de correlação de linearidade (R^2) em comparação com outros modelos **Tabela 8**.

$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = Kt^n \quad \text{Equação}$$

(8)

* Q_t é a quantidade de AU liberada em um determinado tempo t , Q_∞ é a quantidade de AU liberada em um tempo infinito, k é a constante cinética de liberação e n é o expoente de liberação.

Tabela 8. Descrição do Mecanismo em função do expoente de liberação.

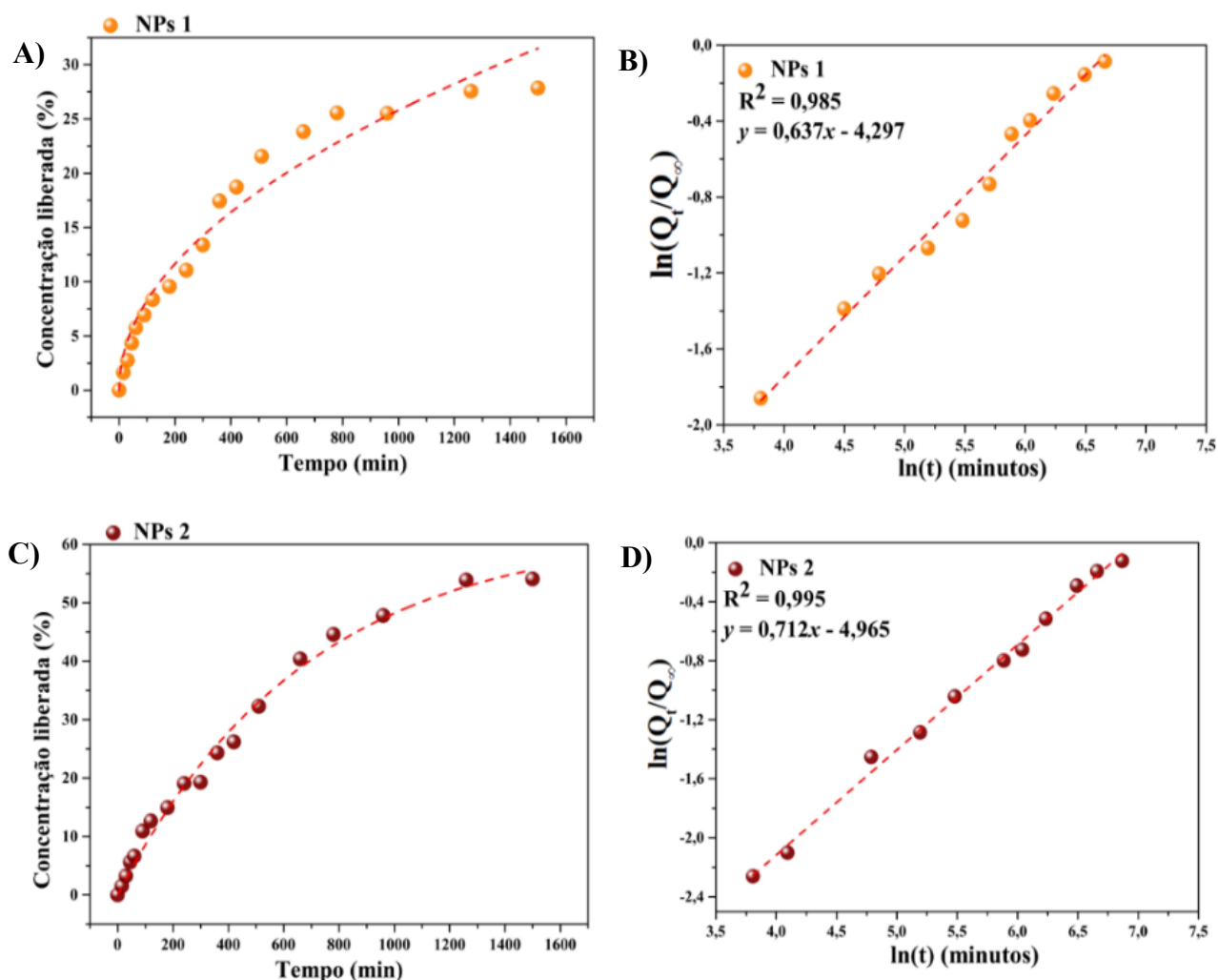
Expoente de liberação (n)	Mecanismo de transporte
$n = 0,5$	Modelo de Fick (ou Fickiano) (Caso I)
$n = 1,0$	Modelo não-Fickiano (Caso II)
$0,5 < n < 1,0$	Modelo não-Fickiano (Caso Anomalo)
$n < 0,5$	Comportamento pseudo Fickiano
$n > 1,0$	Modelo não-Fickiano (Super Caso II)

Fonte: (Paula & Mendes, 2019)

As constantes cinéticas (K) calculadas para as NBH₁ e NBH₂ foram de 0,660 e 0,854, respectivamente, indicando as taxas de liberação das nanopartículas. Além disso, os expoentes de liberação (n) foram de 0,637 para NBH₁ e 0,712 para NBH₂, sugerindo um mecanismo de transporte não modelo não-Fickiano (Caso Anomalo) (**Tabela 8**). Esse

processo é caracterizado pela liberação controlada, influenciada principalmente pela difusão e pelo inchamento do polímero (Costa & Sousa Lobo, 2001; N.-N. Li et al., 2014). Durante esse período, o rearranjo das cadeias poliméricas é gradual, enquanto a difusão ocorre simultaneamente, resultando em efeitos temporais anômalos (N.-N. Li et al., 2014).

Figura 23. Cinética de liberação in vitro dos nanocarreadores, figuras A) e C) NBH₁ e NBH₂ respectivamente; e Modelagem matemática segundo o modelo de Korsmeyer Peppas B) e D) para NBH₁ e NBH₂ respectivamente.



Fonte: Autor

Tabela 9. Dados referentes a modelagem matemática de Korsmeyer Peppas

Formulações	Constante de liberação $K (min^{-1})$	Expoente de liberação (n)	Equação da reta
NBH ₁	0,660	0,637	$y = 0,637x - 4,297$
NBH ₂	0,854	0,712	$y = 0,712x - 4,965$

Fonte: Autor

Os resultados evidenciam a eficácia das nanopartículas como sistemas de liberação controlada do AU, oferecendo a capacidade de modular tanto a taxa quanto o perfil de liberação do AU. A liberação mais gradual e prolongada das nanopartículas em comparação com o AU livre é atribuída à presença da matriz polimérica, que retarda a liberação da molécula. A discrepância na taxa de liberação entre as NBH₁ e NBH₂ pode ser explicada pelas variações na composição. A NBH₂, contém uma quantidade significativamente maior de polímero em relação à NBH₁, o que pode resultar em um núcleo menos estável devido ao seu maior tamanho, facilitando assim a liberação em comparação com a NBH₁, que se mostrou mais estável nos resultados anteriores e possui um diâmetro menor. Dessa forma, a estrutura das nanopartículas, em particular a concentração de polímero, ressalta a importância crítica da formulação na cinética de liberação.

Vários estudos utilizaram nanopartículas poliméricas para liberação modificada de AU (da Silva Santos et al., 2006; Ribeiro-Costa et al., 2004; Santos et al., 2005). Por exemplo, a pesquisa realizada por (Vasarri et al., 2022) investigou micelas poliméricas de Solutol HS15 e succinato de polietilenoglicol 1000 de D- α -Tocoferol (TPGS) carregadas com AU. Seu estudo evidenciou uma liberação mais lenta em comparação com a solução de AU livre, resultando em uma liberação prolongada do composto. Os resultados indicam que a liberação de AU a partir da solução através da membrana de diálise foram substancialmente mais rápidas, com uma liberação observada nas primeiras 2 horas e aproximadamente 100% da molécula liberada em 6 horas.

Por outro lado, a quantidade de AU liberada pelas micelas em 6 horas foi em torno de 30%. Este resultado está de acordo com nossos resultados e sugere uma liberação mais controlada e prolongada do AU quando encapsulado em micelas poliméricas, destacando o potencial desses sistemas como estratégias de liberação modificada de AU.

Além disso, estudos como o de (Garg et al., 2019b) exploraram nanopartículas (NPs) de goma gellana modificada com heparina (HAG) carregadas com AU. Os resultados deles também revelaram uma notável extensão de tempo de liberação de AU no sistema de NPs. As NPs de HAG foram capazes de liberar 95,67% do AU em 48 h, enquanto os NPs de GG simples foram usados para liberar 96,12% do AU em 8 h.

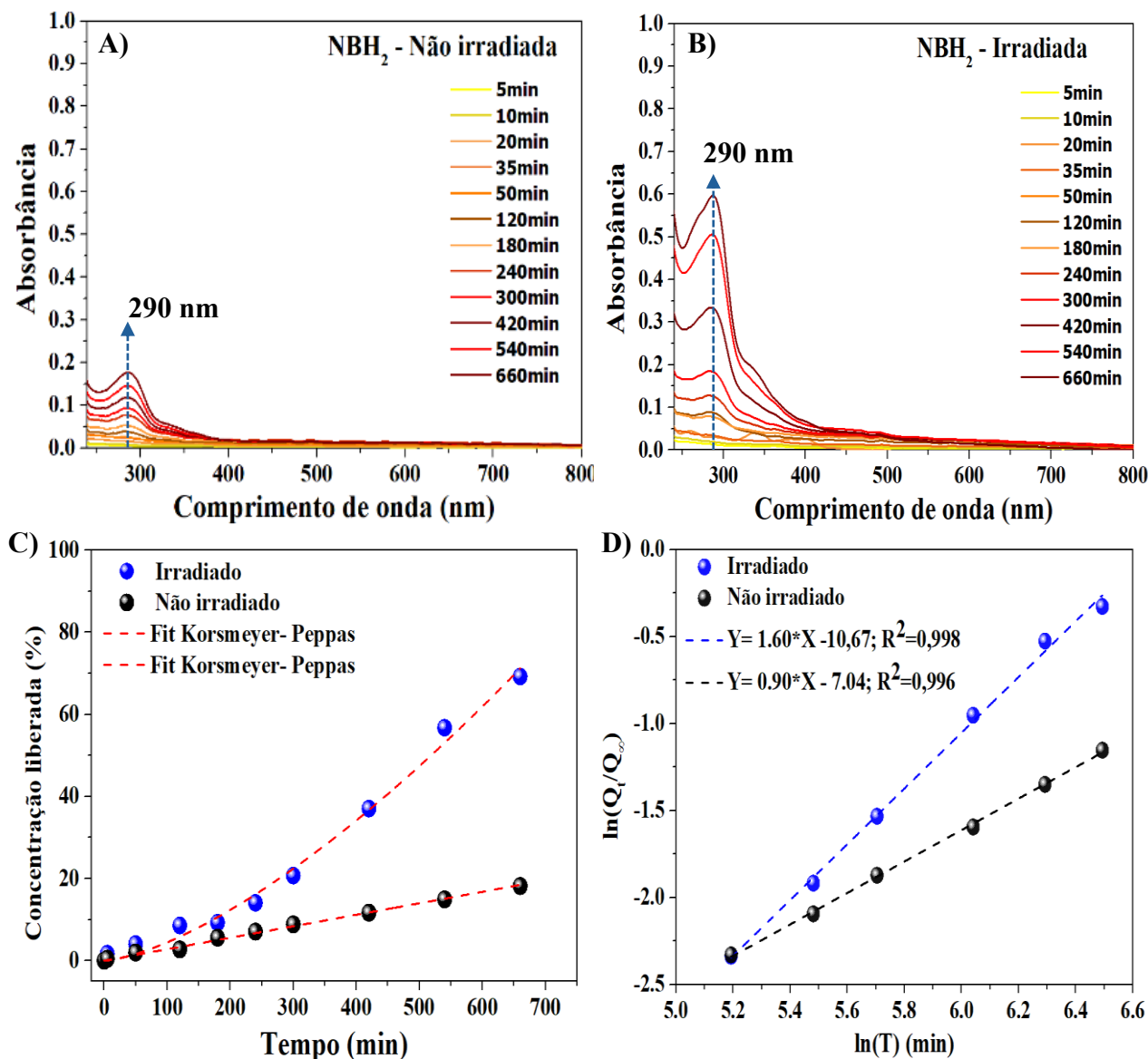
É importante ressaltar que a eficácia das nanopartículas poliméricas como carreadores pode ser influenciada por diversos fatores, como o tipo de polímero utilizado, o método de preparação das nanopartículas e as condições de liberação do composto. Estudos adicionais são necessários para otimizar esses parâmetros e entender melhor o mecanismo de liberação do AU.

3.6.2 Liberação responsiva a luz azul do AU

Uma propriedade altamente desejável no desenvolvimento de nanomateriais é sua capacidade de responder a estímulos externos, o que confere seletividade à ação do nanomaterial e, conseqüentemente, aumenta sua eficácia. Nesse contexto, investigamos a liberação do AU quando submetida a irradiação da luz azul (450 nm), considerando a capacidade do CNPPV em absorver luz nesse comprimento de onda. A escolha do NBH₂ revelou-se mais apropriada devido à sua liberação mais alinhada com as condições experimentais, uma vez que a liberação do NBH₁ é muito lenta e nesse experimento não poderia deixar o LED muito tempo ligado.

Os resultados demonstram que a NBH₂ irradiada apresentou uma liberação de 70% em 650 minutos, enquanto o NBH₂ não irradiada teve uma liberação de apenas 18% no mesmo intervalo de tempo (**Figura 24 C**). Essa diferença marcante na liberação entre as amostras irradiadas e não irradiadas destaca o potencial das nanopartículas sensíveis à luz azul como sistemas de liberação foto-ativável controlada, oferecendo a capacidade de desencadear a liberação do AU em resposta à exposição à luz azul. A liberação significativamente maior observada nas nanopartículas irradiadas sugere uma foto-ativação eficaz do mecanismo de liberação, demonstrando a viabilidade e a eficácia desse sistema em resposta a estímulos externos.

Figura 24. Resultados do teste de fotoliberação; A) e B) espectros de absorbância do ácido úsnico liberado ao longo do tempo do NBH₂ não irradiada e irradiada, C) comparação entre a liberação irradiada e não irradiada; D) linearização do modelo de Korsmeyers - Peppas com expoente difusional $n > 1$ para NBH irradiada e $n = 0,90$, para amostra não irradiada.



Fonte: Autor

Note que na **Figura 24 - D)** o valor do expoente de liberação (n) é 1,60 para a amostra irradiada o que significa que modelo correspondente é não-Fickiano (super caso II), durante o processo de irradiação, ocorrem os fenômenos de tensão e quebra das cadeias poliméricas. Ou seja, o núcleo polimérico acaba se rompendo e ocorre a liberação do AU. Enquanto no caso não irradiado o valor de n é 0,90 o que se mantém entre $0,5 < n < 1,0$ modelo não-Fickiano (caso anômalo), assim como já demonstrado nos resultados anteriores. É importante dizer, que para determinar o expoente n , é recomendado o uso

dos dados experimentais de até 60% de liberação acumulada ($\frac{Q_t}{Q_\infty} < 0,60$)(Costa & Sousa Lobo, 2001; Korsmeyer et al., 1983; Ritger & Peppas, 1987). Por isso, nesse caso comparativo entre os grupos irradiado e não irradiado foi utilizado um intervalo de tempo menor que no teste de liberação anterior.

Alguns trabalhos também estudaram a fotorresponsividade de nanocarreadores para entrega nanopesticidas (Camara et al., 2019b; Shen et al., 2023d). Por exemplo (Shen et al., 2023d) fizeram um nanocompósito composto de biochar, atapulgita (ATP), glifosato, azobenzeno e óleo de amino silício. Nele, o ATP estruturado em nano rede é distribuído uniformemente nos poros para formar um composto poroso de biochar-ATP que atuou como um transportador para carregar eficientemente moléculas de glifosato e azobenzeno. Nesse trabalho utilizaram radiação de luz UV, para promover a liberação de glifosato através desses nano poros, e tiveram um excelente desempenho de liberação controlada em resposta à luz.

Outro estudo como o Ye et al., 2015 fizeram nano micelas poliméricas de base de carboximetilquitosana responsivas a luz UV (365 nm), para entrega do herbicida Diuron. A liberação de Diuron das micelas foi de apenas 3,35% dentro de 8 horas. No entanto, com a irradiação UV, aproximadamente 45,5% do Diuron carregado foi liberado da amostra nesse mesmo intervalo de tempo. Além disso eles modelaram uma resposta à luz solar, com uma lâmpada de arco de xenônio de 300 W (saída espectral de 200 - 2500 nm, saída radiante de 50 W) foi usada para simular a luz solar, e foi observado um aumento gradual na taxa de liberação ao longo de 8 h de irradiação, esses resultados sugere que a luz solar também pode funcionar como resposta para o nano carreador. Esses resultados têm implicações importantes para o desenvolvimento de estratégias de liberação controlada de nanopesticidas sensíveis à luz, com potenciais aplicações na agricultura.

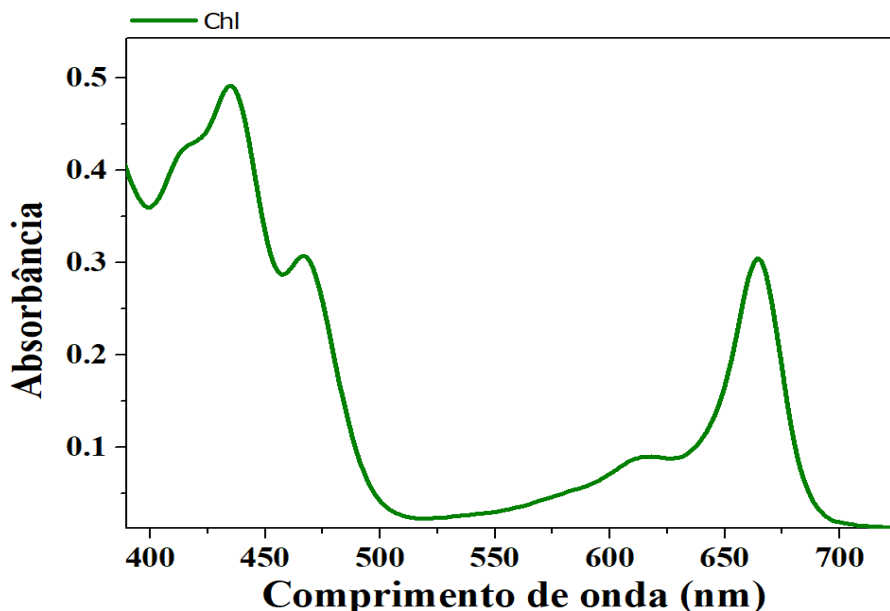
Em suma, os nossos resultados utilizam luz visível (450 nm), em contraste com a maioria dos trabalhos da literatura, que utilizam luz UV, a luz visível pode ser mais interessante, por ser muito mais barata e prática e, portanto, sugerem um potencial promissor para sistemas de liberação controlada do AU. Esses resultados abrem novas perspectivas para o desenvolvimento de tratamentos inovadores. Investigações futuras podem se concentrar na otimização das formulações de nanopartículas, variação da potência de irradiação entre outros aspectos.

3.7 EFEITO DOS NANOCARREADORES NO EXTRATO DA CLOROFILA

3.7.1 Supressão da fluorescência da clorofila

Com o objetivo de caracterizar a interação entre os nano bioherbicidas e moléculas de clorofila (Chl), iniciou-se o estudo analisando-se a interação entre o extrato da clorofila e AU, NBH₁ e NBH₂ em diferentes concentrações de AU. A concentração de clorofila isolada foi calculada utilizando a **Equação 4**. Inicialmente, o extrato de clorofila isolada foi preparado e adicionado na cubeta nos quais foram introduzidas diferentes concentrações de nanocarreadores, baseadas no ácido úsnico (AU): 18; 35,7; 70,8; 104,9; 138,5; 203,9; 266,75; 327,35; 442,18 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Os resultados obtidos da absorção do extrato de clorofila, conforme mostrado na **Figura 25**, revelam o espectro padrão da clorofila, onde a presença de duas regiões distintas de absorção. Na faixa de 400 a 500 nm, ocorre uma sobreposição de bandas de absorção, indicando a absorção de radiação luminosa não apenas pelas clorofilas a e b, mas também por outros pigmentos como os carotenoides (Gruber et al., 2019). Na faixa de 600 a 700 nm, as clorofilas a e b também demonstram absorção de luz.

Figura 25 . Espectro de absorção do extrato da clorofila da amostra controle.

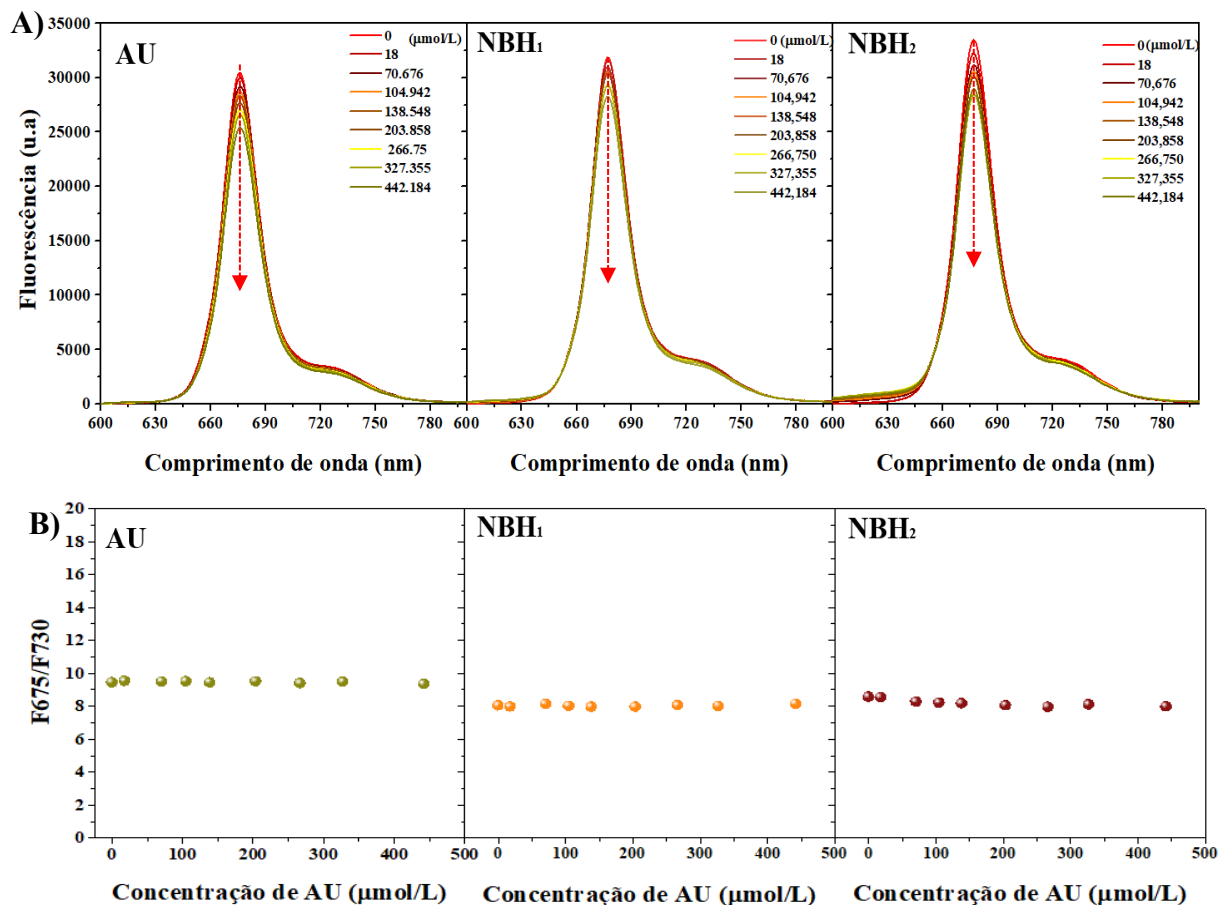


Fonte: Autor

A avaliação das nanopartículas contendo AU em um extrato de clorofila revela uma supressão significativa na intensidade de fluorescência, com efeitos mais pronunciados observados na NBH₂, seguida pela NBH₁ e, por fim, pelo AU em solução. Esses resultados

indicam uma interação complexa entre as nanopartículas e a clorofila, destacando a influência dos NBHs no comportamento fotofísico do ambiente circundante.

Figura 26. Espectros de fluorescência com a supressão na intensidade de fluorescência do extrato de clorofila com AU, NBH₁ e NBH₂ em diferentes concentrações, Figura A), Razão entre os picos de fluorescência em 675 e 730 nm do extrato de clorofila em função da concentração do AU livre e dos nanocarreadores, Figura B).



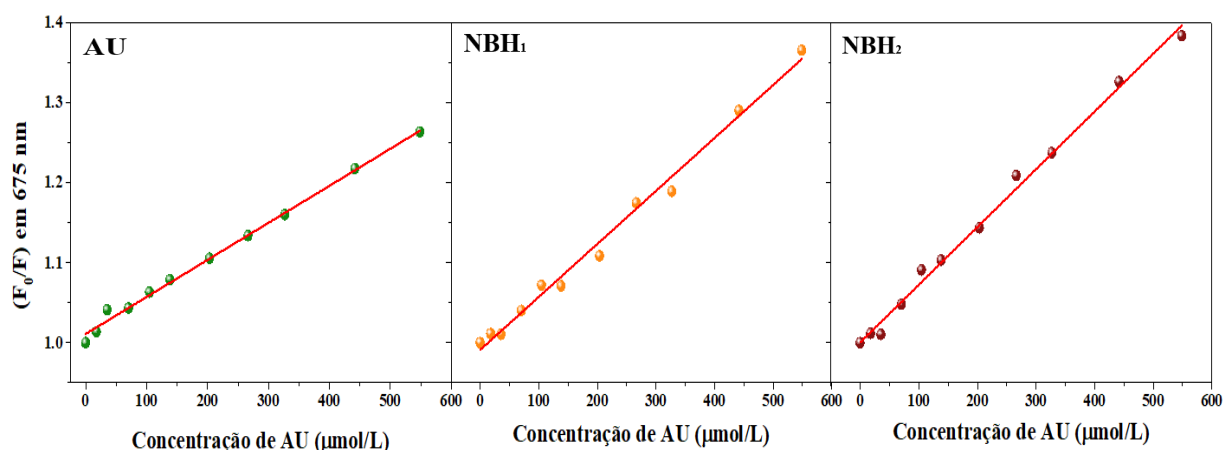
Fonte: Autor

Na Figura 26A, a supressão da intensidade de fluorescência observada pode ser atribuída à competição entre a clorofila e o AU (presente nas nanopartículas) pelos estados excitados e a subsequente dissipação de energia. O aumento da concentração de nanopartículas resulta em uma maior quantidade de AU presente, amplificando essa competição e resultando em uma redução ainda mais significativa na intensidade de fluorescência.

Analisando as razões de F675/F730, observou-se que a intensidade de fluorescência em 675 nm manteve-se em torno de 9,28 vezes mais intensa do que a intensidade de fluorescência em 730 nm, independentemente da concentração AU, como mostrado na Figura 26B.

A Figura 27 mostra que o gráfico de F_0/F em função da concentração de NPs é linear nesse intervalo de concentração de AU estudado, revelando que a supressão obedece a relação de Stern-Volmer: $F_0/F = 1 + K_{SV}[Q]$, onde F_0 e F são, respectivamente, as intensidades de fluorescência da clorofila na ausência e presença do supressor (nesse caso, AU livre e os NBHs), K_{SV} é a constante de supressão de Stern-Volmer e $[Q]$ é a concentração do AU atuando como agente supressor (Dias Júnior e Novo, 2014).

Figura 27. Razão de F_0/F em 675 nm em função da concentração de AU livre e seus nanocarreadores. F_0 e F são as intensidades de fluorescência da clorofila.



Fonte: Autor

Tabela 10. Valores das constantes de supressão Stern-Volmer (K_{SV}), e as respectivas equações e os valores de R^2 .

Formulações	Coefficiente angular	(R^2)	Equação da reta
AU	$4,63 \cdot 10^{-4}$	0,994	$y = 4,63 \cdot 10^{-4}x - 1,011$
NBH ₁	$6,63 \cdot 10^{-4}$	0,990	$y = 6,63 \cdot 10^{-4}x - 0,991$
NBH ₂	$7,22 \cdot 10^{-4}$	0,994	$y = 7,22 \cdot 10^{-4}x - 1,001$

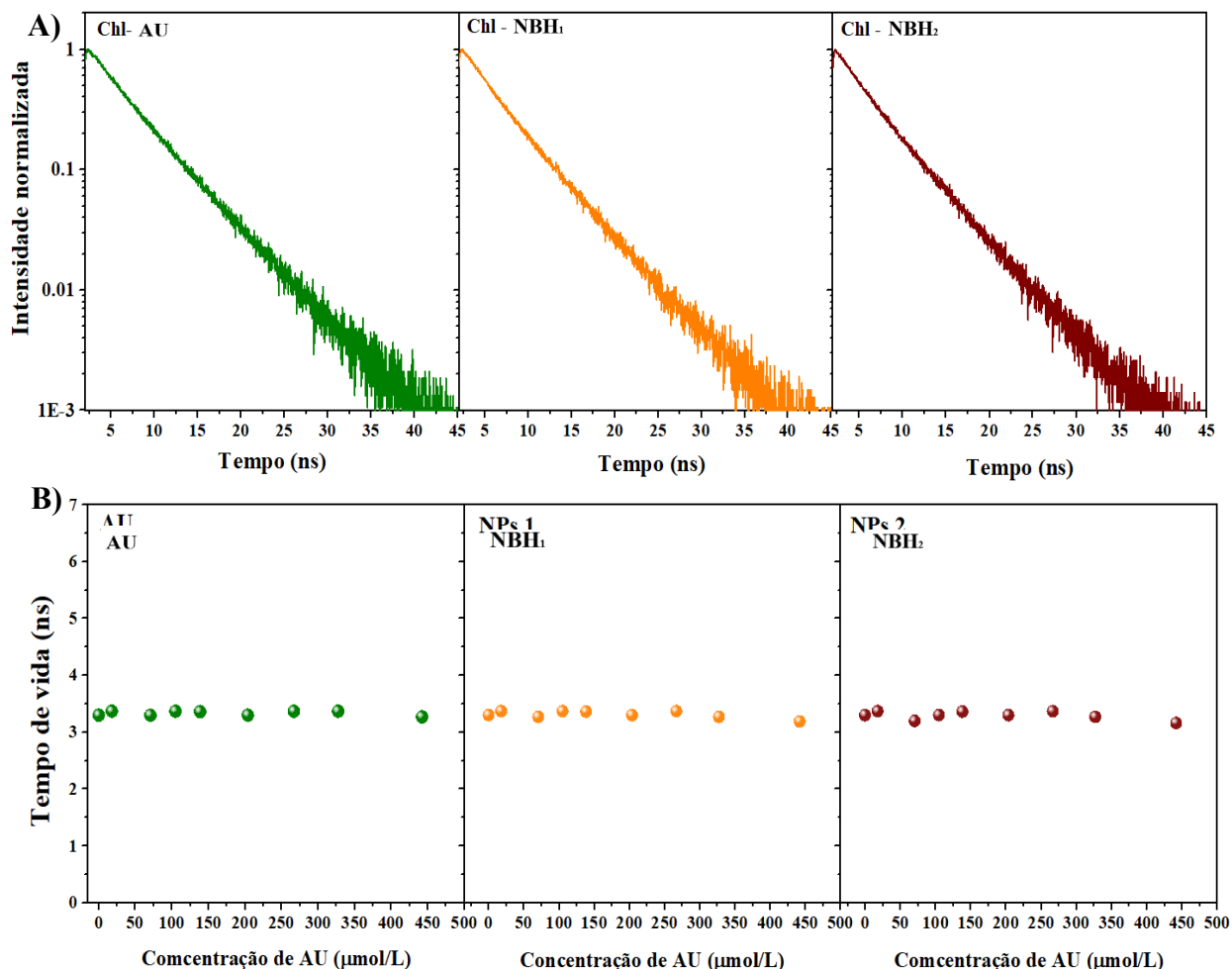
Fonte: Autor

Notavelmente, os NBH₂ demonstram uma supressão mais acentuada em comparação com as NBH₁ (1,09 vezes maior) e o AU livre (1,56 vezes maior), sugerindo uma maior eficiência na interação entre o NBH₂ e a clorofila. Esses resultados sugerem que as nanopartículas não apenas fornecem um veículo eficaz para o transporte do AU, mas também desempenham um papel significativo na interação com o ambiente biológico, influenciando diretamente os processos fotofísico das espécies presentes, como a clorofila.

Nas concentrações testadas a razão de F_0/F se comporta linearmente, podendo ser devido à supressão estática ou dinâmica, sendo assim, para melhor entendermos qual o

tipo de supressão, foi feita uma medida de tempo de vida da clorofila em função da concentração do supressor, como representado na **Figura 28**.

Figura 28. Tempo de decaimento da fluorescência do extrato de clorofila, exposta na concentração ($442,18 \mu\text{mol.L}^{-1}$), do AU livre e os NBHs (Figura A), Tempo de vida em função da concentração de AU livre e seus nanocarreadores, (Figura B).



Fonte: Autor

O tempo de vida da clorofila não se alterou, em função de AU adicionado e dos nanocarreadores, **Figura 28A e B**. Esse resultado demonstra claramente que a supressão observada anteriormente é do tipo estática. Ou seja, a formação de um complexo não-fluorescente entre o fluoróforos e o supressor. Quando o complexo absorve a luz, ele retorna ao nível fundamental sem a emissão de fóton. A intensidade de fluorescência decresce com a adição do supressor, entretanto o tempo de vida dos fluoróforos no estado excitado não é afetado, pois apenas as moléculas de clorofilas não complexadas com o AU (ou seja, moléculas livres) são responsáveis pela emissão.

Estudos anteriores já demonstram que o AU destrói pigmentos como carotenoides e clorofila (Y. Gao et al., 2018b; Latkowska et al., 2006b). Eles justificam que parte desses efeitos esteja relacionado a degradação dos pigmentos quando interagem com AU, mas parte seja pela capacidade de roubar elétrons dos pigmentos. Além disso fluorescência da clorofila pode ser influenciada pela presença de nanopartículas, conforme evidenciado por outros estudos anteriores. Diferentes tipos de nanopartículas podem exercer efeitos variados na fluorescência da clorofila (Kalisz et al., 2023). Por exemplo, em pesquisas anteriores, observou-se que a incorporação de nanopartículas de CsPbBr₃ à clorofila resultou em um significativo aumento na fluorescência da clorofila, enquanto a emissão das nanopartículas de CsPbBr₃ foi extinta (Feria et al., 2022).

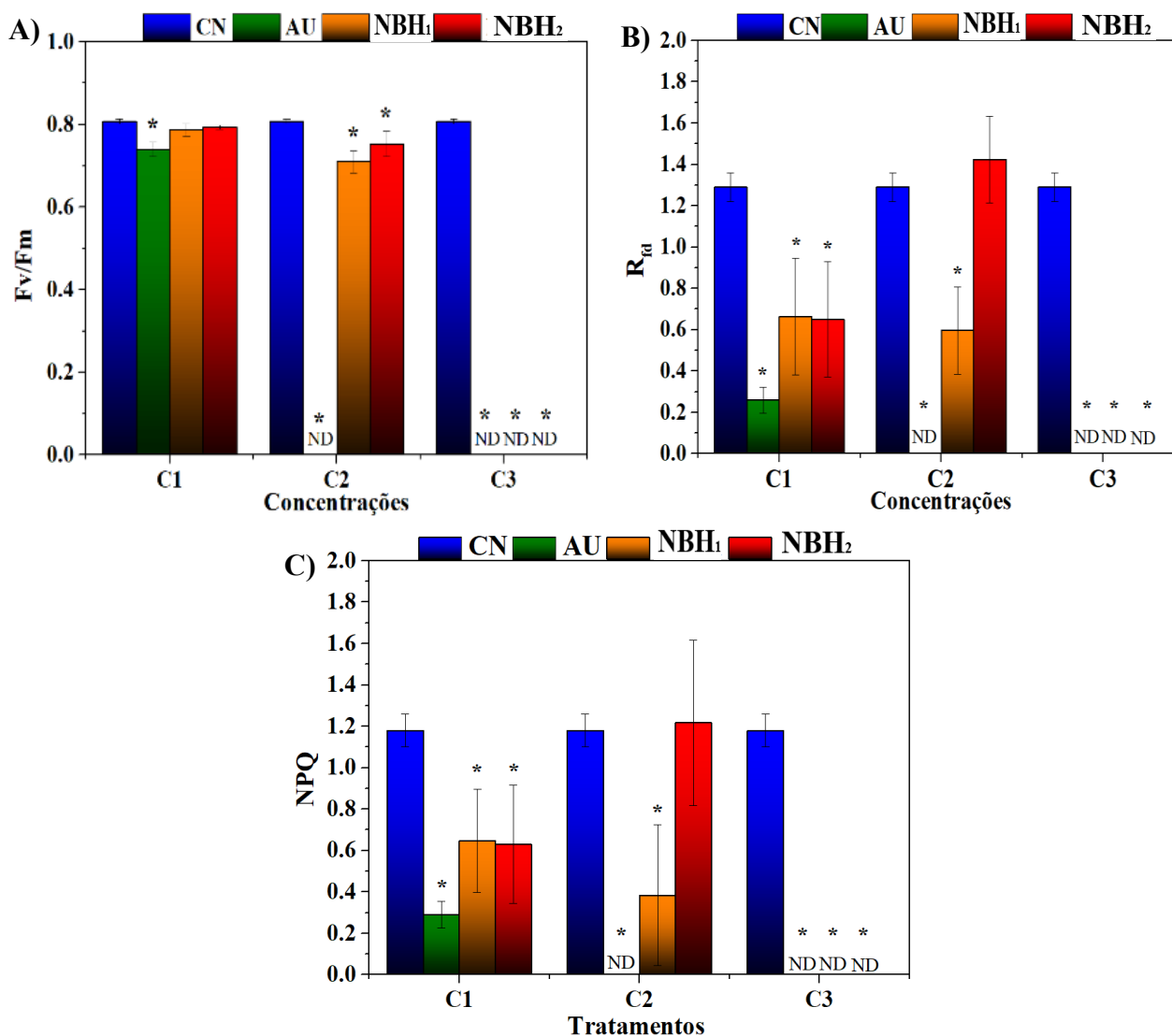
Similarmente, nanopartículas de carbono, também tiveram impacto na fluorescência da clorofila, com diferentes concentrações de nanopartículas de carbono resultando em variações na emissão de fluorescência e na transferência de energia entre as nanopartículas e a clorofila (Swapna et al., 2019). Além disso, estudos revelaram que a presença de nanopartículas pode causar alterações nas organelas das células vegetais, incluindo a estrutura do cloroplasto e a fluorescência da clorofila, potencialmente afetando o crescimento da planta (Rajput et al., 2019).

3.8 EFEITO DOS NANOCARREADORES EM PLANTAS AQUÁTICAS (*Lemna minor*)

3.8.1 ANÁLISE DOS EFEITOS DE CONCENTRAÇÃO DO AU LIVRE E DOS NANO BIOHERBICIDAS NAS *Lemnna minor*

A análise dos efeitos do AU livre e dos nanobioherbicidas nas *Lemnna*, foi feito por meio da fluorescência cinética da clorofila, onde avaliamos parâmetros como eficiência quântica fotoquímica do fotosistema II (Fv/Fm), índice de vitalidade do FSII (R_{fd}) e supressão não-fotoquímica (NPQ), ao longo de diferentes concentrações (Figura 29) e períodos de exposição.

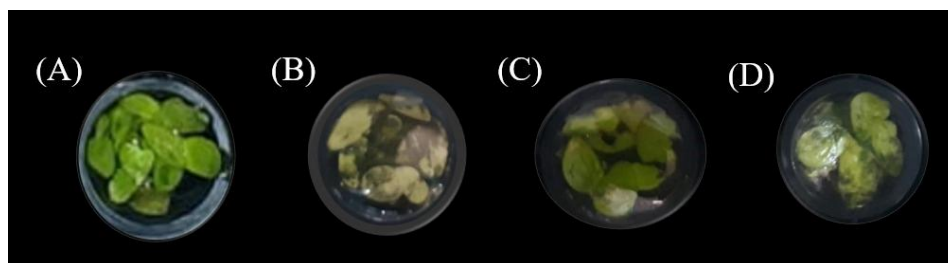
Figura 29. Resultados dos parâmetros: A) Fv/Fm, B) R_{fd} e C) NPQ por concentração de AU (C1=31,25 ppm, C2= 62,5 ppm e C3=125 ppm), após o 48h da aplicação * Diferença significativa (teste t, $p < 0,05$).



Fonte: Autor

Inicialmente, observamos que a concentração mais baixa (C1) não resultou em reduções significativas no F_v/F_m para NBH_1 e NBH_2 , porém houve diferença significativa para AU livre. Entretanto, na concentração intermediária, ocorreu uma redução significativa, especialmente para o AU livre, que não apresentou fluorescência suficiente para medidas, enquanto a tendência de queda se manteve para NBH_1 e NBH_2 , com uma queda mais acentuada para NBH_1 . Na concentração mais alta, não foram observados sinais significativos de fluorescência para nenhum dos grupos, e as plantas apresentaram sintomas de amarelamento e necrose (**Figura 30**).

Figura 30. Fotos das Lemnas após 48h da aplicação do AU-livre e dos nanocarreadores na concentração de 125 ppm; Figuras (A), (B), (C) e (D) são CN, AU livre, NBH_1 e NBH_2 respectivamente.



Fonte: Autor

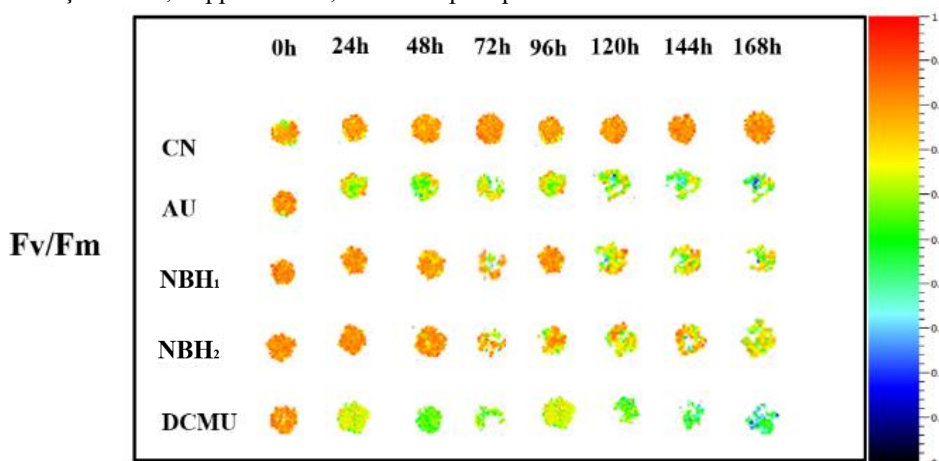
Ao analisar o parâmetro Rfd, observamos uma queda significativa, principalmente na primeira concentração, novamente mais pronunciada para o AU-livre. Nas concentrações intermediárias, o AU não apresentou fluorescência significativa, resultando na ausência de medidas, enquanto o NBH_1 manteve-se em níveis significativamente baixos comparados com CN. Entretanto, houve um aumento na NBH_2 em relação à concentração anterior, porém não significativamente comparado com o CN, e nas concentrações mais altas, os resultados anteriores foram mantidos, com ausência de fluorescência significativa.

Os resultados obtidos para o parâmetro NPQ mostraram padrões semelhantes aos do Rfd, com uma queda significativa já na primeira concentração, principalmente para o AU livre. Nas concentrações intermediárias, o AU não apresentou fluorescência significativa, resultando na ausência de medidas, enquanto os NBH_1 permaneceram em níveis baixos. Notavelmente, houve um aumento no NBH_2 em relação ao controle negativo, mas sem diferença significativa. Nas concentrações mais altas, os resultados anteriores foram mantidos, com ausência de fluorescência significativa.

4.8.2 ANÁLISE DOS EFEITOS DE EXPOSIÇÃO AO LONGO DO TEMPO DO AU LIVRE E DOS NANO BIOHERBICIDAS NAS *Lemnas*

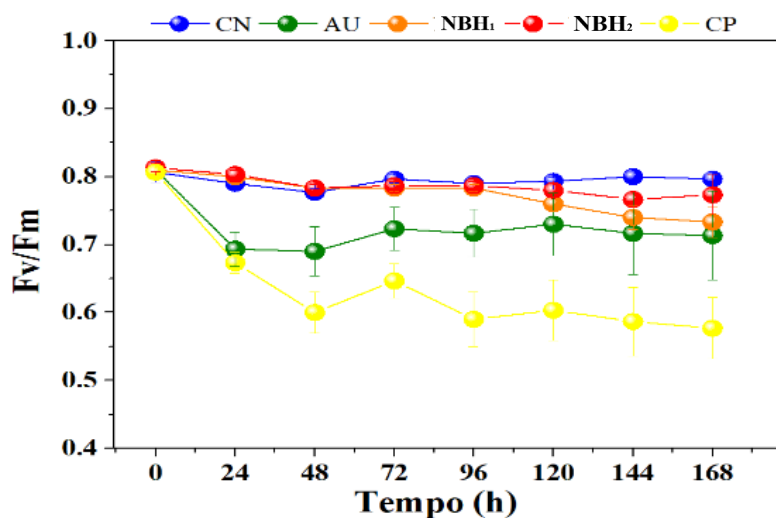
Para melhor entendimento dos efeitos a longo prazo de exposição, foi escolhido a concentração menor de 31,25 ppm e foram colocadas nas plantas por um período de 168 horas, e avaliamos os mesmos parâmetros ao longo do tempo, desta vez colocamos um controle positivo (CP = Diuron) para ter um parâmetro de efeitos, nossos resultados estão representados nas **Figuras 31 e 32** para Fv/Fm com as imagens das fluorescências clorofiladas das *Lemnas* e o valor de Fv/Fm ao longo do tempo.

Figura 31. Imagens de fluorescência cinética das folhas das *Lemnas*, ao longo do tempo, expostas a concentração de 31,25 ppm de AU, avaliadas pelo parâmetro Fv/Fm.



Fonte: Autor

Figura 32. Média dos valores de Fv/Fm em função do tempo, expostas a concentração fixa de AU livre e nos nanocarreadores (31,25 ppm) e grupos controles (CN = água deionizada, CP = Diuron (20μM)).

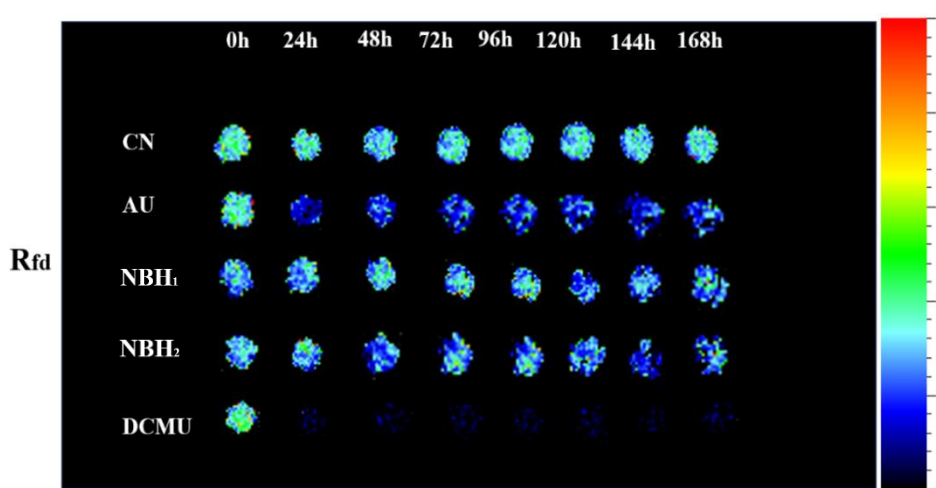


Fonte: Autor

Apesar das folhas não ficarem totalmente amarelas e necrosarem, como nas concentrações mais altas, e notável que existe uma diminuição na eficiência quântica principalmente no controle positivo e no AU, mas também podemos notar que existe uma resposta mais lenta dos nanocarreadores que começa a mostrar efeitos mais significativos a partir das 96h (**Figura 32**), essa demora nos efeitos é esperada visto que as nanopartículas liberam mais lentamente AU.

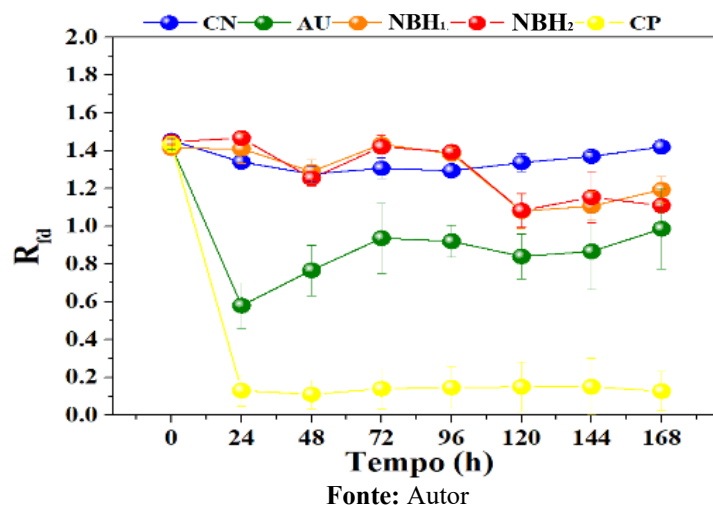
Os resultados do índice de vitalidade do FSII (R_{fd}) estão representados nas **Figuras 33** e **34**, é notável a grande diferença na intensidade de fluorescência entre grupos controles e do AU livre com os nanocarreadores que por sua vez não diferem muito nas imagens.

Figura 33. Imagens de fluorescência cinética das folhas das Lemnas, ao longo do tempo, expostas a concentração de 31,25 ppm de AU, avaliadas pelo parâmetro R_{fd} .



Fonte: Autor

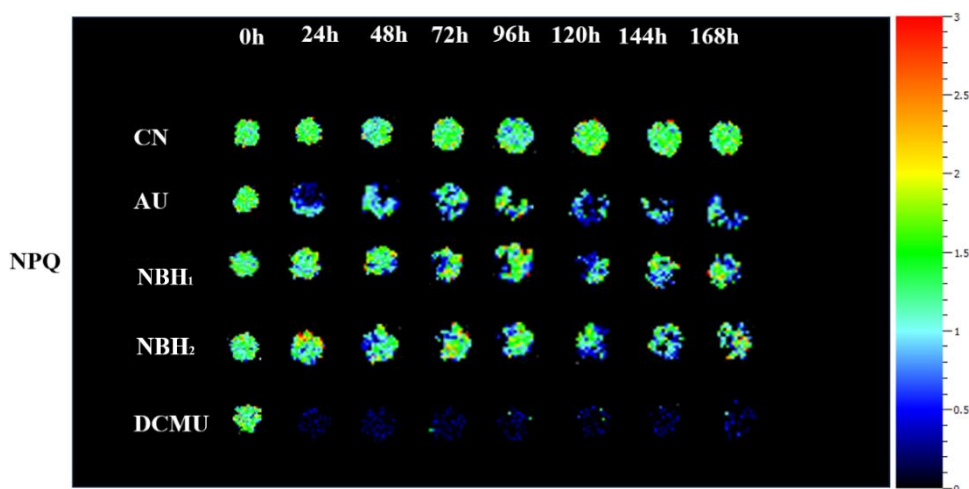
Figura 34. Média dos valores de R_{fd} em função do tempo, expostas a concentração fixa de AU livre e nos nanocarreadores (31,25 ppm) e grupos controles (CN = água deionizada, CP = Diuron (20 μ M)).



O índice de vitalidade para as plantas expostas aos nanocarreadores se mantiveram praticamente constantes até as 96h. Novamente após esse tempo podemos observar uma queda considerável e de maneira semelhante em ambas (NBH1 e NBH2), proveniente da liberação mais lenta do AU de ambos nanocarreadores, mas que se manteve até 168h, diferentemente o AU livre apesar de ter uma queda de mais de 50% em 24h, não se manteve, e começou a aumentar ao longo do tempo, o que pode sugerir um efeito de recuperação das plantas, uma vez que o AU está livre e pode ter um efeito imediato mas não duradouro.

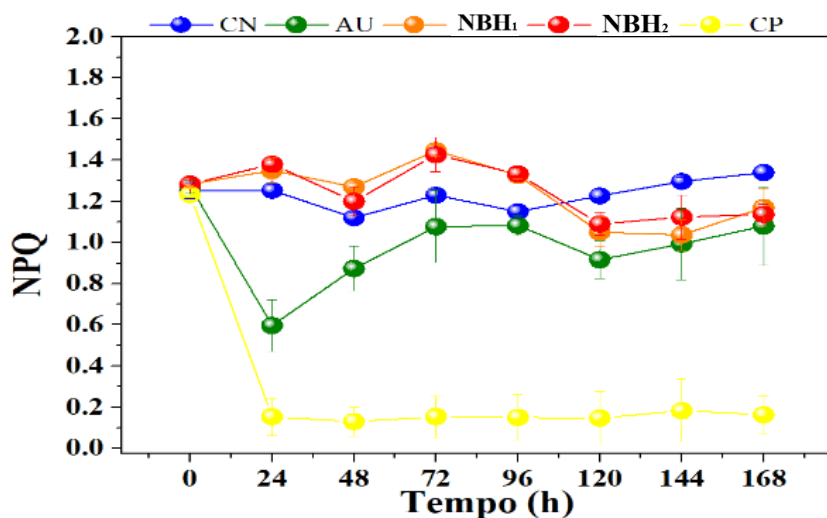
Os resultados da supressão não fotoquímica (NPQ) estão representados nas **Figuras 35 e 36**, é notável a grande diferença na intensidade de fluorescência entre grupos controles e do AU livre com os nanocarreadores.

Figura 35. Imagens de fluorescência cinética das folhas das Lemnas, ao longo do tempo, expostas a concentração de 31,25 ppm de AU, avaliadas pelo parâmetro NPQ



Fonte: Autor

Figura 36. Média dos valores de NPQ em função do tempo, expostas a concentração fixa de AU livre e nos nanocarreadores (31,25 ppm) e grupos controles (CN = água deionizada, CP = Diuron (20 μ M)) .



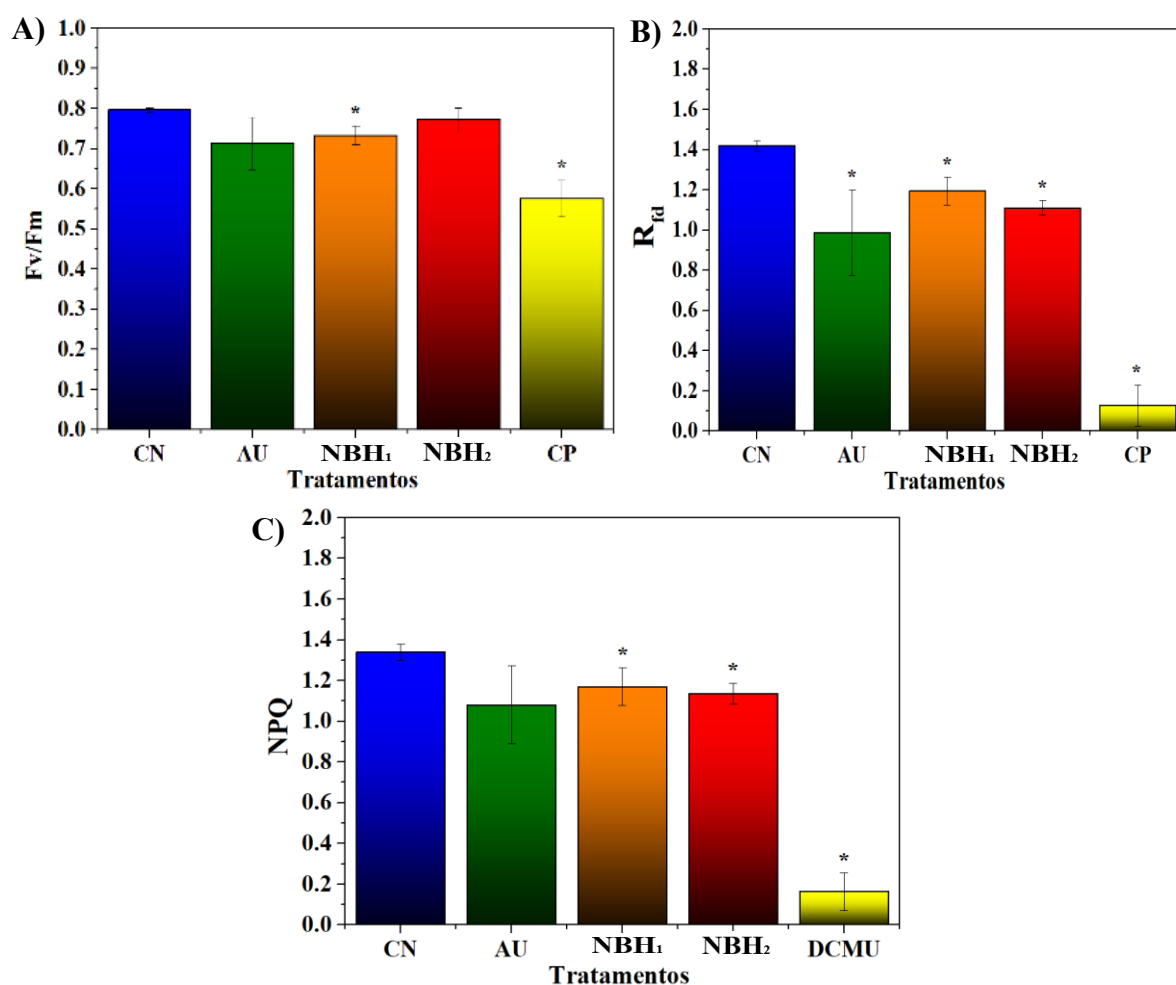
Fonte: Autor

No caso da supressão não fotoquímica pode se notar que em ambos nanocarreadores existe uma tendência de subir o valor médio do NPQ, e que deve estar diretamente relacionado ao fato das plantas não estar conseguindo utilizar a energia fotoquímica, o que faz com que a planta, tenha que perder energia por processos não-fotoquímicos. Após 96h novamente a uma inversão e começa a ter uma queda da supressão não fotoquímica para os nanocarreadores. Os controles se mantiveram praticamente

constantes ao longo desses períodos, mas com intensidade inversamente proporcionais, o que é esperado para os grupos controles.

Por fim, para nível de comparação fizemos um gráfico no tempo de 168h comparando cada grupo com o controle negativo.

Figura 37. Média dos valores de: A) F_v/F_m , B) R_{fd} e C) NPQ no tempo de 168h após serem expostas a concentração fixa de AU livre e os nanocarreadores (31,25 ppm) e grupos controles (CN = água deionizada, CP = Diuron (20 μ M)) ; * Diferença significativa em relação à amostra (CN) (Teste T-Student, $p \leq 0,05$).



Fonte: Autor

Esses resultados indicam que tanto o AU livre quanto os nanocarreadores têm impactos negativos sobre a eficiência fotoquímica e vitalidade do fotossistema II das plantas, com efeitos mais pronunciados observados para o AU livre, provavelmente por estar totalmente disponível quando aplicado nas plantas. Enquanto os nanocarreadores por levarem um tempo para liberar, levam um tempo a mais para manifestar os efeitos; entretanto esse efeito tende a ser mais duradouro por manter uma concentração mais efetiva por mais tempo.

De maneira geral ao analisar os resultados obtidos nos estudos de fluorescência cinética das plantas *Lemnas* expostas ao ácido úsnico (AU) livre e aos nanocarreadores (NBH₁ e NBH₂), torna-se evidente que esses compostos apresentam potencial como nano bioherbicidas. Os dados revelam uma significativa redução na eficiência quântica fotoquímica do fotossistema II (Fv/Fm) e nos índices de vitalidade do fotossistema II (Rfd) e supressão não-fotoquímica (NPQ) em resposta à exposição tanto ao AU livre quanto aos nanocarreadores, especialmente em concentrações mais elevadas.

Esses resultados são consistentes com os achados de outros estudos, que demonstram a forte atividade fitotóxica do AU e seus dois enantiômeros, resultando em branqueamento dos tecidos cotiledonares das plântulas em desenvolvimento (Romagni et al., 2000). Nesse trabalho fizeram uma análise dos mecanismos de ação do AU revelou que sua atividade não está associada à inibição da via Biosintética da clorofila, mas sim à desestabilização do aparelho fotossintético, semelhante à inibição da síntese de carotenoides. O AU foi identificado como um inibidor potente e irreversível da enzima 4-HidroxiPhenil Piruvate Dioxigenase (HPPD), resultando em sintomas de branqueamento devido ao bloqueio do plastoquinona (PQ), um cofator essencial da enzima fitoeno dessaturase (Ellis et al., 1995; Schrader et al., 2000; Shino et al., 2018).

Os carotenoides desempenham um papel importante na extinção do excesso de energia de excitação no aparelho fotossintético (Götze & Lokstein, 2023). Sob condições normais, a clorofila atinge o estado de excitação singleto após a absorção de um fóton (Q. Li et al., 2023). A clorofila no estado singleto transfere um elétron para plastoquinonas e retorna ao estado fundamental rapidamente ao receber um elétron da divisão da água sob intensidade excessiva de luz, a clorofila pode atingir o estado tripleto mais estável. Esse excesso de energia é transferido para os carotenoides através do cruzamento intersistemas e consequentemente é liberado de forma não irradiante, permitindo que as moléculas de clorofila retornem ao estado fundamental e evitando a fotodestruição (Romagni et al., 2000). Na ausência de carotenoides, o aparelho fotossintético é desestabilizado (Santabarbara et al., 2012).

De maneira geral, outros trabalhos na literatura já demonstram que o AU tem efeito nas atividades fotossintéticas das plantas, Orús, e colaboradores, (1981) reportaram que o AU suprimiu atividade em cloroplastos de carvalho (*Quercus rotundifolia*). O AU não apenas diminui a concentração de clorofila, mas também destruiu a conformação dos conjuntos de pigmentos da antena, afetando a eficiência da transferência de energia

luminosa (Strasser et al., 2004). Estudos posteriores sugeriram que a redução dos pigmentos fotossintéticos pelo AU pode ser atribuída tanto a uma diminuição de síntese quanto a um aumento nos processos de degradação (Latkowska et al., 2006b)

Mais recentemente (Y. Gao et al., 2018c) demonstram que o AU em altas concentrações destroem clorofilas e carotenoides e alteram a relação Chl a/b, o que resulta numa alteração da estrutura e atividade do aparelho fotossintético. Além dos efeitos já observados e relatados na literatura sobre o AU, as nanoformulações podem estar interagindo de maneira mais eficiente, visto que tivemos diferença significativas mesmos em baixas concentrações em todos os parâmetros avaliados.

Esses efeitos devem estar diretamente relacionados a liberação mais lenta, como já demonstrada nesse trabalho, que proporciona um efeito melhor, por se manter mais tempo na concentração efetiva. Mas também, pode ser um efeito de área superficial, uma vez que a NBH₁ possui um menor tamanho que NBH₂ e consequentemente leva a ter uma área de contato muito maior, o que pode justificar ser mais efetiva. Além disso, em outro estudo, já demonstraram que NPs de CNPPV, produzem espécies reativas de oxigênio (Caires et al., 2023b). As EROs têm efeitos significativos no PSII nas plantas. EROs, como a oxigênio singlete, são produzidos durante a iluminação e podem danificar pigmentos, lipídios, proteínas e outros componentes celulares em ambientes de complexos contendo clorofila (Sperdouli et al., 2021).

Portanto, os resultados combinados dos estudos de fluorescência cinética, juntamente com as descobertas sobre os mecanismos de ação do ácido úsnico da literatura, fortalecem a tese de que o AU e seus nanocarreadores têm potencial como nano bioherbicidas para o controle de plantas daninhas e outras aplicações agrícolas. Esses achados destacam a importância do desenvolvimento de estratégias de formulação e aplicação para maximizar a eficácia e minimizar os impactos ambientais desses compostos.

4 CONCLUSÃO

Este capítulo proporcionou uma análise abrangente sobre a síntese e caracterização de nanocarreadores de AU utilizando o polímero conjugado CNPPV como matriz polimérica, e sua potencial aplicação como nanobioherbicida. Ao longo das investigações, uma variedade de técnicas analíticas foi empregada para compreender as propriedades físico-químicas das nanoformulações, seu comportamento de liberação controlada de AU.

A caracterização das nanoformulações revelou diferenças significativas em suas propriedades físicas e estabilidade coloidal ao longo do tempo, influenciadas pela concentração de polímero e pela presença de AU. Enquanto os NBH₁ e NBH₂ apresentaram distribuições monomodais e estabilidade coloidal relativamente superior, a NPs 0 mostrou agregação e uma distribuição bimodal. Esses resultados sugerem uma relação direta entre a quantidade de polímero, AU carregado e as propriedades das nanopartículas, destacando a importância da formulação na cinética de liberação.

A liberação controlada de AU foi observada em ambas as nanoformulações, com mecanismos de transporte não-Fickiano predominantes. A fotorresponsividade da nanoformulação NBH₂ à luz azul, sugere a viabilidade de desencadear a liberação do AU em resposta a estímulos externos, mostrando potencial para aplicações direcionadas.

Além disso, os estudos de interação com clorofila, mostrou que o AU livre e as nanoformulações tem um potencial de suprimir a fluorescência da clorofila, e demonstramos que essa supressão é do tipo estática. A fitotoxicidade em *Lemnas* revelaram efeitos significativos das nanoformulações sobre os processos fotofísicos das espécies presentes, resultando em redução na eficiência quântica fotoquímica do fotossistema II e nos índices de vitalidade das plantas expostas. A análise detalhada dos efeitos de longo prazo mostrou uma resposta mais lenta das nanoformulações, com impactos mais significativos em concentrações mais baixas e ao longo do tempo.

Em suma, os resultados obtidos neste capítulo fornecem informações valiosas sobre o desenvolvimento de nanocarreadores de AU para aplicações como nanobioherbicidas. No entanto, são necessárias mais pesquisas para elucidar os mecanismos de ação, avaliar os impactos ambientais e garantir a segurança e eficácia dessas nanoformulações em aplicações práticas

5 REFERÊNCIAS

- ANVISA. (2003). *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos métodos analíticos*.
https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/res0899_29_05_2003.html
- Barbosa, J. A. P., Franco, E. S., Silva, C. V. N. S., Bezerra, T. O., Santana, M. A. N., Júnior, C. H. R. C., Silva, T. G., Santos, N. P. S., & Maia, M. B. S. (2017). Poly- ϵ -Caprolactone Microsphere Polymers Containing Usnic Acid: Acute Toxicity and Anti-Inflammatory Activity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 1–9.
<https://doi.org/10.1155/2017/7392891>
- Battista, S., Campitelli, P., Galantini, L., Köber, M., Vargas-Nadal, G., Ventosa, N., & Giansanti, L. (2020). Use of N-oxide and cationic surfactants to enhance antioxidant properties of (+)-usnic acid loaded liposomes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 585, 124154. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.124154>
- Caires, A. R. L., Lima, T. H. N., & Abelha, T. F. (2023a). Conjugated polymer nanoparticles with tunable antibacterial photodynamic capability. *Materials Advances*, 4(7), 1664–1670.
<https://doi.org/10.1039/d2ma00970f>
- Caires, A. R. L., Lima, T. H. N., & Abelha, T. F. (2023b). Conjugated polymer nanoparticles with tunable antibacterial photodynamic capability. *Materials Advances*, 4(7), 1664–1670.
<https://doi.org/10.1039/D2MA00970F>
- Camara, M. C., Campos, E. V. R., Monteiro, R. A., do Espírito Santo Pereira, A., de Freitas Proença, P. L., & Fraceto, L. F. (2019). Development of stimuli-responsive nano-based pesticides: emerging opportunities for agriculture. *Journal of Nanobiotechnology*, 17(1), 100. <https://doi.org/10.1186/s12951-019-0533-8>
- Chen, C., Zhang, G., Dai, Z., Xiang, Y., Liu, B., Bian, P., Zheng, K., Wu, Z., & Cai, D. (2018). Fabrication of light-responsively controlled-release herbicide using a nanocomposite. *Chemical Engineering Journal*, 349, 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.05.079>
- Chen, X., Sun, Y., Mo, X., Gao, Q., Deng, Y., Hu, M., Zou, J., Nie, J., & Zhang, Y. (2021). On-site, rapid and visual method for nanomolar Hg 2+ detection based on the thymine–Hg 2+ –thymine triggered “double” aggregation of Au nanoparticles enhancing the Tyndall effect. *RSC Advances*, 11(58), 36859–36865.
<https://doi.org/10.1039/D1RA07211K>

- Chi, Y., Zhang, G., Xiang, Y., Cai, D., & Wu, Z. (2017). Fabrication of a Temperature-Controlled-Release Herbicide Using a Nanocomposite. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 5(6), 4969–4975. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b00348>
- Costa, P., & Sousa Lobo, J. M. (2001). Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(2), 123–133. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(01\)00095-1](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(01)00095-1)
- da Silva Santos, N. P., Nascimento, S. C., Wanderley, M. S. O., Pontes-Filho, N. T., da Silva, J. F., de Castro, C. M. M. B., Pereira, E. C., da Silva, N. H., Honda, N. K., & Santos-Magalhães, N. S. (2006). Nanoencapsulation of usnic acid: An attempt to improve antitumour activity and reduce hepatotoxicity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 64(2), 154–160. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2006.05.018>
- Dias Júnior, L. C., & Novo, J. B. M. (2014). Software for simulation of luminescence quenching mechanism: the stern-volmer kinetic model. *Química Nova*, 37(2). <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140060>
- Dukhin, A. S., & Xu, R. (2020). Zeta-potential measurements. In *Characterization of Nanoparticles* (pp. 213–224). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814182-3.00014-6>
- Ellis, M. K., Whitfield, A. C., Gowans, L. A., Auton, T. R., Provan, W. M., Lock, E. A., & Smith, L. L. (1995). Inhibition of 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase by 2-(2-Nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-cyclohexane-1,3-dione and 2-(2-Chloro-4-methanesulfonylbenzoyl)-cyclohexane-1,3-dione. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 133(1), 12–19. <https://doi.org/10.1006/taap.1995.1121>
- Farkas, N., & Kramar, J. A. (2021). Dynamic light scattering distributions by any means. *Journal of Nanoparticle Research*, 23(5), 120. <https://doi.org/10.1007/s11051-021-05220-6>
- Fedatto Abelha, T., & Rodrigues Lima Caires, A. (2021). Light-Activated Conjugated Polymers for Antibacterial Photodynamic and Photothermal Therapy. *Advanced NanoBiomed Research*, 1(7). <https://doi.org/10.1002/anbr.202100012>
- Feng, Y., Wang, N., & Ju, H. (2018). Highly Efficient Electrochemiluminescence of Cyanovinylene-Contained Polymer Dots in Aqueous Medium and Its Application in Imaging Analysis. *Analytical Chemistry*, 90(2), 1202–1208. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b03821>

- Feria, D. N., Luo, Y.-S., Hsu, B.-K., Tseng, Y.-C., Lian, J.-T., & Lin, T.-Y. (2022). Large photoluminescence enhancement in the chlorophyll from the energy transfer in perovskite–chlorophyll hybrid derivatives. *Applied Physics Letters*, 121(26). <https://doi.org/10.1063/5.0122902>
- Francis Richards, B. A., & Thomas Thompson, W. G. (n.d.). *THE ESTIMATION AND CHARACTERIZATION OF PLANKTON POPULATIONS BY PIGMENT ANALYSES II. A SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR THE ESTIMATION OF PLANKTON PIGMENTS I*.
- Francolini, I., Giansanti, L., Piozzi, A., Altieri, B., Mauceri, A., & Mancini, G. (2019). Glucosylated liposomes as drug delivery systems of usnic acid to address bacterial infections. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 181, 632–638. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.05.056>
- Fuglie, K. (2021). Climate change upsets agriculture. *Nature Climate Change*, 11(4), 294–295. <https://doi.org/10.1038/s41558-021-01017-6>
- Gao, Y., Liu, W., Wang, X., Yang, L., Han, S., Chen, S., Strasser, R. J., Valverde, B. E., & Qiang, S. (2018a). Comparative phytotoxicity of usnic acid, salicylic acid, cinnamic acid and benzoic acid on photosynthetic apparatus of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 128, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.04.037>
- Gao, Y., Liu, W., Wang, X., Yang, L., Han, S., Chen, S., Strasser, R. J., Valverde, B. E., & Qiang, S. (2018b). Comparative phytotoxicity of usnic acid, salicylic acid, cinnamic acid and benzoic acid on photosynthetic apparatus of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 128, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.04.037>
- Garg, A., Garg, S., Sahu, N. K., Rani, S., Gupta, U., & Yadav, A. K. (2019a). Heparin appended ADH-anionic polysaccharide nanoparticles for site-specific delivery of usnic acid. *International Journal of Pharmaceutics*, 557, 238–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.12.049>
- Garg, A., Garg, S., Sahu, N. K., Rani, S., Gupta, U., & Yadav, A. K. (2019b). Heparin appended ADH-anionic polysaccharide nanoparticles for site-specific delivery of usnic acid. *International Journal of Pharmaceutics*, 557, 238–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.12.049>
- Ghosh, S., Sarkar, B., & Thongmee, S. (2022). Nanoherbicides for field applications. In *Agricultural Nanobiotechnology* (pp. 439–463). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91908-1.00010-9>

- Goswami, L., Kim, K.-H., Deep, A., Das, P., Bhattacharya, S. S., Kumar, S., & Adelodun, A. A. (2017). Engineered nano particles: Nature, behavior, and effect on the environment. *Journal of Environmental Management*, 196, 297–315. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.01.011>
- Götze, J. P., & Lokstein, H. (2023). *Excitation energy transfer between higher excited states of photosynthetic pigments: 1. Carotenoids facilitate $B \rightarrow Q$ band conversion in chlorophylls*. <https://doi.org/10.1101/2023.01.26.525634>
- Gougherty, A. V., & Davies, T. J. (2021). Towards a phylogenetic ecology of plant pests and pathogens. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 376(1837), 20200359. <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0359>
- Grey, J. K., Kim, D. Y., Norris, B. C., Miller, W. L., & Barbara, P. F. (2006). Size-Dependent Spectroscopic Properties of Conjugated Polymer Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(51), 25568–25572. <https://doi.org/10.1021/jp065990a>
- Gruber, E., Kjær, C., Nielsen, S. B., & Andersen, L. H. (2019). Intrinsic Photophysics of Light-harvesting Charge-tagged Chlorophyll *a* and *b* Pigments. *Chemistry – A European Journal*, 25(39), 9153–9158. <https://doi.org/10.1002/chem.201901786>
- Inam, W., Bhadane, R., Akpolat, R. N., Taiseer, R. A., Filippov, S. K., Salo-Ahen, O. M. H., Rosenholm, J. M., & Zhang, H. (2022). Interactions between polymeric nanoparticles and different buffers as investigated by zeta potential measurements and molecular dynamics simulations. *VIEW*, 3(4). <https://doi.org/10.1002/VIW.20210009>
- Kah, M., Beulke, S., Tiede, K., & Hofmann, T. (2013). Nanopesticides: State of Knowledge, Environmental Fate, and Exposure Modeling. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 43(16), 1823–1867. <https://doi.org/10.1080/10643389.2012.671750>
- Kalisz, A., Kornaś, A., Skoczowski, A., Oliwa, J., Jurkow, R., Gil, J., Sękara, A., Sałata, A., & Caruso, G. (2023). Leaf chlorophyll fluorescence and reflectance of oakleaf lettuce exposed to metal and metal(oid) oxide nanoparticles. *BMC Plant Biology*, 23(1), 329. <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04305-9>
- Khanbeigi, R. A., Hashim, Z., Abelha, T. F., Pitchford, S., Collins, H., Green, M., & Dailey, L. A. (2015). Interactions of stealth conjugated polymer nanoparticles with human whole blood. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(12), 2463–2471. <https://doi.org/10.1039/c4tb01822b>
- Korsmeyer, R. W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P., & Peppas, N. A. (1983). Mechanisms of Potassium Chloride Release from Compressed, Hydrophilic, Polymeric Matrices: Effect

- of Entrapped Air. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 72(10), 1189–1191. <https://doi.org/10.1002/jps.2600721021>
- Kralchevsky, P. A., Danov, K. D., & Petkov, P. V. (2016). Soft electrostatic repulsion in particle monolayers at liquid interfaces: surface pressure and effect of aggregation. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 374(2072), 20150130. <https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0130>
- Kubiak, A., Wolna-Maruwka, A., Niewiadomska, A., & Pilarska, A. A. (2022). The Problem of Weed Infestation of Agricultural Plantations vs. the Assumptions of the European Biodiversity Strategy. *Agronomy*, 12(8), 1808. <https://doi.org/10.3390/agronomy12081808>
- Latkowska, E., Lechowski, Z., Bialczyk, J., & Pilarski, J. (2006). Photosynthesis and Water Relations in Tomato Plants Cultivated Long-Term in Media Containing (+)-Usnic Acid. *Journal of Chemical Ecology*, 32(9), 2053–2066. <https://doi.org/10.1007/s10886-006-9128-6>
- Leung, M. H. M., & Shen, A. Q. (2018). Microfluidic Assisted Nanoprecipitation of PLGA Nanoparticles for Curcumin Delivery to Leukemia Jurkat Cells. *Langmuir*, 34(13), 3961–3970. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b04335>
- Li, N.-N., Fu, C.-P., & Zhang, L.-M. (2014). Using casein and oxidized hyaluronic acid to form biocompatible composite hydrogels for controlled drug release. *Materials Science and Engineering: C*, 36, 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.12.025>
- Li, Q., Orcutt, K., Cook, R. L., Sabines-Chesterking, J., Tong, A. L., Schlau-Cohen, G. S., Zhang, X., Fleming, G. R., & Whaley, K. B. (2023). Single-photon absorption and emission from a natural photosynthetic complex. *Nature*, 619(7969), 300–304. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06121-5>
- Liu, L. (2015). Aggregation of silica nanoparticles in an aqueous suspension. *AIChE Journal*, 61(7), 2136–2146. <https://doi.org/10.1002/aic.14839>
- Marimuthu, S., Pavithran, P., & Gowtham, G. (2022). Polymeric Systems for the Delivery of Herbicides to Improve Weed Control Efficiency. In *Pesticides - Updates on Toxicity, Efficacy and Risk Assessment*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.104629>
- Marques, S. S., Ramos, I. I., Fernandes, S. R., Barreiros, L., Lima, S. A. C., Reis, S., Domingues, M. R. M., & Segundo, M. A. (2020). Insights on Ultrafiltration-Based Separation for the Purification and Quantification of Methotrexate in Nanocarriers. *Molecules*, 25(8), 1879. <https://doi.org/10.3390/molecules25081879>

- Moraes, C. M., de Matos, A. P., de Paula, E., Rosa, A. H., & Fraceto, L. F. (2009). Benzocaine loaded biodegradable poly-(d,l-lactide-co-glycolide) nanocapsules: factorial design and characterization. *Materials Science and Engineering: B*, 165(3), 243–246. <https://doi.org/10.1016/j.mseb.2009.06.011>
- Morassuti, C. Y., F. Abelha, T., Gonçalves, D. A., Oliveira, S. L., & Caires, A. R. L. (2022). Multienergy Calibration Applied for the Quantification of Polymer Concentration in Conjugated Polymer Nanoparticles. *Macromolecules*, 55(24), 10865–10869. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.2c02201>
- Oforu, R., Agyemang, E. D., Márton, A., Pásztor, G., Taller, J., & Kazinczi, G. (2023). Herbicide Resistance: Managing Weeds in a Changing World. *Agronomy*, 13(6), 1595. <https://doi.org/10.3390/agronomy13061595>
- Orús, M. I., Estévez, M. F., & Vicente, C. (1981). Manganese depletion in chloroplasts of *Quercus rotundifolia* during chemical simulation of lichen epiphytic states. *Physiologia Plantarum*, 52(2), 263–266. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1981.tb08503.x>
- Pathak, V. M., Verma, V. K., Rawat, B. S., Kaur, B., Babu, N., Sharma, A., Dewali, S., Yadav, M., Kumari, R., Singh, S., Mohapatra, A., Pandey, V., Rana, N., & Cunill, J. M. (2022). Current status of pesticide effects on environment, human health and it's eco-friendly management as bioremediation: A comprehensive review. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.962619>
- Paula, A., & Mendes, P. (2019). *UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS “CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DE CLOREXIDINA EM NANOCOMPÓSITO DE MAGNETITA E QUITOSANA.”*
- Photon Systems. (2019). *FluorCam Manual de Instruções e Guia do Usuário*. <http://www.psi.cz>
- Rajput, V. D., Minkina, T., Sushkova, S., Mandzhieva, S., Fedorenko, A., Lysenko, V., Bederska-Błaszczuk, M., Olchowik, J., Tsitsuashvili, V., & Chaplygin, V. (2019). Structural and Ultrastructural Changes in Nanoparticle Exposed Plants. In *Nanoscience for Sustainable Agriculture* (pp. 281–295). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-97852-9_13
- Ribeiro-Costa, R. M., Alves, A. J., Santos, N. P., Nascimento, S. C., Gonçalves, E. C. P., Silva, N. H., Honda, N. K., & Santos-Magalhães, N. S. (2004). *In vitro* and *in vivo* properties of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres. *Journal of Microencapsulation*, 21(4), 371–384. <https://doi.org/10.1080/02652040410001673919>

- Ritger, P. L., & Peppas, N. A. (1987). A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *Journal of Controlled Release*, 5(1), 23–36. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(87\)90034-4](https://doi.org/10.1016/0168-3659(87)90034-4)
- Robert J. Porra. (2002). estr. clor 2. *Photosynthesis Research*.
- Rojas, S., Rodríguez-Diéguez, A., & Horcajada, P. (2022). Metal–Organic Frameworks in Agriculture. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 14(15), 16983–17007. <https://doi.org/10.1021/acsami.2c00615>
- Romagni, J. G., Meazza, G., Nanayakkara, N. P. D., & Dayan, F. E. (2000). The phytotoxic lichen metabolite, usnic acid, is a potent inhibitor of plant *p* -hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *FEBS Letters*, 480(2–3), 301–305. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01907-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01907-4)
- Santabarbara, S., Casazza, A. P., Ali, K., Economou, C. K., Wannathong, T., Zito, F., Redding, K. E., Rappaport, F., & Purton, S. (2012). The Requirement for Carotenoids in the Assembly and Function of the Photosynthetic Complexes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 161(1), 535–546. <https://doi.org/10.1104/pp.112.205260>
- Santos, N. P., Nascimento, S. C., Silva, J. F., Pereira, E. C. G., Silva, N. H., Honda, N. K., & Santos-Magalhães, N. S. (2005). Usnic acid-loaded nanocapsules: an evaluation of cytotoxicity. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 15(5), 355–361. [https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(05\)50065-0](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(05)50065-0)
- Saravanan, R., Mansoob Khan, M., Gupta, V. K., Mosquera, E., Gracia, F., Narayanan, V., & Stephen, A. (2015). ZnO/Ag/CdO nanocomposite for visible light-induced photocatalytic degradation of industrial textile effluents. *Journal of Colloid and Interface Science*, 452, 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.04.035>
- Saravanan, R., Thirumal, E., Gupta, V. K., Narayanan, V., & Stephen, A. (2013). The photocatalytic activity of ZnO prepared by simple thermal decomposition method at various temperatures. *Journal of Molecular Liquids*, 177, 394–401. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2012.10.018>
- Scher, H. B. (2023). *Controlled-Release Delivery Systems for Pesticides*. Routledge. <https://doi.org/10.1201/9781315140353>
- Schmitt, S., Renzer, G., Benrath, J., Best, A., Jiang, S., Landfester, K., Butt, H.-J., Simonutti, R., Crespy, D., & Koynov, K. (2022). Monitoring the Formation of Polymer Nanoparticles

- with Fluorescent Molecular Rotors. *Macromolecules*, 55(16), 7284–7293. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.2c01132>
- Schneider, J., Jallouk, A. P., Vasquez, D., Thomann, R., Forget, A., Pino, C. J., & Shastri, V. P. (2013). Surface Functionality as a Means to Impact Polymer Nanoparticle Size and Structure. *Langmuir*, 29(12), 4092–4095. <https://doi.org/10.1021/la304075c>
- Schrader, K. K., Dayan, F. E., Allen, S. N., de Regt, M. Q., Tucker, C. S., & Paul, Jr., R. N. (2000). 9,10-Anthraquinone Reduces the Photosynthetic Efficiency of *Oscillatoria perornata* and Modifies Cellular Inclusions. *International Journal of Plant Sciences*, 161(2), 265–270. <https://doi.org/10.1086/314255>
- Schwartz, B. J. (2003). Conjugated Polymers as Molecular Materials: How Chain Conformation and Film Morphology Influence Energy Transfer and Interchain Interactions. *Annual Review of Physical Chemistry*, 54(1), 141–172. <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.54.011002.103811>
- Shen, M., Liu, S., Jiang, C., Zhang, T., & Chen, W. (2023a). Recent advances in stimuli-response mechanisms of nano-enabled controlled-release fertilizers and pesticides. *Eco-Environment & Health*, 2(3), 161–175. <https://doi.org/10.1016/j.eehl.2023.07.005>
- Shen, M., Liu, S., Jiang, C., Zhang, T., & Chen, W. (2023b). Recent advances in stimuli-response mechanisms of nano-enabled controlled-release fertilizers and pesticides. *Eco-Environment & Health*, 2(3), 161–175. <https://doi.org/10.1016/j.eehl.2023.07.005>
- Shen, M., Liu, S., Jiang, C., Zhang, T., & Chen, W. (2023c). Recent advances in stimuli-response mechanisms of nano-enabled controlled-release fertilizers and pesticides. *Eco-Environment & Health*, 2(3), 161–175. <https://doi.org/10.1016/j.eehl.2023.07.005>
- Shino, M., Hamada, T., Shigematsu, Y., Hirase, K., & Banba, S. (2018). Action mechanism of bleaching herbicide cyclopyrimorate, a novel homogentisate solanesyltransferase inhibitor. *Journal of Pesticide Science*, 43(4), 233–239. <https://doi.org/10.1584/jpestics.D18-008>
- Siqueira-Moura, M. P. de, Lira, M. C. B., & Santos-Magalhães, N. S. (2008). Validação de método analítico espectrofotométrico UV para determinação de ácido úsnico em lipossomas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 44(4), 621–628. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322008000400008>
- Sperdouli, I., Andreadis, S., Moustaka, J., Panteris, E., Tsaballa, A., & Moustakas, M. (2021). Changes in Light Energy Utilization in Photosystem II and Reactive Oxygen Species

- Generation in Potato Leaves by the Pinworm *Tuta absoluta*. *Molecules*, 26(10), 2984. <https://doi.org/10.3390/molecules26102984>
- Strasser, R. J., Tsimilli-Michael, M., & Srivastava, A. (2004). *Analysis of the Chlorophyll a Fluorescence Transient* (pp. 321–362). https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9_12
- Swapna, M. S., Raj, V., Devi, H. V. S., & Sankararaman, S. (2019). Optical emission diagnosis of carbon nanoparticle-incorporated chlorophyll for sensing applications. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 18(6), 1382–1388. <https://doi.org/10.1039/c8pp00454d>
- Tanaka, K., Kuramochi, H., Maeda, K., Takahashi, Y., Osako, M., & Suzuki, G. (2023). Size-Controlled Preparation of Polyethylene Nanoplastic Particles by Nanoprecipitation and Insights into the Underlying Mechanisms. *ACS Omega*, 8(16), 14470–14477. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c08233>
- Umar, S., Sulaiman, F., Abdullah, N., & Mohamad, S. N. (2018). *Investigation of the effect of pH adjustment on the stability of nanofluid*. 020031. <https://doi.org/10.1063/1.5066987>
- Urbano, L., Clifton, L., Ku, H. K., Kendall-Troughton, H., Vandera, K.-K. A., Matarese, B. F. E., Abelha, T., Li, P., Desai, T., Dreiss, C. A., Barker, R. D., Green, M. A., Dailey, L. A., & Harvey, R. D. (2018). Influence of the Surfactant Structure on Photoluminescent π -Conjugated Polymer Nanoparticles: Interfacial Properties and Protein Binding. *Langmuir*, 34(21), 6125–6137. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b00561>
- Vasarri, M., Ponti, L., Degl’Innocenti, D., & Bergonzi, M. C. (2022). Usnic Acid-Loaded Polymeric Micelles: An Optimal Migrastatic-Acting Formulation in Human SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. *Pharmaceuticals*, 15(10), 1207. <https://doi.org/10.3390/ph15101207>
- Verma, N., Bhatia, S., & Bedi, R. K. (2017). Role of pH on electrical, optical and photocatalytic properties of ZnO based nanoparticles. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 28(13), 9788–9797. <https://doi.org/10.1007/s10854-017-6732-x>
- Wang, D., Saleh, N. B., Byro, A., Zepp, R., Sahle-Demessie, E., Luxton, T. P., Ho, K. T., Burgess, R. M., Flury, M., White, J. C., & Su, C. (2022). Nano-enabled pesticides for sustainable agriculture and global food security. *Nature Nanotechnology*, 17(4), 347–360. <https://doi.org/10.1038/s41565-022-01082-8>
- Wang, L., Zhao, Q., Zhang, Z., Lu, Z., Zhao, Y., & Tang, Y. (2018). Fluorescent Conjugated Polymer/Quarternary Ammonium Salt Co-assembly Nanoparticles: Applications in Highly Effective Antibacteria and Bioimaging. *ACS Applied Bio Materials*, 1(5), 1478–1486. <https://doi.org/10.1021/acsbm.8b00422>

- Wang, Y., Peng, Z., Yang, Y., Li, Z., Wen, Y., Liu, M., Li, S., Su, L., Zhou, Z., Zhu, Y., & Zhou, N. (2022). Auricularia auricula biochar supported γ -FeOOH nanoarrays for electrostatic self-assembly and pH-responsive controlled release of herbicide and fertilizer. *Chemical Engineering Journal*, 437, 134984. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.134984>
- Xiao, W., Deng, Z., Huang, J., Huang, Z., Zhuang, M., Yuan, Y., Nie, J., & Zhang, Y. (2019). Highly Sensitive Colorimetric Detection of a Variety of Analytes via the Tyndall Effect. *Analytical Chemistry*, 91(23), 15114–15122. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03824>
- Xu, X., Bai, B., Wang, H., & Suo, Y. (2017). A Near-Infrared and Temperature-Responsive Pesticide Release Platform through Core–Shell Polydopamine@PNIPAm Nanocomposites. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(7), 6424–6432. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b15393>
- Ye, Z., Guo, J., Wu, D., Tan, M., Xiong, X., Yin, Y., & He, G. (2015). Photo-responsive shell cross-linked micelles based on carboxymethyl chitosan and their application in controlled release of pesticide. *Carbohydrate Polymers*, 132, 520–528. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.077>
- Yuan, K., Sun, Y., Liang, F., Pan, F., Hu, M., Hua, F., Yuan, Y., Nie, J., & Zhang, Y. (2022). Tyndall-effect-based colorimetric assay with colloidal silver nanoparticles for quantitative point-of-care detection of creatinine using a laser pointer pen and a smartphone. *RSC Advances*, 12(36), 23379–23386. <https://doi.org/10.1039/D2RA03598G>
- Zhang, Z., Yang, N., Yu, J., Jin, S., Shen, G., Chen, H., Yuzhen, N., Xiang, D., & Qian, K. (2023). Research Progress of a Pesticide Polymer-Controlled Release System Based on Polysaccharides. *Polymers*, 15(13), 2810. <https://doi.org/10.3390/polym15132810>

Capítulo 3 - Nanobioherbicidas por Microfluídica e Nanoprecipitação: Controle Coloidal e Desempenho Foto-Fisiológico

RESUMO

Este capítulo aborda o desafio de obter nanobioherbicidas (NBHs) com controle coloidal rigoroso e desempenho reprodutível, comparando microfluídica e nanoprecipitação. Dispositivos com canais de $\sim 200\ \mu\text{m}$ permitiram sintetizar NBHs com e sem surfactante Tween 20 (Tw) em regime estável; a $320\ \mu\text{L}/\text{min}$ não houve formação de agregados e obteve-se $\text{PDI} < 0,20$, com diâmetros decrescendo à medida que se aumentou o fluxo da fase aquosa. Em relação à nanoprecipitação, a microfluídica entregou tamanhos menores, polidispersividade inferior e maior reprodutibilidade, mantendo perfis de absorção e fluorescência sem alterações relevantes entre as rotas. Nos ensaios com *Lemna minor*, as formulações com Tw exibiram efeitos espectrais de fluorescência mais precoces; contudo, após 8 dias, não se observaram diferenças significativas entre NBHs com e sem Tw. Os parâmetros foto-fisiológicos (F_v/F_m , R_{fd} e NPQ) confirmaram efeito inibitório do PSII nas plantas tratadas, com destaque para redução de $\sim 50\%$ em R_{fd} frente ao controle, sem distinções consistentes entre as duas formulações. Em síntese, a microfluídica mostrou-se superior nas características físico-químicas (tamanho, PDI e estabilidade), enquanto os efeitos em plantas foram semelhantes entre NBHs com e sem Tw, estabelecendo a microfluídica como rota preferencial para controle coloidal sem comprometer a resposta biológica observada.

Palavras-chave :nanobioherbicidas; microfluídica; nanoprecipitação, fotoinibição do PSII.

ABSTRACT

This chapter addresses the challenge of achieving nanobioherbicides (NBHs) with rigorous colloidal control and reproducible performance by comparing microfluidics and nanoprecipitation. Devices with $\sim 200\ \mu\text{m}$ channels enabled the synthesis of NBHs with and without Tween 20 (Tw) under stable flow; at $320\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ no aggregates were observed and PDI remained < 0.20 , with particle diameters decreasing as the aqueous-phase flow rate increased. Relative to nanoprecipitation, microfluidics yielded smaller sizes, lower polydispersity, and higher reproducibility while preserving absorption and fluorescence profiles without relevant differences between routes. In assays with *Lemna minor*, Tw-containing formulations exhibited earlier spectral fluorescence effects; however, after 8 days no significant differences were observed between NBHs with and without Tw. Photophysiological parameters (F_v/F_m , R_{fd} , and NPQ) confirmed PSII inhibition in treated plants, notably an $\sim 50\%$ reduction in R_{fd} compared to the control, with no consistent distinctions between the two formulations. In summary, microfluidics proved superior in physicochemical attributes (size, PDI, stability), whereas plant responses were similar for NBHs with and without Tw, establishing microfluidics as the preferred route for colloidal control without compromising the observed biological response.

Keywords : nanobioherbicides; microfluidics; nanoprecipitation; PSII photoinhibition.

1 INTRODUÇÃO

A agricultura moderna enfrenta um dos seus maiores desafios: conciliar produtividade com sustentabilidade ambiental. O uso extensivo de agroquímicos, especialmente herbicidas, tem sido uma das principais estratégias para controle de plantas daninhas, mas seu uso indiscriminado acarreta impactos significativos no solo, na biodiversidade, na qualidade da água e na saúde humana (Goulson et al., 2018; Kah et al., 2013b). Além disso, a seleção de plantas daninhas resistentes tem tornado a aplicação de herbicidas cada vez menos eficaz. Nesse contexto, tecnologias emergentes, como a nanotecnologia, têm se mostrado promissoras para o desenvolvimento de formulações mais seletivas, eficientes e ambientalmente seguras (Kah et al., 2013b; Kookana et al., 2014; X. Li et al., 2025).

Tais sistemas oferecem vantagens como menor dose necessária, aumento da eficiência de absorção pelas plantas e redução dos impactos toxicológicos ao ambiente (Kookana et al., 2014; Fraceto et al., 2022). Dentre os compostos com potencial bioherbicida, destaca-se o ácido úsnico (AU), um metabólito secundário de líquens com conhecida atividade biológica. No entanto, sua baixa solubilidade em meio aquoso e elevada toxicidade dificultam sua aplicação direta em sistemas agrícolas (Croce et al., 2022a; Kulinowska et al., 2023).

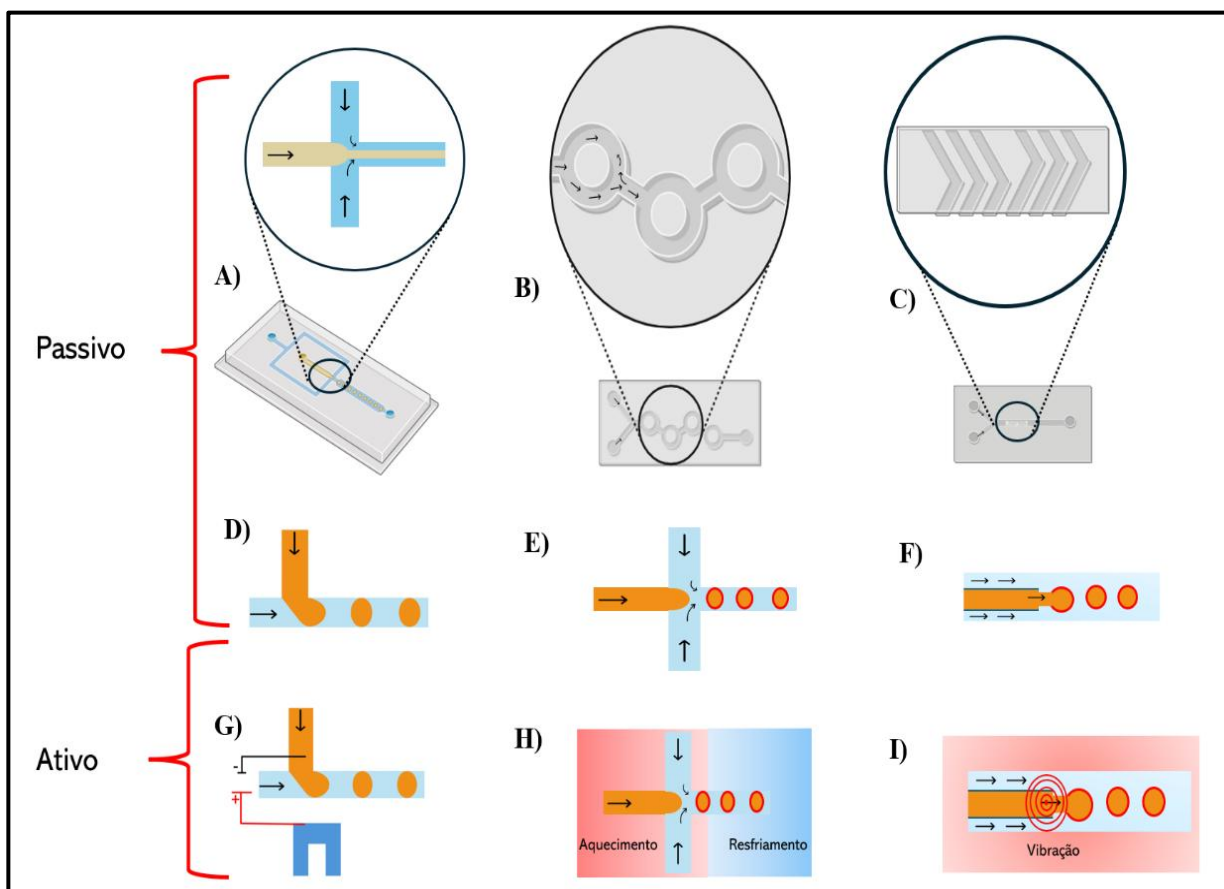
Para contornar essas limitações, a encapsulação do AU em nanocarreadores surge como uma estratégia viável. Entretanto, os métodos tradicionais de síntese de nanopartículas, como a nanoprecipitação por gotejamento, apresentam limitações quanto ao controle do tamanho, homogeneidade, eficiência de encapsulamento e reprodutibilidade entre lotes (Abelha et al., 2017a; Vreeland et al., 2015). Além disso, esses métodos muitas vezes demandam grandes volumes, tempos de processo prolongados e apresentam dificuldades de escalonamento.

Neste cenário, a microfluídica desponta como uma alternativa robusta e eficiente para a produção de nanopartículas com maior controle e precisão. Dispositivos microfluídicos são caracterizados por apresentarem canais em escala micrométrica onde os fluidos escoam em regime laminar, permitindo misturas altamente controladas e reprodutíveis (Hajam & Khan, 2024; Qin et al., 2025). Essa tecnologia permite a formação de nanopartículas com distribuição de tamanho estreita, alta estabilidade coloidal e maior eficiência de encapsulamento. Recentemente, diversos estudos têm demonstrado a

viabilidade da microfluídica para a produção de nanocarreadores para uso biomédico sendo uma tecnologia promissora também para aplicações agrícolas (Hajam & Khan, 2024; Seder et al., 2024). Em contraste com métodos como nanoprecipitação, a microfluídica oferece excelente replicabilidade entre lotes, melhor controle sobre o tamanho, a morfologia e a distribuição das nanopartículas sintetizadas, além de menor consumo de reagentes e escalabilidade (Niculescu et al., 2022)

Uma das funções centrais em microfluídica é o micromixing (ou micro mistura) (**Figura 1**), cujo objetivo é promover uma mistura rápida e eficiente dos reagentes nas escalas micro, onde a difusão domina e o fluxo convectivo é limitado.

Figura 1: Exemplos representativos de micromisturadores microfluídicos: Estratégias Passivas e Ativas: A) Micromisturador MHF, B) Micromisturador de anel, C) Micromisturador espinha de peixe, D) Interseção tipo T-junction, E) Interseção tipo flow-focusing F) Interseção tipo Y-junction, G) Interseção do tipo ativo com diferença de potencial, H) Interseção do tipo ativo com aquecimento/resfriamento I) Interseção do tipo ativo com vibração mecânica.



Fonte: Autor

A eficiência da mistura é um fator determinante na síntese de nanopartículas (NPs), pois a interação entre os fluidos é responsável pela nucleação e crescimento das partículas em escala nanométrica (H. M. Xia et al., 2015). Tanto o tempo de mistura (t_{mistura}) quanto sua uniformidade afetam diretamente o tamanho médio e a distribuição de tamanho das NPs, sendo que tempos de mistura mais curtos tendem a gerar partículas menores e com menor índice de polidispersão (PDI) (H. M. Xia et al., 2015). Em sistemas microfluídicos e outros métodos do tipo bottom-up, essas variáveis são controladas principalmente pela relação entre o tempo de mistura e o tempo de precipitação ($t_{\text{precipitação}}$) (Moody & Collins, 2003). Quando $t_{\text{mistura}} < t_{\text{precipitação}}$ os solventes e antissolventes se misturam rapidamente, antes do início da precipitação, resultando em NPs menores e com PDI reduzido (Agha et al., 2023; Moody & Collins, 2003).

Por outro lado, quando $t_{\text{mistura}} > t_{\text{precipitação}}$ a precipitação ocorre em um ambiente com gradiente de concentração, o que favorece a formação de partículas maiores e com distribuição mais heterogênea (L. Zhang et al., 2020). Em métodos convencionais de síntese, a reação ocorre em volumes milimétricos ou centímetros, onde flutuações locais de concentração dificultam o controle de nucleação e crescimento das NPs (com $t_{\text{mistura}} > t_{\text{precipitação}}$). Já em microcanais, onde as dimensões são micrométricas, a maior homogeneidade espacial permite que o tempo de mistura seja menor que o tempo de precipitação ($t_{\text{mistura}} < t_{\text{precipitação}}$) favorecendo sínteses mais controladas (Agha et al., 2023).

No entanto, os microcanais operam predominantemente em regime de fluxo laminar, com mistura baseada essencialmente na difusão, principalmente quando o canal é reto (Bruus, 2014). Esse regime de fluxo é caracterizado por um número de Reynolds (Re) tipicamente próximo de 1, calculado pela equação:

$$Re = \frac{\rho \cdot U \cdot D_h}{\eta} \quad \text{equação (1)}$$

Onde: ρ é a densidade do fluido (kg/m^3), U é a velocidade média do fluido (m/s), D_h é o diâmetro hidrodinâmico do canal (m), η é a viscosidade dinâmica do fluido ($\text{Pa}\cdot\text{s}$).

Dessa forma, devido às limitações físicas intrínsecas dos microcanais como dimensões reduzidas, baixa velocidade de fluxo e propriedades viscosas do fluido a transição para o regime turbulento ($Re > 2000$) torna-se inviável (Agha et al., 2023). Para contornar essas limitações e aumentar a eficiência de mistura, são adotadas estratégias de mistura ativa (como aplicação de campos externos) e passiva (como canais com estruturas internas ou curvas) (**Figura1**), capazes de induzir vórtices e promover mistura caótica mesmo em regime laminar (Agha et al., 2023).

Entre as estratégias de mistura passiva em microfluídica, destaca-se a mistura microfluídica focalizada (**MHF – *Microfluidic Hydrodynamic Focusing***), considerada uma das mais simples e eficazes. Essa técnica utiliza múltiplos fluxos de fluidos paralelos no interior do microcanal, operando em regime laminar (H. M. Xia et al., 2015).

Na MHF, uma corrente central com taxa de fluxo mais baixa é hidrodinamicamente comprimida por fluxos laterais com taxas de fluxo mais elevadas (Lu et al., 2016). Esse arranjo resulta na redução do comprimento de difusão da corrente interna, isto é, no estreitamento de sua largura o que promove um tempo de mistura significativamente menor e, conseqüentemente, uma mistura mais eficiente (Lu et al., 2016; L. Zhang et al., 2020).

A diminuição do tempo de mistura favorece a formação de nanopartículas com tamanho mais controlado e menor polidispersividade, melhorando a qualidade da síntese. Além disso, a MHF é operacionalmente simples, já que o parâmetro mais determinante na formação das partículas é o comportamento dos fluxos dos solventes. Este, por sua vez, pode ser ajustado de forma precisa apenas modificando-se as respectivas taxas de fluxo dos fluidos envolvidos.

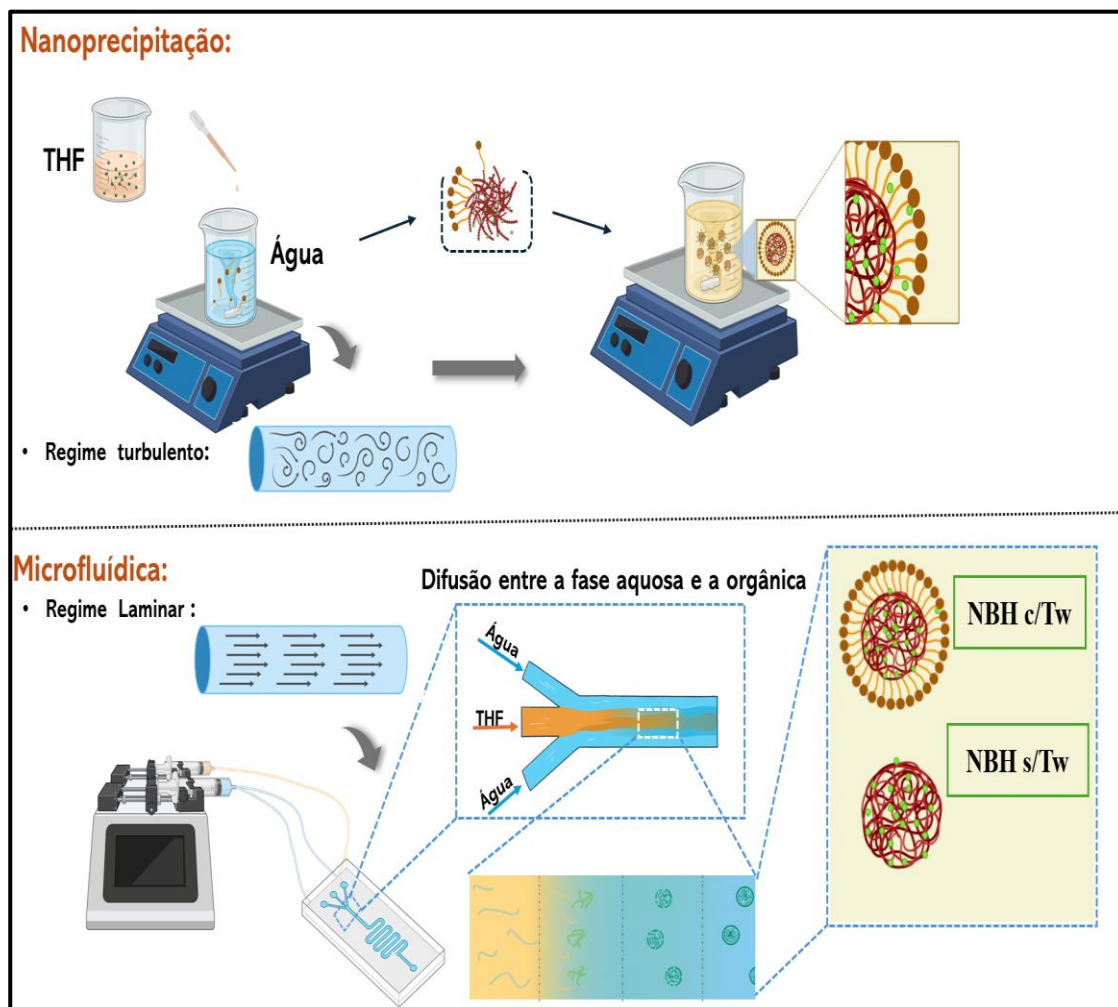
Já os micromixers ativos empregam fontes externas de energia, elétrica, mecânica, térmica para perturbar o fluxo e acelerar a mistura, oferecendo controle dinâmico, mas com maior complexidade de projeto (Bayareh et al., 2020) (**Figura 1**).

Além do micromixers, os dispositivos microfluídicos aplicados à síntese de nanopartículas geralmente adotam algumas arquiteturas típicas para a interseção das fases reagentes. Os modelos mais comuns incluem **flow-focusing**, **T-junction** e **Y-junction**, (**Figura 1**) que geram gotículas ou regiões de mistura controlada para promover a nucleação e o crescimento da nanopartícula (Zhu & Wang, 2017). Em síntese de nanopartículas, essas arquiteturas permitem controlar o tempo de mistura e a taxa de difusão entre a fase orgânica (com ingrediente ativo solúvel) e a fase aquosa, o que influencia diretamente o diâmetro da partícula, o índice de polidispersividade e a eficiência de encapsulamento (Agha et al., 2023). Alguns trabalhos recentes também destacam a integração de microchips com controle inteligente por machine learning, para ajustar parâmetros de fluxo em tempo real e otimizar a síntese (X. Chen & Lv, 2022).

Neste capítulo, exploramos a aplicação da microfluídica na síntese de nanopartículas poliméricas utilizando o modelo passivo de 3 entradas com misturador serpentina, e novamente usamos o polímero CNPPV, para a encapsulação do ácido úsnico.

Utilizamos dois tipos de formulações: com e sem o surfactante Tween® 20 (NBH c/Tw e NBH s/Tw), e comparamos essas formulações às produzidas por nanoprecipitação convencional (**Figura 2**).

Figura 2: Esquema representativo: comparação entre os métodos de síntese dos NBHs.



Fonte: Autor

A eficiência da síntese, bem como algumas características físico-químicas das nanopartículas foram avaliadas e comparadas com modelo padrão de nanoprecipitação apresentados no capítulo anterior. Além disso, este trabalho também explora a aplicação dessas formulações em plantas modelo (*Lemna minor*), buscando avaliar o efeito bioativo das formulações microfluídica e seu potencial como bioherbicidas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 FABRICAÇÃO DE MICROCHIPS MICROFLUÍDICOS POR IMPRESSÃO 3D E REPLICAÇÃO EM PDMS

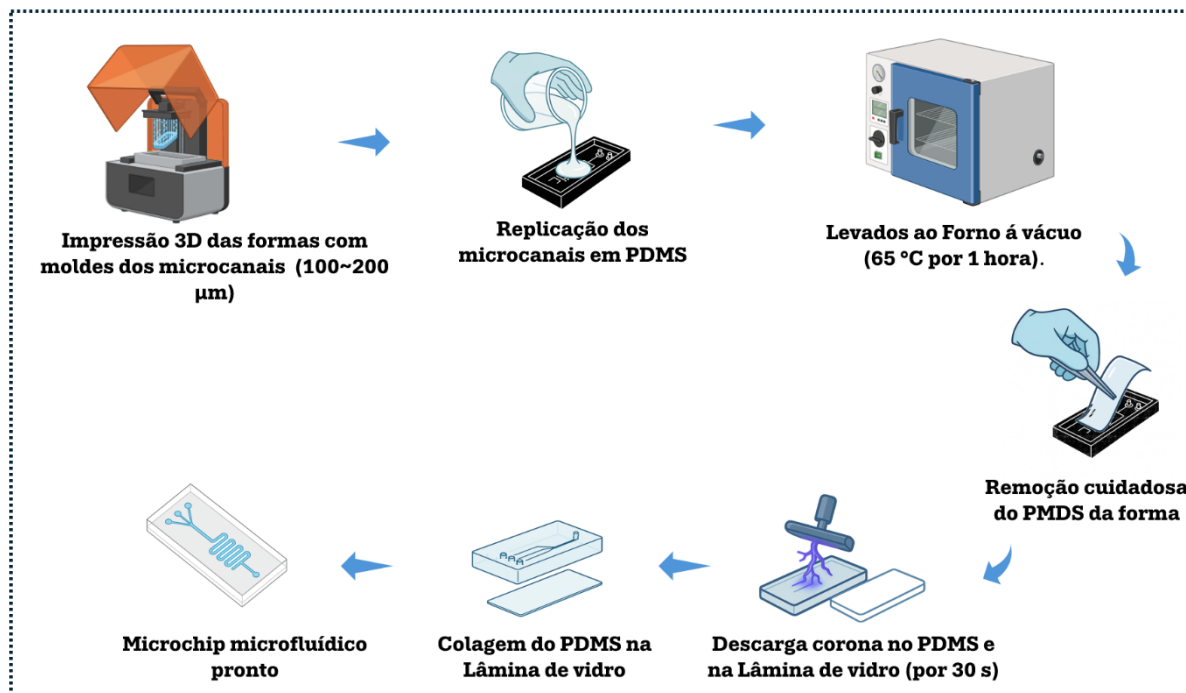
A fabricação dos microchips microfluídicos foi realizada por meio de um processo baseado em impressão 3D e replicação em PDMS (Vedhanayagam et al., 2023).

Inicialmente, os moldes dos microcanais foram projetados utilizando software de modelagem tridimensional Blender, garantindo-se que os canais possuísem dimensões precisas, na faixa de 100 a 200 μm , com estruturas de suporte adequadas à replicação em elastômero. Os modelos digitais foram processados no software de fatiamento Chitubox e impressos em resina de alta resolução na impressora 3D ELEGOO Saturn 12K, com parâmetros otimizados, como altura de camada de 25 μm e tempo de exposição adaptado à resina utilizada.

Após a impressão, os moldes foram cuidadosamente limpos para remoção de resíduos de resina. O processo incluiu drenagem inicial, lavagem em banho ultrassônico com álcool isopropílico (IPA) e exposição à radiação UV em estação de cura, seguida de secagem em forno a 60 °C por pelo menos uma hora para eliminação de possíveis resíduos voláteis. A replicação dos microcanais foi feita com elastômero de silicone (PDMS) preparado na proporção de 10:1 (base: agente de cura). A mistura foi homogeneizada e desgaseificada em câmara de vácuo, vertida nos moldes e novamente submetida à vácuo para remoção de bolhas antes da cura térmica em forno a 65 °C por 1 hora.

O PDMS polimerizado foi removido dos moldes com auxílio de bisturi e os chips foram preparados para “colagem” em lâminas de vidro. Os furos para conexão fluidica foram feitos através dos moldes, com 1,5 mm de diâmetro. Tanto os dispositivos de PDMS quanto as lâminas de vidro foram limpos com álcool etílico 96% e secos com ar comprimido antes do tratamento com plasma. A ativação superficial foi realizada em câmara de plasma (Plasma Cleaner GD-5, Fari), sob vácuo com fluxo de oxigênio de 30 s, seguida de exposição ao plasma por 30 segundos. Imediatamente após o tratamento, o PDMS foi colocado sobre a lâmina de vidro com leve pressão, e os dispositivos foram aquecidos a 80 °C por 1 hora para fortalecer a adesão, ver **Figura 3**.

Figura 3: Esquema representativo das etapas de fabricação dos Microchips microfluídicos.



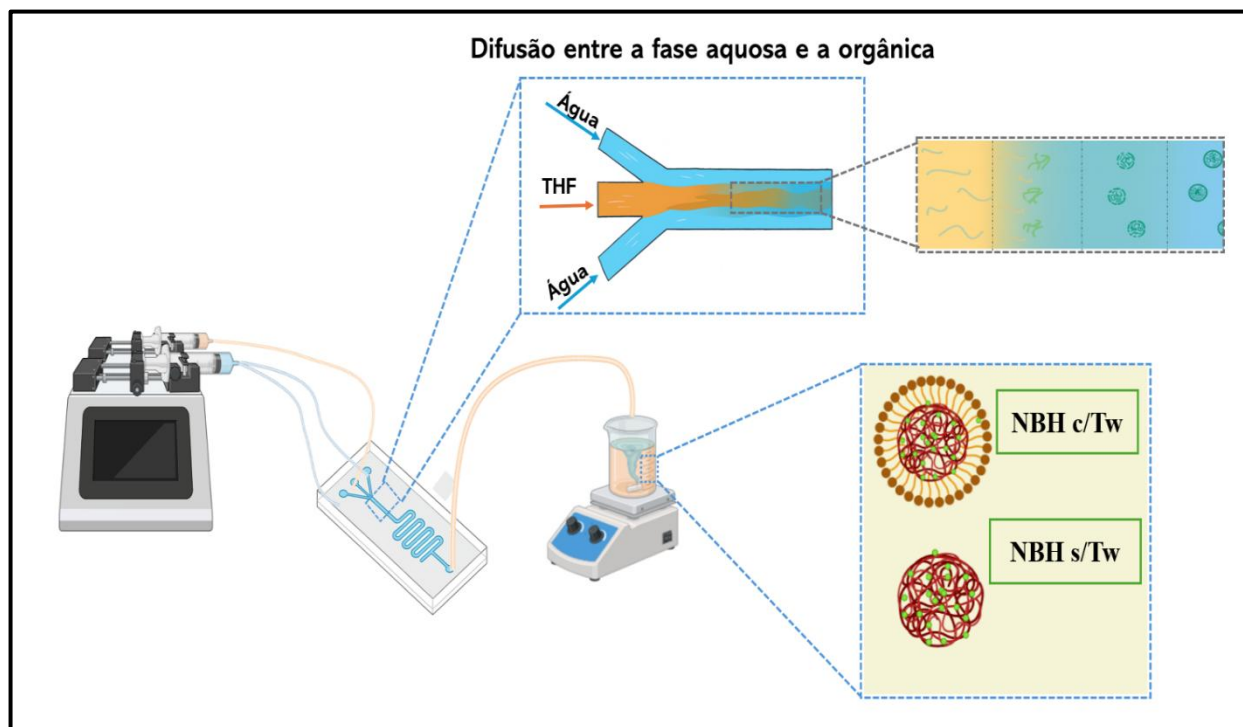
Fonte: Autor

Por fim, os chips foram lavados com solução de água deionizadas para remoção de resíduos internos e submetidos a testes de funcionalidade, como verificação de fluxo e vedação dos canais.

2.2 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS UTILIZANDO O MÉTODO DE MICROFLUÍDICA

A síntese das nanopartículas CNPPV-AU foi conduzida em sistema microfluídico utilizando os microchips produzidos, adaptando-se as concentrações previamente estabelecidas para nanoprecipitação. A fase orgânica foi preparada dissolvendo 1 mL da solução estoque de ácido úsnico (AU, 2,5 mg/mL) e 250 µL da solução estoque de CNPPV *poly(2,5-di(hexyloxy)cyanoterephthalylidene)* (Sigma-Aldrich, 2,5 mg/mL) em tetraidrofurano (THF, IMPEX). A fase aquosa foi obtida diluindo 1 mL de solução estoque de Tween 20 e 30 µL de NaOH (20 mg/mL) em 9 mL de água destilada.

Figura 4: Esquema representativo do método de síntese dos NBHs por microfluídica.



Fonte: Autor

As soluções foram injetadas no microchip por meio de seringas independentes utilizando bombas de seringa (PHD ULTRA, marca Harvard Apparatus), com vazão de $30 \mu\text{L min}^{-1}$ para a fase orgânica e $320 \mu\text{L/min}$ para a fase aquosa, promovendo mistura controlada no interior dos microcanais. O efluente foi coletado diretamente em béquer contendo barra magnética, mantido sob agitação contínua e protegido da luz por 24 h à temperatura ambiente, permitindo a evaporação completa do solvente orgânico. O volume final foi ajustado para 10 mL com água deionizada ver Figura 4.

Além da formulação padrão do NBH, também foi sintetizada a formulação NPs 0, contendo a mesma concentração de CNPPV da NBH, mas sem o AU, e uma formulação sem surfactante (NBH sem /Tw) para avaliação do papel do estabilizante na formação das partículas. Todas as amostras foram armazenadas em frascos âmbar, à temperatura ambiente e protegidas da luz até a caracterização.

2.3 FLUORESCÊNCIA DA CHLA: ANÁLISE PAN E ESPECTRAL IN VIVO

A avaliação da atividade fotossintética em plântulas tratadas com diferentes formulações de ácido úsnico (AU), tanto na forma livre quanto nanoencapsulada, foi realizada por meio da análise da fluorescência da clorofila ao longo de sete dias. As

formulações testadas incluíram AU livre, nanopartículas contendo AU com e sem surfactante, além de nanopartículas sem AU, aplicadas nas concentrações de 100, 50, 25 e 12 ppm. O experimento foi conduzido em placas de 96 poços previamente organizadas com as plantas cultivadas sob condições controladas.

As medidas de fluorescência foram realizadas utilizando o equipamento FluorCam FC 800-O/1010-GFP (Photon Systems Instruments), já descrito detalhadamente no Capítulo 2. O protocolo utilizado envolveu medidas cinéticas com adaptação ao escuro e análise de parâmetros fisiológicos como F_v/F_m , R_{fd} , NPQ, registrados diariamente entre os dias 2 e 8 do experimento. As leituras foram feitas diretamente nas placas, mantendo a integridade das amostras ao longo do tempo.

Como abordagem complementar, foram realizadas medidas espectrais da emissão de fluorescência da clorofila induzida por excitação a 405 nm, nos tempos 0 h, 24 h e 168 h. Para isso, utilizou-se um espectrômetro Ocean Optics acoplado por fibra óptica, com o feixe de excitação direcionado ao centro de cada poço e a emissão coletada perpendicularmente. As medições foram feitas em ambiente escuro, com tempo de aquisição entre 15 e 30 segundos por amostra, e intervalo espectral de detecção entre 600 e 800 nm, priorizando o pico de emissão da clorofila. Essa análise espectral permitiu a detecção *in vivo* de possíveis alterações na emissão de fluorescência decorrentes dos tratamentos, complementando os dados funcionais obtidos com o FluorCam

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados exibidos correspondem aos valores médios associados a uma série de medições e diferentes amostras. Inicialmente os dados foram submetidos ao teste de normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Os dados que apresentaram distribuição normal foram utilizados o teste-t ($p < 0,05$). Os dados que não apresentaram distribuição normal adotaram o teste não paramétrico Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). A análise estatística foi realizada utilizando dois softwares origin9.0 e Bioestat 5.0.

2.5 CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA

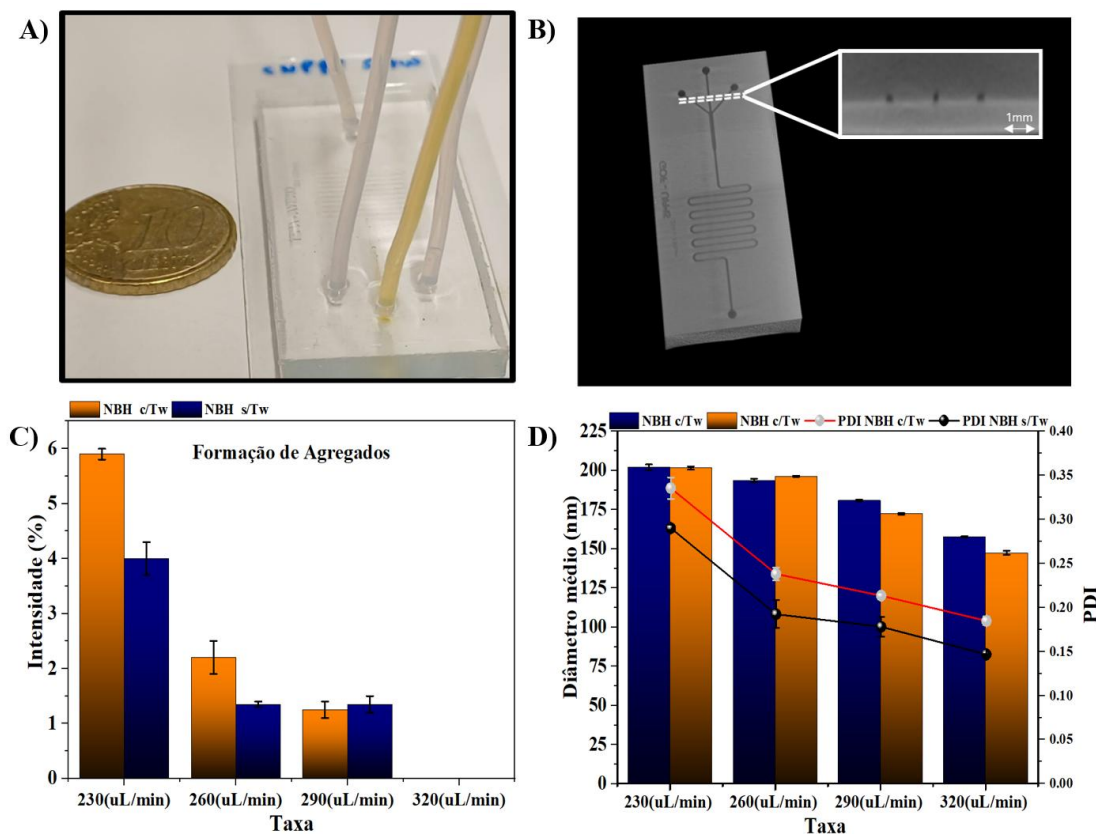
As metodologias empregadas para a caracterização óptica (espectros de fluorescência e absorção no UV-Vis), foram as mesmas adotadas no Capítulo 2, onde estão descritas detalhadamente na seção de Materiais e Métodos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS UTILIZANDO O MÉTODO DE MICROFLUÍDICA

Os resultados obtidos com o desenvolvimento dos microchips podem ser observados nas **Figuras 5) A e B**, e demonstram a eficácia do processo de fabricação dos microchips microfluídicos utilizados na síntese das formulações. A imagem apresentada na **Figura 5) A** mostra o dispositivo finalizado, com estrutura íntegra e acabamento uniforme, indicando que o desenvolvimento do microchip foi bem-sucedido e reproduzível. A reconstrução tridimensional obtida por microtomografia de raios X (Figura B) permite observar com clareza os microcanais internos, confirmando a fidelidade das dimensões projetadas e a precisão do método de impressão 3D empregado. A boa definição dos canais e a ausência de obstruções ou deformações estruturais evidenciam a qualidade do microdispositivo, o que é um fator essencial para garantir o controle dos fluxos e a eficiência na formação das nanopartículas durante a síntese.

Figura 5. (A) Imagem do microchip desenvolvido e utilizado na síntese das nanopartículas. (B) Reconstrução 3D por microtomografia de raios X evidenciando os microcanais e suas dimensões. (C) Formação de agregados em função da taxa de fluxo da fase orgânica. (D) Diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão, em diferentes taxas de fluxo da fase aquosa em relação à fase orgânica.



Fonte: Autor.

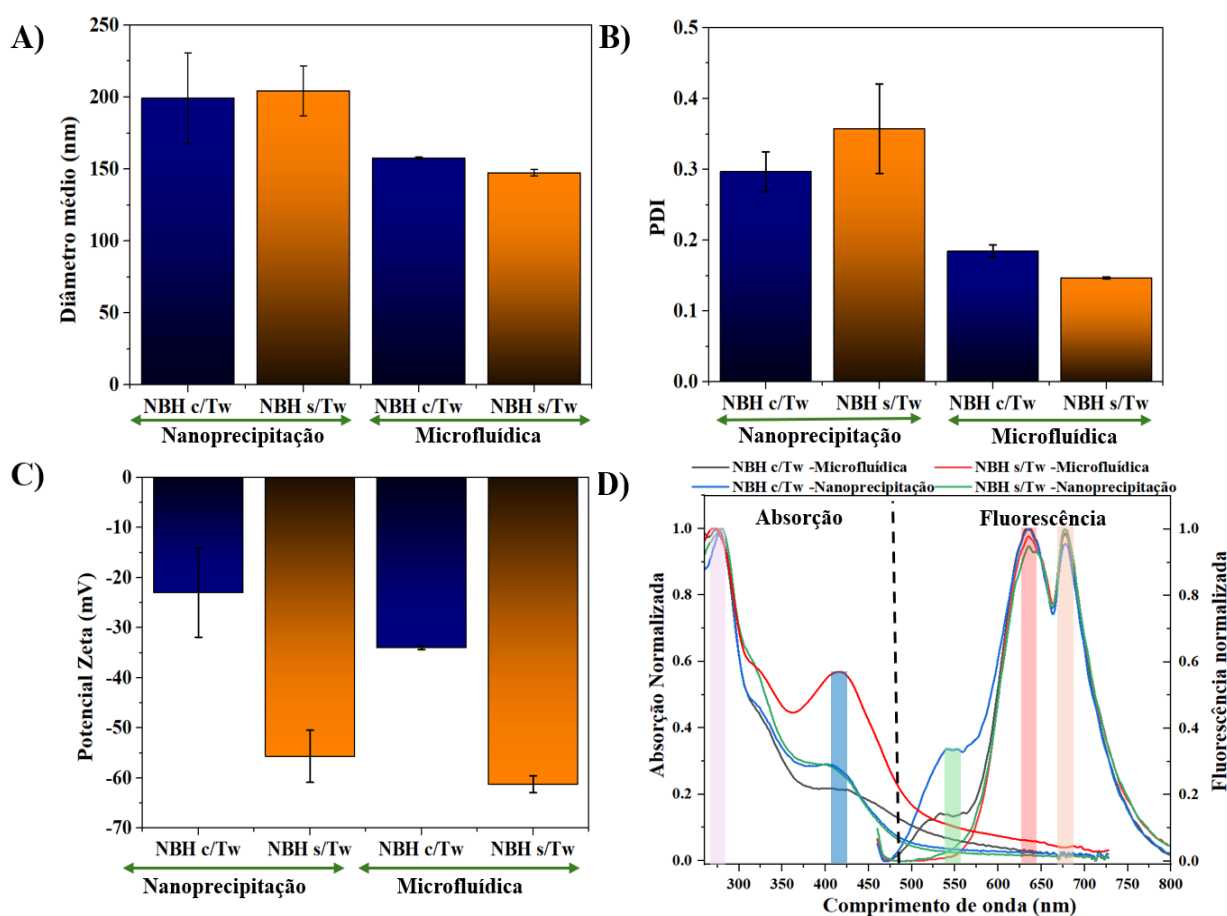
Nas **Figuras 5) C e D** são apresentadas os resultados obtidos a partir da variação da taxa de fluxo da fase aquosa (230, 260, 290 e 320 $\mu\text{L}/\text{min}$) durante a síntese das formulações de NBH c/Tw e NBH s/Tw. Ambas as amostras mostraram comportamentos semelhantes em relação à influência da taxa de fluxo, evidenciando tendências consistentes nos parâmetros avaliados. Conforme ilustrado na Figura C, a formação de agregados foi mais pronunciada nas menores taxas, sendo progressivamente reduzida com o aumento do fluxo da fase aquosa, desaparecendo completamente na condição de 320 $\mu\text{L}/\text{min}$. Esse comportamento sugere que o aumento da taxa favorece uma mistura mais eficiente entre as fases no interior dos microcanais, reduzindo a ocorrência de agregação.

Os dados do DLS apresentados na **Figura 5** mostram que o tamanho hidrodinâmico médio e o PDI diminuem à medida que a taxa de fluxo aumenta, para ambas as formulações. Os menores valores de tamanho e PDI foram obtidos na taxa de 320 $\mu\text{L}/\text{min}$, indicando a formação de nanopartículas mais estáveis e com distribuição de tamanho mais uniforme. Esses resultados reforçam a importância do controle preciso da taxa de fluxo no processo microfluídico, independentemente da presença ou ausência de surfactante, como fator determinante na qualidade final das formulações.

De forma semelhante ao relatado por (Abelha et al., 2017b), que demonstraram o controle do tamanho e da polidispersividade de nanopartículas de CNPPV por ajuste da razão de fluxo em microfluídica, os resultados obtidos neste trabalho confirmam que a variação da taxa da fase orgânica favorece a formação de partículas menores, mais homogêneas e livres de agregados. A síntese de nanopartículas por microfluídica permite uma síntese de alta precisão em virtude do controle preciso da quantidade de substâncias, além disso seja otimizada a morfologia e o tamanho das nanopartículas e outras propriedades relacionadas durante o processo de síntese, melhorando ainda mais a eficiência e a qualidade da produção (Yao et al., 2023). Além disso o controle da taxa de fluxo na síntese microfluídica demonstrou ser eficaz na regulação do tamanho e da uniformidade das nanopartículas, com tendência semelhante à observada por Liu et al. (Kimura et al., 2018), que ajustaram LNPs (nanopartículas lipídicas) com alta precisão variando o fluxo e o design do microchip. Assim como em outros estudos (Pearce et al., 2012; Tibbitt et al., 2016), nossos resultados confirmam a capacidade da microfluídica em produzir nanopartículas estáveis e homogêneas com controle de tamanho.

Diante dos resultados obtidos, a taxa de 320 $\mu\text{L}/\text{min}$ foi considerada a mais adequada para a síntese das nanopartículas, por proporcionar menor formação de agregados, menores tamanhos hidrodinâmicos e menores valores de PDI. Assim, a partir desta etapa, todas as formulações subsequentes foram sintetizadas utilizando essa taxa de fluxo como condição padrão, visando garantir maior uniformidade e estabilidade coloidal.

Figura 6: Comparação entre as formulações NBH c/Tw (com Tween 20) e NBH s/Tw (sem Tween), sintetizadas por nanoprecipitação e microfluídica.



Fonte: Autor.

Conforme mostrado na **Figura 6) A**, as nanopartículas produzidas por microfluídica apresentaram diâmetros hidrodinâmicos médios significativamente menores em comparação as obtidas por nanoprecipitação, que além de maiores, apresentaram maior dispersão nos valores, refletida nas barras de erro ampliadas. Essa diferença destaca o maior controle proporcionado pela microfluídica, conforme já evidenciado anteriormente na otimização da taxa de fluxo. Na Figura B, observa-se que o índice de polidispersão (PDI) seguiu a mesma tendência: as formulações produzidas por nanoprecipitação

atingiram valores próximos a 0,4, indicando ampla heterogeneidade populacional, enquanto as amostras sintetizadas por microfluídica apresentaram PDI inferiores a 0,2, com destaque para a formulação NBH s/Tw, que apresentou os menores valores de tamanho e polidispersividade entre todas as condições testadas.

A **Figura 6) C** mostra os valores de potencial zeta, que não apresentaram diferenças relevantes entre os métodos de síntese, mas revelaram impacto marcante da presença do surfactante. As formulações com Tween 20 (NBH c/Tw) apresentaram potencial zeta entre -20 e -30 mV, enquanto as formulações sem Tween (NBH s/Tw) exibiram valores mais negativos, entre -55 e -60 mV, sugerindo maior estabilidade eletrostática em suspensão para estas últimas (Manimaran et al., 2025).

Na Figura D, os espectros de absorção indicam a presença das bandas características do ácido úsnico na região do ultravioleta, além da banda típica do CNPPV na região azul. Notou-se um deslocamento para o vermelho mais acentuado nas formulações produzidas por microfluídica, possivelmente associado ao maior empacotamento molecular ou reorganização do CNPPV promovido pela dinâmica controlada do fluxo. Nos espectros de fluorescência, observou-se o surgimento de uma nova banda na região do vermelho (~675 nm) exclusivamente nas formulações contendo Tween 20, independentemente do método de síntese. Além disso, ocorreu uma inversão na intensidade relativa das bandas em 630 e 675 nm: nas amostras com Tween, a emissão em 675 nm superou a de 630 nm, enquanto nas amostras sem Tween o padrão foi inverso. Tal comportamento sugere que o surfactante não apenas influencia a estabilidade superficial, mas também altera a organização eletrônica ou o empacotamento das cadeias do CNPPV, afetando diretamente suas propriedades fotofísicas.

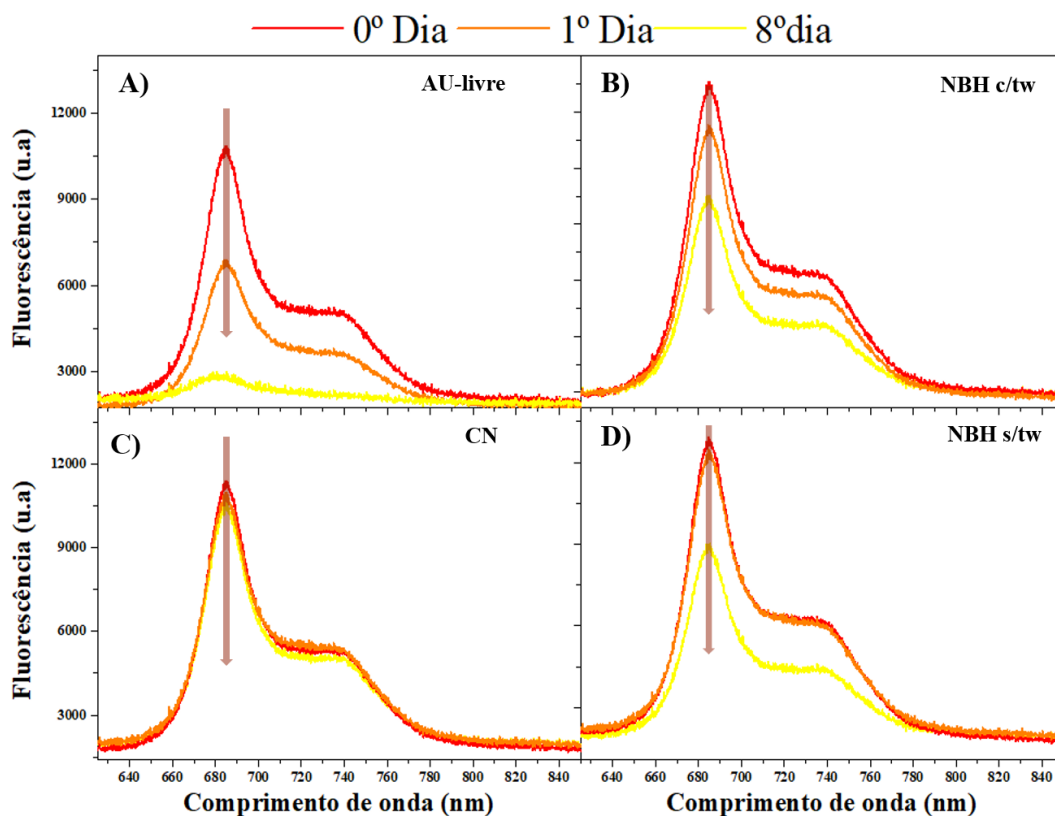
Diversos estudos recentes demonstram que os surfactantes utilizados na síntese de nanopartículas de polímeros conjugados exercem influência direta não apenas na estabilidade coloidal, mas também nas propriedades fotofísicas do sistema, ao impactarem o empacotamento molecular e a organização eletrônica das cadeias, (Urbano et al., 2018b) observaram que a estrutura do surfactante afeta a intensidade e a estabilidade da fluorescência em CPNs contendo CNPPV, enquanto (Elgiddawy et al., 2023) destacaram o papel dos surfactantes no controle da agregação e na modulação da eficiência quântica de emissão. (Marcial-Hernandez et al., 2023) mostraram ainda que a ausência de surfactantes, substituídos por grupos polares na cadeia polimérica, resulta em alterações significativas na organização supramolecular e nas propriedades ópticas. Esses achados

confirmam que os surfactantes atuam como elementos estruturantes, afetando diretamente os estados excitados e a resposta fotofísica das nanopartículas.

3.2 EFEITO DOS NANOCARREADORES EM PLANTAS (*Lemna minor*)

A análise dos efeitos do AU livre e dos Nanobioherbicidas sintetizados por microfluídica foram realizados nas *Lemnas minor*, com métodos já demonstrados no capítulo 2 desta tese, por meio da fluorescência cinética da clorofila, onde avaliamos parâmetros como eficiência quântica fotoquímica do fotosistema II (F_v/F_m), índice de vitalidade do FSII (R_{fd}) e supressão não-fotoquímica (NPQ), além disso avaliamos os espectros de fluorescência da clorofila em vivo, como pode ser observado na figura a seguir.

Figura 7. Espectros de fluorescência de *Lemna minor* submetidas a diferentes tratamentos: (A) AU-livre, (B) NBH com Tween® 20, (C) controle negativo (CN) e (D) NBH sem Tween® 20, avaliados em 0, 1 e 8 dias de exposição.



Fonte: Autor.

Na **Figura 7**, observa-se a evolução dos espectros de fluorescência da clorofila em *Lemna minor* submetidas a diferentes tratamentos na concentração de 50 ppm ao longo de oito dias. O grupo tratado com AU-livre apresentou a resposta mais acentuada, com redução de quase 50% da fluorescência já nas primeiras 24 h e queda abrupta após 8 dias,

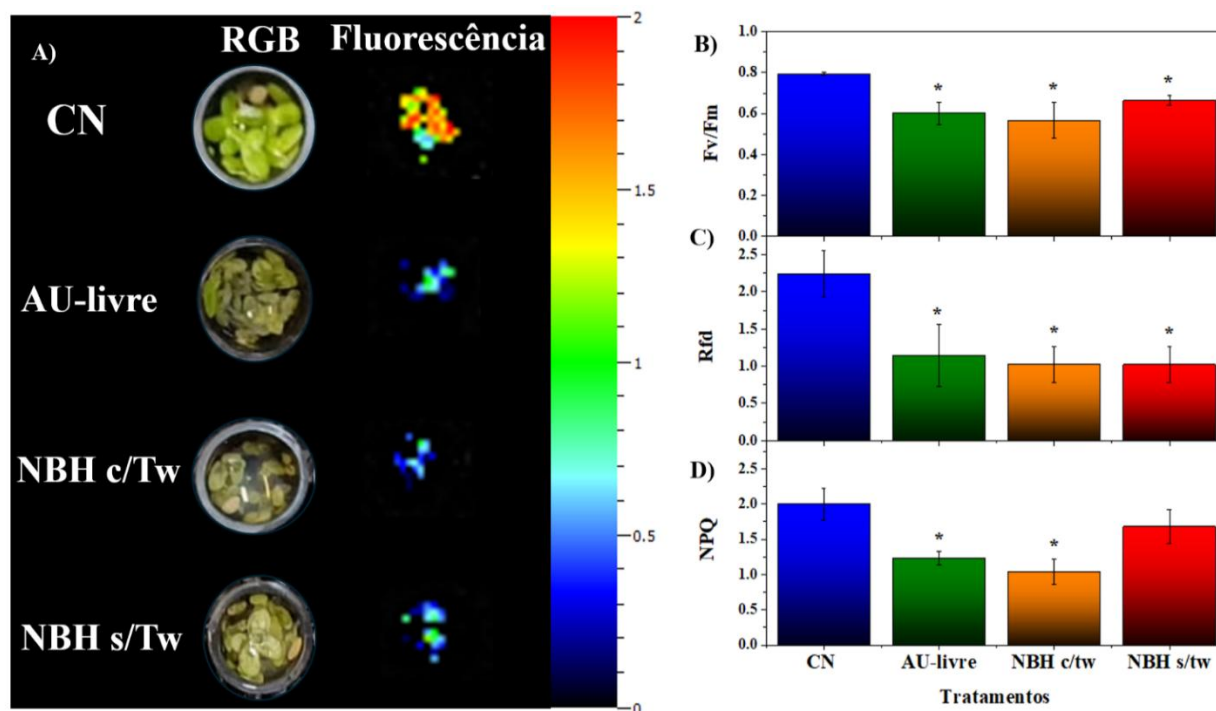
indicando forte efeito fitotóxico imediato. Esse resultado está de acordo com estudos que apontam a rápida ação do AU sobre o aparato fotossintético, resultando em clorose e degradação de pigmentos (Latkowska et al., 2006c; Luzina & Salakhutdinov, 2016b).

Nos tratamentos com NBH, tanto com surfactante quanto sem, também houve redução progressiva da fluorescência, embora com dinâmica distinta. Para o NBH sem Tween20, a fluorescência manteve-se praticamente estável nas primeiras 24 h, sugerindo liberação mais lenta do AU. No entanto, após 8 dias, os valores convergiram para níveis semelhantes aos observados no NBH com Tween20, evidenciando que, independentemente da presença do surfactante, as nanopartículas promoveram efeito fitotóxico sustentado ao longo do tempo. Esse comportamento reforça o papel do sistema de encapsulação na modulação da cinética de liberação do AU. Esse resultado reforça que os sistemas nanoestruturados modulam a liberação do AU, retardando os efeitos iniciais, mas mantendo o impacto cumulativo ao longo do tempo. Esse perfil de liberação controlada está de acordo com o que já foi discutido no Capítulo 2 desta tese, onde apresentamos a relevância da nanotecnologia para reduzir picos de toxicidade aguda, ao mesmo tempo em que prolonga a ação do princípio ativo.

O grupo controle (CN) apresentou apenas uma leve diminuição da fluorescência durante o período experimental, sem significância biológica, o que confirma que os efeitos observados nos demais grupos estão diretamente associados aos tratamentos aplicados. Em conjunto, os resultados demonstram que, embora o AU-livre cause impacto imediato e intenso, as formulações nanoestruturadas promovem um efeito mais gradual, preservando parcialmente a fluorescência inicial, mas resultando em danos cumulativos semelhantes após 8 dias.

Portanto, os achados demonstram que, assim como em outros modelos de nanopartículas aplicadas em *Lemna* (Glavaš Ljubimir et al., 2023; Irfan et al., 2024), as formulações NBHs promovem alterações fisiológicas detectáveis nos parâmetros de fluorescência, evidenciando seu potencial como bioherbicida.

Figura 8. Efeitos do ácido úsnico livre e dos NBHs sobre parâmetros de fluorescência da clorofila em *Lemna minor*: (A) imagens RGB e fluorescência das plantas tratadas; (B) eficiência quântica fotoquímica do FSII (Fv/Fm); (C) índice de vitalidade (Rfd); e (D) supressão não-fotoquímica (NPQ). * Diferença significativa (teste t, $p < 0,05$).



Fonte: Autor.

O AU livre promoveu reduções mais rápidas e intensas, enquanto os NBHs apresentaram efeitos graduais, coerentes com a liberação controlada já demonstrada neste trabalho. Esses resultados são consistentes com achados anteriores que descrevem a forte atividade fitotóxica do AU e de seus enantiômeros, levando ao branqueamento de tecidos cotiledonares e à degradação de pigmentos (Romagni et al., 2000)

A literatura descreve que a ação fitotóxica do AU não se relaciona à inibição direta da biossíntese de clorofila, mas sim à desestabilização do aparato fotossintético, em um mecanismo semelhante à inibição da síntese de carotenoides (Ellis et al., 1995; Schrader et al., 2000; Shino et al., 2018). Como já discutido no capítulo anterior o AU atua como inibidor irreversível da enzima 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (HPPD), interferindo no metabolismo de plastoquinona, essencial à função da fitoeno dessaturase, o que culmina em sintomas de branqueamento e perda da função fotossintética. Além disso os carotenoides, por sua vez, têm papel fundamental na dissipação do excesso de energia de excitação da clorofila, prevenindo a formação de estados excitados tóxicos e evitando fotodestruição (Ellis et al., 1995; Götze & Lokstein, 2023; Santabarbara et al., 2012;

Schrader et al., 2000; Shino et al., 2018). Na ausência desses pigmentos, o FSII torna-se altamente vulnerável a danos oxidativos, em consonância com a diminuição de Fv/Fm e Rfd observada nos experimentos.

Além disso, estudos clássicos já mostraram que o AU reduz a concentração de clorofila e compromete a organização dos complexos pigmentares de antena (Orús et al., 1981; Strasser et al., 2004), o que impacta diretamente a eficiência da transferência de energia luminosa. Outros trabalhos também demonstraram que concentrações elevadas de AU destroem clorofilas e carotenoides, alterando a relação Chl a/b e comprometendo a estrutura do aparato fotossintético (Y. Gao et al., 2018). Esses mecanismos ajudam a explicar os efeitos drásticos do AU livre em *Lemna minor*, caracterizados por quedas abruptas nos parâmetros de fluorescência.

Por outro lado, os NBHs apresentaram um padrão distinto de toxicidade, caracterizado por efeito mais lento e sustentado em comparação ao AU-livre, resultado da liberação controlada que mantém concentrações efetivas por períodos prolongados. Ao comparar as formulações com e sem surfactante, não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros avaliados, o que pode ser explicado pelas propriedades físico-químicas bastante semelhantes entre ambas, incluindo tamanho médio e distribuição de partículas. Esse achado sugere que, no contexto das condições experimentais empregadas, a presença do surfactante não desempenhou papel determinante na modulação da atividade bioherbicida, indicando que o efeito observado se deve principalmente ao próprio sistema polimérico CNPPV como carreador do ácido úsnico.

Outro aspecto relevante é a contribuição do polímero conjugado CNPPV, uma vez que nanopartículas desse tipo já foram associadas à geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Caires et al., 2023). As EROs são conhecidas por danificar pigmentos, lipídios, proteínas e componentes do FSII, agravando o estresse foto-oxidativo (Sperdouli et al., 2021).

Portanto, os resultados combinados deste estudo confirmam que o AU exerce ação fitotóxica pronunciada por múltiplos mecanismos moleculares, enquanto sua encapsulação em NBHs modula a intensidade e a dinâmica desse efeito. Essa estratégia de nanoformulação amplia o potencial do AU como bioherbicida, ao mesmo tempo em que evidencia a necessidade de avaliar cuidadosamente seus impactos ecológicos. Em consonância com o discutido no Capítulo 2, tais achados fortalecem a perspectiva de uso

de NBHs como ferramentas inovadoras para o manejo sustentável de plantas, integrando eficiência biológica e novas funcionalidades ópticas.

4 CONCLUSÃO

Neste capítulo, foram apresentados e discutidos os resultados referentes ao desenvolvimento dos NBHs contendo ácido úsnico (AU) encapsulado em polímero conjugado (CNPPV), obtidos por duas abordagens distintas: nanoprecipitação e microfluídica. A construção de um microchip para síntese por microfluídica permitiu comparações diretas com o método convencional de nanoprecipitação, revelando vantagens em termos de maior homogeneidade, menores valores de índice de polidispersão e tamanhos de partículas mais controlados. Ambos os métodos resultaram em nanopartículas estáveis, com morfologia esférica e elevada eficiência de encapsulação, porém a microfluídica mostrou-se superior em garantir maior reprodutibilidade e controle dos parâmetros físico-químicos.

As análises ópticas confirmaram a presença das bandas características do AU e do CNPPV, demonstrando que o encapsulamento preserva as propriedades fotofísicas do sistema. Nos ensaios biológicos, utilizando *Lemna minor* como organismo modelo, tanto o AU livre quanto os NBHs impactaram significativamente parâmetros de fluorescência da clorofila (Fv/Fm, Rfd e NPQ).

O AU livre provocou efeito mais rápido e severo, com forte redução já nas primeiras 24 h, enquanto os NBHs apresentaram um perfil de toxicidade mais gradual, coerente com a liberação controlada. A comparação entre NBHs com e sem surfactante não evidenciou diferenças significativas, possivelmente em razão de propriedades físico-químicas semelhantes, sugerindo que a atividade observada decorre principalmente do polímero conjugado CNPPV como carreador.

Esses achados estão de acordo com a literatura que descreve os efeitos fitotóxicos do AU incluindo branqueamento, inibição enzimática e degradação de pigmentos fotossintéticos e com estudos recentes que associam nanopartículas de polímeros conjugados à geração de espécies reativas de oxigênio, potencializando o estresse oxidativo nas plantas. Dessa forma, os resultados apresentados neste capítulo reforçam o potencial dos NBHs como uma estratégia inovadora no desenvolvimento de bioherbicidas, ao combinar a ação fitotóxica do AU com maior controle estrutural obtido via microfluídica.

5 REFERÊNCIAS

- Abelha, T. F., Phillips, T. W., Bannock, J. H., Nightingale, A. M., Dreiss, C. A., Kemal, E., Urbano, L., deMello, J. C., Green, M., & Dailey, L. A. (2017a). Bright conjugated polymer nanoparticles containing a biodegradable shell produced at high yields and with tuneable optical properties by a scalable microfluidic device. *Nanoscale*, 9(5), 2009–2019. <https://doi.org/10.1039/C6NR09162H>
- Abelha, T. F., Phillips, T. W., Bannock, J. H., Nightingale, A. M., Dreiss, C. A., Kemal, E., Urbano, L., deMello, J. C., Green, M., & Dailey, L. A. (2017b). Bright conjugated polymer nanoparticles containing a biodegradable shell produced at high yields and with tuneable optical properties by a scalable microfluidic device. *Nanoscale*, 9(5), 2009–2019. <https://doi.org/10.1039/C6NR09162H>
- Agha, A., Waheed, W., Stiharu, I., Nerguizian, V., Destgeer, G., Abu-Nada, E., & Alazzam, A. (2023). A review on microfluidic-assisted nanoparticle synthesis, and their applications using multiscale simulation methods. *Discover Nano*, 18(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s11671-023-03792-x>
- Bayareh, M., Ashani, M. N., & Usefian, A. (2020). Active and passive micromixers: A comprehensive review. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, 147, 107771. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2019.107771>
- Bruus, H. (2014). Governing Equations in Microfluidics. In *Microscale Acoustofluidics* (pp. 1–28). The Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781849737067-00001>
- Chen, X., & Lv, H. (2022). Intelligent control of nanoparticle synthesis on microfluidic chips with machine learning. *NPG Asia Materials*, 14(1), 69. <https://doi.org/10.1038/s41427-022-00416-1>
- Croce, N., Pitaro, M., Gallo, V., & Antonini, G. (2022). Toxicity of Usnic Acid: A Narrative Review. *Journal of Toxicology*, 2022, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2022/8244340>
- Elgiddawy, N., Elnagar, N., Korri-Youssoufi, H., & Yassar, A. (2023). π -Conjugated Polymer Nanoparticles from Design, Synthesis to Biomedical Applications: Sensing, Imaging, and Therapy. *Microorganisms*, 11(8), 2006. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11082006>
- Ellis, M. K., Whitfield, A. C., Gowans, L. A., Auton, T. R., Provan, W. M., Lock, E. A., & Smith, L. L. (1995). Inhibition of 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase by 2-(2-Nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-cyclohexane-1,3-dione and 2-(2-Chloro-4-

- methanesulfonylbenzoyl)-cyclohexane-1,3-dione. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 133(1), 12–19. <https://doi.org/10.1006/taap.1995.1121>
- Gao, Y., Liu, W., Wang, X., Yang, L., Han, S., Chen, S., Strasser, R. J., Valverde, B. E., & Qiang, S. (2018). Comparative phytotoxicity of usnic acid, salicylic acid, cinnamic acid and benzoic acid on photosynthetic apparatus of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 128, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.04.037>
- Gao, Z., Yuan, P., Wang, D., Xu, Z., Li, Z., & Shao, X. (2017). Photo-controlled release of fipronil from a coumarin triggered precursor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27(11), 2528–2535. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.03.091>
- Glavaš Ljubimir, K., Domijan, A.-M., & Radić Brkanac, S. (2023). Phytotoxic Action of Silver Nanoparticles on *Lemna minor*: Multi-Parameter Analysis of Different Physiological Processes. *Plants*, 12(2), 343. <https://doi.org/10.3390/plants12020343>
- Götze, J. P., & Lokstein, H. (2023). Excitation energy transfer between higher excited states of photosynthetic pigments: 1. Carotenoids facilitate $B \rightarrow Q$ band conversion in chlorophylls. <https://doi.org/10.1101/2023.01.26.525634>
- Goulson, D., Thompson, J., & Croombs, A. (2018). Rapid rise in toxic load for bees revealed by analysis of pesticide use in Great Britain. *PeerJ*, 6, e5255. <https://doi.org/10.7717/peerj.5255>
- Hajam, M. I., & Khan, M. M. (2024). Microfluidics: a concise review of the history, principles, design, applications, and future outlook. *Biomaterials Science*, 12(2), 218–251. <https://doi.org/10.1039/D3BM01463K>
- Irfan, M., Mészáros, I., Szabó, S., & Oláh, V. (2024). Comparative Phytotoxicity of Metallic Elements on Duckweed *Lemna gibba* L. Using Growth- and Chlorophyll Fluorescence Induction-Based Endpoints. *Plants*, 13(2), 215. <https://doi.org/10.3390/plants13020215>
- Kah, M., Beulke, S., Tiede, K., & Hofmann, T. (2013). Nanopesticides: State of Knowledge, Environmental Fate, and Exposure Modeling. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 43(16), 1823–1867. <https://doi.org/10.1080/10643389.2012.671750>
- Kimura, N., Maeki, M., Sato, Y., Note, Y., Ishida, A., Tani, H., Harashima, H., & Tokeshi, M. (2018). Development of the iLiNP Device: Fine Tuning the Lipid Nanoparticle Size within 10 nm for Drug Delivery. *ACS Omega*, 3(5), 5044–5051. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00341>
- Kookana, R. S., Boxall, A. B. A., Reeves, P. T., Ashauer, R., Beulke, S., Chaudhry, Q., Cornelis, G., Fernandes, T. F., Gan, J., Kah, M., Lynch, I., Ranville, J., Sinclair, C.,

- Spurgeon, D., Tiede, K., & Van den Brink, P. J. (2014). Nanopesticides: Guiding Principles for Regulatory Evaluation of Environmental Risks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(19), 4227–4240. <https://doi.org/10.1021/jf500232f>
- Kulinowska, M., Dresler, S., Skalska-Kamińska, A., Hanaka, A., & Strzemski, M. (2023). Methodological Aspects of Green Extraction of Usnic Acid Using Natural Deep Eutectic Solvents. *Molecules*, 28(14), 5321. <https://doi.org/10.3390/molecules28145321>
- Latkowska, E., Lechowski, Z., Bialczyk, J., & Pilarski, J. (2006). Photosynthesis and Water Relations in Tomato Plants Cultivated Long-Term in Media Containing (+)-Usnic Acid. *Journal of Chemical Ecology*, 32(9), 2053–2066. <https://doi.org/10.1007/s10886-006-9128-6>
- Leonardo Fernandes Fraceto, Hudson Wallace Pereira de Carvalho, Renata de Lima, Subhashis Ghoshal, & Catherine Santaella. (2022). *Inorganic Nanopesticides and Nanofertilizers* (L. Fernandes Fraceto, H. W. Pereira de Carvalho, R. de Lima, S. Ghoshal, & C. Santaella, Eds.). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-94155-0>
- Li, X., Wang, X., Sun, C., Wang, A., An, C., Li, N., Shen, Y., Hu, J., Liu, H., Xie, J., Luo, D., & Wang, Y. (2025). A unimolecule nanopesticide delivery system applied in field scale for enhanced pest control. *Nature Communications*, 16(1), 6809. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-61969-7>
- Lu, M., Ozcelik, A., Grigsby, C. L., Zhao, Y., Guo, F., Leong, K. W., & Huang, T. J. (2016). Microfluidic hydrodynamic focusing for synthesis of nanomaterials. *Nano Today*, 11(6), 778–792. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2016.10.006>
- Luzina, O. A., & Salakhutdinov, N. F. (2016). Biological activity of usnic acid and its derivatives: Part 2. effects on higher organisms. Molecular and physicochemical aspects. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 42(3), 249–268. <https://doi.org/10.1134/S1068162016030109>
- Manimaran, M., Norizan, M. N., Kassim, M. H. M., Adam, M. R., Abdullah, N., & Norrahim, M. N. F. (2025). Critical review on the stability and thermal conductivity of water-based hybrid nanofluids for heat transfer applications. *RSC Advances*, 15(18), 14088–14125. <https://doi.org/10.1039/D5RA00844A>
- Marcial-Hernandez, R., Giacalone, S., Neal, W. G., Lee, C.-S., Gilhooly-Finn, P. A., Mastroianni, G., Meli, D., Wu, R., Rivnay, J., Palma, M., & Nielsen, C. B. (2023). Aqueous processing of organic semiconductors enabled by stable nanoparticles with built-in surfactants. *Nanoscale*, 15(14), 6793–6801. <https://doi.org/10.1039/D2NR06024H>

- Moody, E. G., & Collins, L. R. (2003). Effect of Mixing on the Nucleation and Growth of Titania Particles. *Aerosol Science and Technology*, 37(5), 403–424. <https://doi.org/10.1080/027868203000979>
- Niculescu, A.-G., Mihaiescu, D. E., & Grumezescu, A. M. (2022). A Review of Microfluidic Experimental Designs for Nanoparticle Synthesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15), 8293. <https://doi.org/10.3390/ijms23158293>
- Orús, M. I., Estévez, M. F., & Vicente, C. (1981). Manganese depletion in chloroplasts of *Quercus rotundifolia* during chemical simulation of lichen epiphytic states. *Physiologia Plantarum*, 52(2), 263–266. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1981.tb08503.x>
- Pearce, T. R., Shroff, K., & Kokkoli, E. (2012). Peptide Targeted Lipid Nanoparticles for Anticancer Drug Delivery. *Advanced Materials*, 24(28), 3803–3822. <https://doi.org/10.1002/adma.201200832>
- Qin, X., Seder, I., Guo, Z., Li, X., Wang, W., & Sun, Y. (2025). Microfluidic instruments for nanoparticle synthesis. *Biomedical Instrumentation*, 1(1), 100002. <https://doi.org/10.1016/j.bmi.2025.100002>
- Romagni, J. G., Meazza, G., Nanayakkara, N. P. D., & Dayan, F. E. (2000). The phytotoxic lichen metabolite, usnic acid, is a potent inhibitor of plant *p* -hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *FEBS Letters*, 480(2–3), 301–305. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01907-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01907-4)
- Santabarbara, S., Casazza, A. P., Ali, K., Economou, C. K., Wannathong, T., Zito, F., Redding, K. E., Rappaport, F., & Purton, S. (2012). The Requirement for Carotenoids in the Assembly and Function of the Photosynthetic Complexes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 161(1), 535–546. <https://doi.org/10.1104/pp.112.205260>
- Schrader, K. K., Dayan, F. E., Allen, S. N., de Regt, M. Q., Tucker, C. S., & Paul, Jr., R. N. (2000). 9,10-Antraquinone Reduces the Photosynthetic Efficiency of *Oscillatoria perornata* and Modifies Cellular Inclusions. *International Journal of Plant Sciences*, 161(2), 265–270. <https://doi.org/10.1086/314255>
- Seder, I., Zheng, T., Zhang, J., Rojas, C. C., Helalat, S. H., Téllez, R. C., & Sun, Y. (2024). A Scalable Microfluidic Platform for Nanoparticle Formulation: For Exploratory- and Industrial-Level Scales. *Nano Letters*, 24(17), 5132–5138. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.3c05057>

- Shino, M., Hamada, T., Shigematsu, Y., Hirase, K., & Banba, S. (2018). Action mechanism of bleaching herbicide cyclopyrimorate, a novel homogentisate solanesyltransferase inhibitor. *Journal of Pesticide Science*, 43(4), 233–239. <https://doi.org/10.1584/jpestics.D18-008>
- Sperdoulis, I., Andreadis, S., Moustaka, J., Panteris, E., Tsaballa, A., & Moustakas, M. (2021). Changes in Light Energy Utilization in Photosystem II and Reactive Oxygen Species Generation in Potato Leaves by the Pinworm *Tuta absoluta*. *Molecules*, 26(10), 2984. <https://doi.org/10.3390/molecules26102984>
- Strasser, R. J., Tsimilli-Michael, M., & Srivastava, A. (2004). *Analysis of the Chlorophyll a Fluorescence Transient* (pp. 321–362). https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9_12
- Tibbitt, M. W., Dahlman, J. E., & Langer, R. (2016). Emerging Frontiers in Drug Delivery. *Journal of the American Chemical Society*, 138(3), 704–717. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b09974>
- Urbano, L., Clifton, L., Ku, H. K., Kendall-Troughton, H., Vandera, K.-K. A., Matarese, B. F. E., Abelha, T., Li, P., Desai, T., Dreiss, C. A., Barker, R. D., Green, M. A., Dailey, L. A., & Harvey, R. D. (2018). Influence of the Surfactant Structure on Photoluminescent π -Conjugated Polymer Nanoparticles: Interfacial Properties and Protein Binding. *Langmuir*, 34(21), 6125–6137. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b00561>
- Vedhanayagam, A., Golfetto, M., Ram, J. L., & Basu, A. S. (2023). Rapid Micromolding of Sub-100 μm Microfluidic Channels Using an 8K Stereolithographic Resin 3D Printer. *Micromachines*, 14(8), 1519. <https://doi.org/10.3390/mi14081519>
- Vreeland, E. C., Watt, J., Schober, G. B., Hance, B. G., Austin, M. J., Price, A. D., Fellows, B. D., Monson, T. C., Hudak, N. S., Maldonado-Camargo, L., Bohorquez, A. C., Rinaldi, C., & Huber, D. L. (2015). Enhanced Nanoparticle Size Control by Extending LaMer's Mechanism. *Chemistry of Materials*, 27(17), 6059–6066. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.5b02510>
- Xia, H. M., Seah, Y. P., Liu, Y. C., Wang, W., Toh, A. G. G., & Wang, Z. P. (2015). Anti-solvent precipitation of solid lipid nanoparticles using a microfluidic oscillator mixer. *Microfluidics and Nanofluidics*, 19(2), 283–290. <https://doi.org/10.1007/s10404-014-1517-5>
- Xu, Z., Gao, Z., & Shao, X. (2018). Light-triggered release of insecticidally active spirotetramat-enol. *Chinese Chemical Letters*, 29(11), 1648–1650. <https://doi.org/10.1016/j.cclet.2018.01.025>

- Yao, F., Zhu, P., Chen, J., Li, S., Sun, B., Li, Y., Zou, M., Qi, X., Liang, P., & Chen, Q. (2023). Synthesis of nanoparticles via microfluidic devices and integrated applications. *Microchimica Acta*, 190(7), 256. <https://doi.org/10.1007/s00604-023-05838-4>
- Zhang, L., Chen, Q., Ma, Y., & Sun, J. (2020). Microfluidic Methods for Fabrication and Engineering of Nanoparticle Drug Delivery Systems. *ACS Applied Bio Materials*, 3(1), 107–120. <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b00853>
- Zhu, P., & Wang, L. (2017). Passive and active droplet generation with microfluidics: a review. *Lab on a Chip*, 17(1), 34–75. <https://doi.org/10.1039/C6LC01018K>

Capítulo 4 - Avaliação da toxicidade e influência do surfactante na produção de nanopartículas de ácido úsnico

RESUMO

A crescente demanda por herbicidas mais eficazes e ambientalmente seguros tem impulsionado o desenvolvimento de formulações baseadas em nanotecnologia. O ácido úsnico (AU), apesar de seu potencial bioativo com potencial bioherbicida, apresenta elevada toxicidade e baixa solubilidade, o que limita muito seu uso direto. Neste contexto, este capítulo propõe a nanoencapsulação do AU, como uma estratégia para contornar essas limitações e avaliar sua viabilidade como nanobioherbicida mais seguro. Para isso, o AU foi encapsulado em nanopartículas poliméricas de CNPPV (NBH) contendo ou não o surfactante Tween® 20 (NBH c/Tw e NBH s/Tw), utilizando o método de nanoprecipitação assistida por microfluídica. A microfluídica permitiu o controle preciso do tamanho e dispersão das partículas, resultando em formulações mais estáveis e homogêneas em comparação à síntese convencional. As análises físico-químicas (DLS, MEV, FTIR, UV-Vis, fluorescência) confirmaram a estabilidade e interação entre os componentes. Os estudos de liberação indicaram perfis controlados de AU, com influência direta da presença do surfactante. A avaliação toxicológica no modelo embrionário de zebrafish (ZFET) revelou que ambas as formulações nanoencapsuladas reduziram significativamente a toxicidade do AU livre. Testes de sobrevivência, frequência cardíaca e comportamento locomotor reforçaram a segurança dos NBHs nas concentrações aplicadas. Imagens por microscopia confocal demonstraram a internalização das nanopartículas nos tecidos embrionários. Esses achados demonstram que a microfluídica é uma estratégia promissora para a produção de nanobioherbicidas à base de AU com maior controle, segurança e aplicabilidade ambiental, e que o modelo zebrafish é uma ferramenta eficaz na avaliação pré-clínica de risco ecotoxicológico.

Palavras-chave: Nanobioherbicida , ácido úsnico, nanoencapsulação, microfluídica, zebrafish.

ABSTRACT

The growing demand for more effective and environmentally safe herbicides has driven the development of nanotechnology-based formulations. Usnic acid (UA), despite its bioactive potential as a natural herbicidal agent, presents high toxicity and low solubility, which significantly limit its direct application. In this context, this chapter proposes the nanoencapsulation of UA as a strategy to overcome these limitations and assess its feasibility as a safer nanobioherbicide. UA was encapsulated in CNPPV-based polymeric nanoparticles (NBH), either containing or not the surfactant Tween® 20 (NBH c/Tw and NBH s/Tw), using a microfluidic-assisted nanoprecipitation method. Microfluidics enabled precise control over particle size and polydispersity, resulting in more stable and homogeneous formulations compared to conventional synthesis. Physicochemical analyses (DLS, SEM, FTIR, UV-Vis, fluorescence) confirmed the stability and interactions among the components. Release studies indicated controlled UA release profiles, directly influenced by the presence of the surfactant. Toxicological evaluation using the zebrafish embryo model (ZFET) revealed that both nanoformulations significantly reduced the toxicity of free UA. Survival rate, heart rate, and locomotor behavior tests further supported the safety of NBHs at the applied concentrations. Confocal microscopy images demonstrated the internalization of nanoparticles into embryonic tissues. These findings demonstrate that microfluidics is a promising strategy for producing UA-based nanobioherbicides with greater control, safety, and environmental applicability, and that the zebrafish model is an effective tool for preclinical ecotoxicological risk assessment.

Keywords: Nanobioherbicide, Usnic acid, nanoencapsulation, microfluidics, zebrafish.

1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia tem impulsionado o surgimento de sistemas nanoestruturados com aplicações promissoras nas áreas biomédica, farmacêutica, agrícola e ambiental. As nanopartículas (NPs), graças ao seu reduzido tamanho e alta área superficial, interagem eficientemente com estruturas celulares, podendo atravessar barreiras biológicas, liberar compostos de forma controlada e alcançar alvos específicos com maior precisão (Huang et al., 2017; Stark et al., 2015). No entanto, essas mesmas propriedades que favorecem a eficácia dos nanossistemas também levantam preocupações quanto à sua segurança toxicológica, uma vez que sua internalização pode desencadear efeitos adversos como estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e citotoxicidade (Fröhlich & Roblegg, 2016; Tada-Oikawa et al., 2016; Ude et al., 2017).

Além disso, estima-se que mais de 10 mil toneladas de nanomateriais (NMs) sejam liberadas anualmente no meio ambiente, com tendência de aumento significativo até 2050, especialmente em sistemas aquáticos e solos agrícolas (Giese et al., 2018). Apesar do crescente uso de NPs em formulações comerciais, ainda são escassos os dados sobre seus efeitos ecotoxicológicos e mecanismos de toxicidade, dificultando sua regulamentação e classificação de risco (Bundschuh & Tomaszewska, 2018; Khan et al., 2019).

A avaliação de segurança de nanomateriais pode ser realizada por diferentes plataformas, que variam de ensaios in vitro com culturas celulares até organismos modelos de complexidade crescente, como dáfnias, ouriços-do-mar, roedores e primatas (Gad, 2006; Haque & Ward, 2018). Enquanto modelos simples fornecem dados iniciais sobre citotoxicidade e genotoxicidade em nível celular, somente vertebrados superiores possibilitam a análise integrada de interações fisiológicas complexas. Contudo, o uso de roedores e primatas enfrenta limitações importantes, como alto custo, desenvolvimento embrionário lento, exigência de grandes quantidades de amostra e restrições éticas associadas à experimentação animal (Haque & Ward, 2018).

Nesse contexto, torna-se necessário adotar modelos alternativos que conciliem custo reduzido, robustez experimental e relevância biológica. O peixe-zebra (*Danio rerio*) tem se consolidado como um sistema experimental altamente eficaz para estudos de nanotoxicologia, sendo especialmente útil para triagens de segurança de sistemas nanoparticulados aplicados ao meio ambiente. Sua transparência embrionária, desenvolvimento rápido e alta homologia genética com vertebrados superiores o tornam

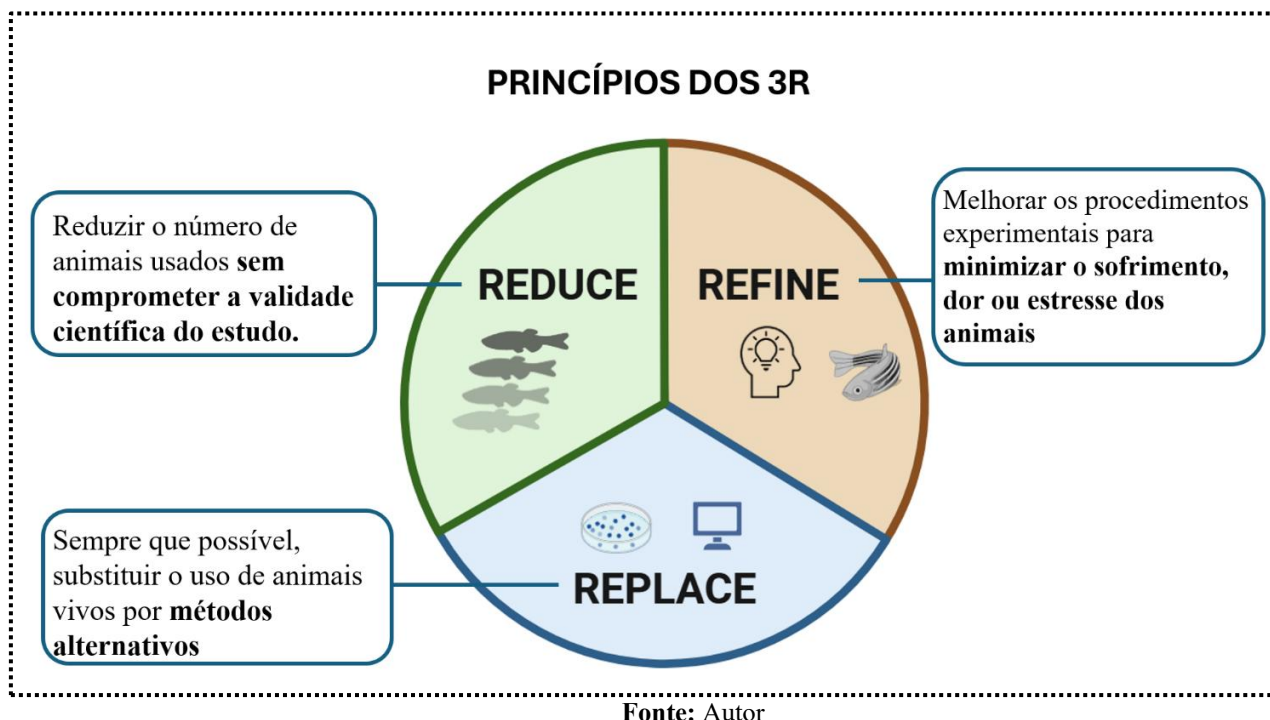
uma alternativa promissora para compreender os possíveis impactos ambientais de nanopartículas funcionais (Chakraborty et al., 2016).

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é um modelo vertebrado amplamente estabelecido para investigações em biologia do desenvolvimento e em estudos de doenças humanas (Dooley, 2000a; Haffter et al., 1996). Seu uso tem se expandido significativamente em pesquisas pré-clínicas e em toxicologia ambiental, principalmente devido às suas características experimentais vantajosas (Glaberman et al., 2016; MacRae & Peterson, 2023; Ribas & Piferrer, 2014). Trata-se de um organismo de pequeno porte, com manejo e manutenção de baixo custo, o que o torna altamente acessível para experimentação laboratorial (MacRae & Peterson, 2023; Pandelides et al., 2024). Além disso, apresenta elevada taxa de fecundidade — uma única fêmea pode gerar cerca de 300 ovos por ciclo reprodutivo, permitindo a obtenção de amostras estatisticamente robustas com facilidade (Dooley, 2000b; Stark et al., 2015).

Geneticamente, o peixe-zebra compartilha aproximadamente 70% de similaridade genômica com o ser humano (MacRae & Peterson, 2023; Pandelides et al., 2024), incluindo alta conservação de processos fisiológicos fundamentais e a presença de sistemas de órgãos análogos, como os sistemas nervoso, digestivo e cardiovascular (Hsu et al., 2007). Essa homologia funcional contribui para a forte correlação observada nas respostas a agentes farmacológicos entre as duas espécies (MacRae & Peterson, 2023), o que sustenta sua aplicação em modelos experimentais que mimetizam diversas doenças humanas tanto em nível genético quanto fenotípico (Pandelides et al., 2024)

Com o objetivo de aplicar os princípios dos 3Rs — **redução, refinamento e substituição** (*reduction, refinement, replacement*), ver Figura 1; nos ensaios de toxicidade aguda em peixes, foi desenvolvido o teste de toxicidade aguda em embriões de peixe (FET Test) como alternativa ética ao uso de peixes adultos ou juvenis. Esse método, descrito na diretriz da (*Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test*, 2025), permite avaliar a toxicidade aguda de substâncias químicas em estágios embrionários de desenvolvimento. Nessa fase, o sistema nervoso ainda se encontra em formação, o que implica na ausência de percepção de dor ou desconforto, tornando os embriões uma opção válida e humanitária para substituir organismos mais desenvolvidos em testes ecotoxicológicos.

Figura 1. Princípios dos 3Rs na experimentação científica.



O teste FET com embriões de zebrafish oferece diversas vantagens em relação aos testes convencionais com mamíferos, como menor tempo de duração, menor custo, menor uso de composto e fácil manipulação. O desenvolvimento rápido do zebrafish, com embriogênese completa em 72 horas pós-fertilização (hpf) e órgãos funcionais em 96 hpf, permite análises em estágios-chave do desenvolvimento. Seu córion transparente facilita a observação direta dos efeitos tóxicos de substâncias. A duração de 96 horas do FET abrange fases em que há maior captação de substâncias e ativação metabólica (Chakraborty et al., 2016). Por exemplo em 48hpf o córion, membrana acelular que protege o embrião até a eclosão, possui poros cuja permeabilidade varia ao longo do desenvolvimento (Ribas & Piferrer, 2014). Após 72 hpf, os embriões conseguem ingerir substâncias por via oral, o que facilita muito a interação com substâncias dos testes (MacRae & Peterson, 2023). Portanto, o FET se destaca como ferramenta relevante para avaliar riscos ambientais, já que alterações nos primeiros estágios de vida impactam crescimento, reprodução e sobrevivência em ambientes contaminados (Glaberman et al., 2016; MacRae & Peterson, 2023).

Neste contexto, o modelo embrionário do zebrafish (*Danio rerio*) tem se consolidado como uma ferramenta sensível e de alto rendimento para a triagem

toxicológica de nanomateriais, incluindo herbicidas nanoencapsulados. Assim, considerando o crescente uso de compostos naturais como o ácido úsnico (AU) em formulações nanoparticulados e sua reconhecida toxicidade em modelos aquáticos, torna-se essencial investigar se a encapsulação em NBHs pode representar uma estratégia eficaz e mais segura de aplicação ambiental.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Síntese das nanopartículas utilizando o método de microfluídica

A síntese das nanopartículas CNPPV-AU foi conduzida em sistema microfluídico utilizando os microchips produzidos, adaptando-se as concentrações previamente estabelecidas para nanoprecipitação. A fase orgânica foi preparada dissolvendo 1 mL da solução estoque de ácido úsnico (AU, 2,5 mg/mL) e 250 μ L da solução estoque de CNPPV *poly*(2,5-di(hexyloxy)cyanoterephthalylidene) (Sigma-Aldrich, 2,5 mg/mL) em tetraidrofurano (THF, IMPEX). A fase aquosa foi obtida diluindo 1 mL de solução estoque de Tween 20 e 30 μ L de NaOH (20 mg/mL) em 9 mL de água destilada.

As soluções foram injetadas no microchip por meio de seringas independentes utilizando bombas de seringa (PHD ULTRA, marca Harvard Apparatus), com vazão de 30 μ L min⁻¹ para a fase orgânica e 320 μ L/min para a fase aquosa, promovendo mistura controlada no interior dos microcanais. O efluente foi coletado diretamente em bquer contendo barra magnética, mantido sob agitação contínua e protegido da luz por 24 h à temperatura ambiente, permitindo a evaporação completa do solvente orgânico. O volume final foi ajustado para 10 mL com água deionizada.

Além da formulação padrão do nanobioherbicida (NBH). Foi também sintetizada a formulação NPs 0, contendo a mesma concentração de CNPPV da NBH, mas sem AU, e uma formulação sem surfactante (NBH sem /Tw) para avaliação do papel do estabilizante na formação das partículas. Todas as amostras foram armazenadas em frascos âmbar, à temperatura ambiente e protegidas da luz até a caracterização.

2.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

As nanopartículas NBHs e seus componentes foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) em um espectrômetro infravermelho (Perkin-Elmer, Waltham, Massachusetts, EUA), com o auxílio de um acessório de refletância total atenuada (ATR) com cristal de germânio.

Inicialmente foi realizado o “*background*” antes de coletar o espectro de cada amostra em pó no modo transmitância. Para tal, as nanopartículas foram liofilizadas para realização dessa análise. Os parâmetros foram definidos em 10 varreduras no intervalo de 4000 a 600 cm^{-1} , com resolução 4 cm^{-1} no intervalo de 0,5 cm^{-1} .

2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para o preparo das amostras inicialmente foi realizado uma diluição 1/100 (v/v) em água das amostras de NPs. Na sequência foram depositados 10 μL de cada uma das amostras em lamínulas de vidro 18 mm x 18 mm, onde permaneceram por 24h em temperatura ambiente para secagem e fixação. Por fim, as amostras foram colocadas em suporte e revestidas com uma fina camada de ouro depositada pela evaporadora (Denton Vacuum Desk III). Após a deposição de ouro, as amostras foram levadas ao microscópio MEV JEOL modelo (JSM-6380LV) e obtidas as imagens, a uma tensão de 15 KV e ampliações de 10.000x, 25.000x e 50.000x.

2.4 Cinética de liberação *in vitro* do ácido úsnico.

Para verificar a cinética de liberação do AU livre e associada aos nanocarreadores foi utilizado um modelo de dois compartimentos (um compartimento doador e outro receptor), unidos por uma membrana de celulose (Spectrapore®, com poro para exclusão molecular de 1 KDa.). Os nanobioherbicidas foram dispostas no compartimento doador (1,0 mL) enquanto o compartimento receptor contendo o solvente (15 mL de água), sob agitação leve, alíquotas foram retiradas em intervalos de tempo, durante 33 h. As alíquotas foram analisadas por espectroscopia de UV-visível e devolvida no compartimento receptor, e os resultantes foram plotados em porcentagem de liberação em função do tempo.

A partir das curvas de liberação do AU, utilizou-se o software Origin 9.0 para testar diferentes modelos matemáticos de dissolução. Portanto, tais modelos foram utilizados a fim de compreender como se comporta o mecanismo de liberação deste ativo. Deste modo, o melhor modelo foi selecionado a partir do coeficiente de determinação (R^2) mais próximo de 1 e o tempo de liberação de cada nanoformulação.

2.5 Diâmetro hidrodinâmico médio e potencial zeta.

A técnica de espectroscopia de correlação de fótons (DLS) foi empregada para avaliação do diâmetro médio das nanopartículas, onde o movimento aleatório das

nanopartículas (movimento browniano) é analisado através da interação entre o feixe de luz e a suspensão coloidal (Farkas & Kramar, 2021).

As avaliações do diâmetro hidrodinâmico médio, potencial zeta (carga superficial das nanopartículas na presença da água) e do índice de polidispersão (PDI) foram realizadas diluindo 1:100 a amostra em uma solução de NaCl 10 mM, utilizando uma cubeta de eletroforese (DTS1070) e o equipamento ZetaSizer Nano (Malvern) a um ângulo de 90° e 173° e um laser com comprimento de onda de 633nm, temperatura de 25 °C. Cada resultado foi expresso como média de três determinações.

2.6 Avaliação da toxicidade em embriões de *Danio rerio* (ZFET)

A toxicidade dos compostos foi avaliada utilizando o modelo de embriões de zebrafish (*Danio rerio*), conforme diretrizes OECD nº 236 (*Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test*, 2025), com adaptações. Os compostos testados incluíram ácido úsnico livre (AU-livre), nanocarreadores com surfactante (NBH c/Tw) e nanocarreadores sem surfactante (NBH s/Tw), Além disso foi testado previamente o Tween 20 nas concentrações de (20, 40, 80, 120, 180, 250 mg/mL) e determinado o DL₅₀.

Peixes adultos foram mantidos em condições padrão de laboratório (28 ± 1 °C; fotoperíodo 14 h luz/10 h escuro), em sistema de recirculação de água tratada e filtrada. A reprodução foi induzida por pareamento natural, e os ovos fecundados foram coletados nas primeiras 2 hpf (horas pós-fertilização), sendo selecionados apenas os embriões viáveis em estágio de célula única ou duas células.

Para os ensaios, embriões foram distribuídos em placas de 24 poços (1 embrião/poço), contendo 2 mL de solução de cada tratamento. As concentrações testadas foram de 50, 100, 150, 200 e 250 µg/mL, referentes a dose de ácido úsnico, com diluições preparadas em meio E3. Para cada grupo experimental foram utilizados n = 20 embriões, com três réplicas independentes. Como controle negativo, foi utilizado o meio E3, e como controle também usamos NPs 0 (nanopartícula de CNPPV sem AU) , foram testadas concentrações equivalentes nas formulações NBH .

Os embriões foram expostos continuamente aos tratamentos de 2 hpf até 96 hpf, sendo as placas mantidas em estufa BOD a 28 °C, sem renovação de meio. A toxicidade foi monitorada diariamente (24, 48, 72 e 96 hpf), observando os seguintes parâmetros: mortalidade, batimentos cardíacos, anormalidades morfológicas e comportamento locomotor (movimento espontâneo e natação após estímulo).

2.6 Microscopia Confocal para Visualização de Nanopartículas em Embriões de Zebrafish

A distribuição e a internalização das formulações nanoestruturadas NBH c/Tw e NBH s/Tw em embriões de *Danio rerio* foram avaliadas por meio de microscopia confocal de alta resolução. Para esse procedimento, os embriões foram previamente expostos à refrigeração em água gelada (2 °C) por 10 minutos, como forma de imobilização temporária.

Em seguida, os embriões foram posicionados manualmente em placas de fundo de vidro, com a região de interesse voltada para o plano focal. As imagens foram adquiridas utilizando o microscópio STELLARIS Confocal Microscope (Leica Microsystems), equipado com lasers de excitação a 488 nm e sistema de detecção configurado para coleta da emissão em 630 nm, faixa correspondente à fluorescência do polímero conjugado CNPPV. Foram utilizadas objetivas 10x e 20x/, conforme a profundidade e resolução desejada para cada análise.

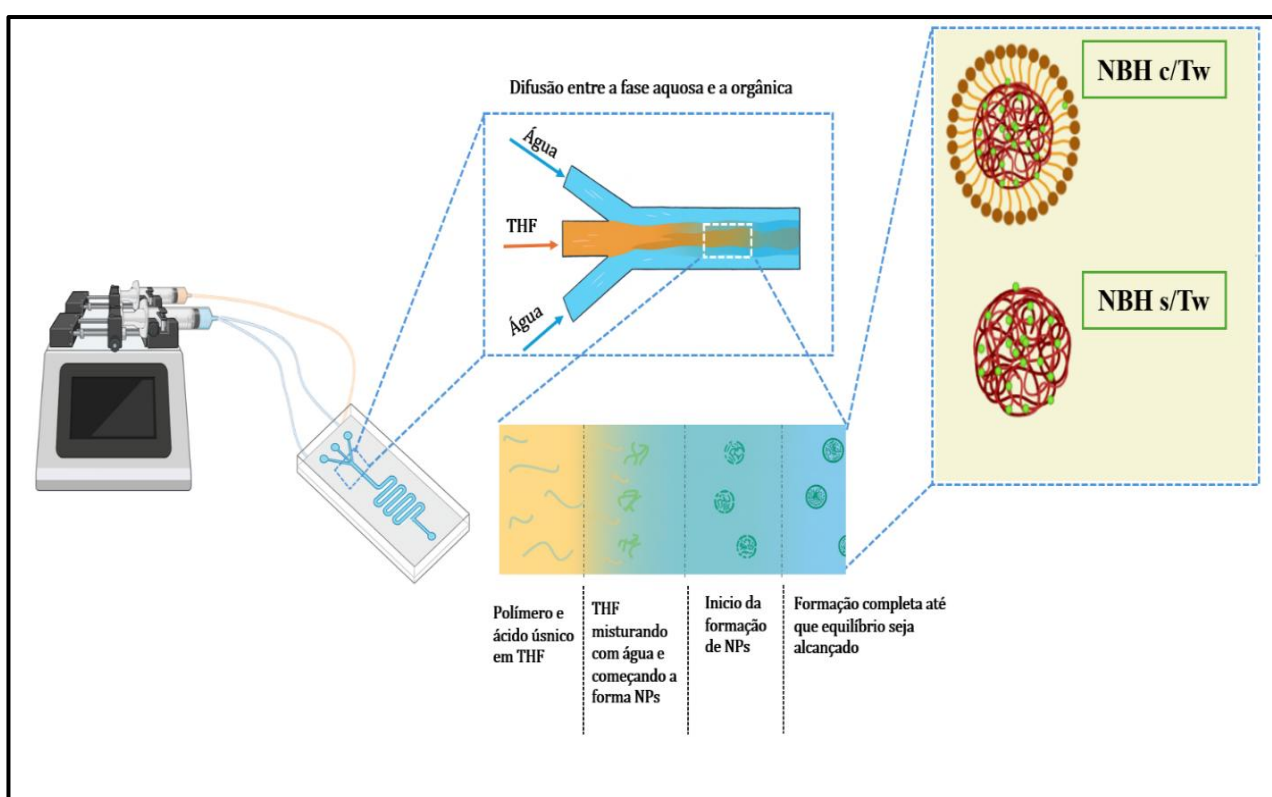
As imagens foram processadas e analisadas nos softwares Leica, com ajustes de contraste, sobreposição de canais, extração de intensidade e renderização tridimensional, quando necessário.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 SÍNTESE DOS NBHs, POR NANOPRECIPITAÇÃO VIA MICROFLUÍDICA.

Foi realizada a síntese de nanopartículas contendo AU utilizando a técnica de nanoprecipitação via microfluídica, método que permite alto controle do fluxo e da mistura entre as fases, favorecendo a formação de sistemas mais homogêneos e reprodutíveis. Foram preparados dois tipos de formulação: com o surfactante Tween® 20 (NBH c/Tw) e sem surfactante (NBH s/Tw), utilizando como matriz o polímero conjugado CNPPV (polímero emissor de fluorescência vermelha).

Figura 2. Representação esquemática da formação dos NBH, utilizando o método da microfluídica.



Fonte: Autor

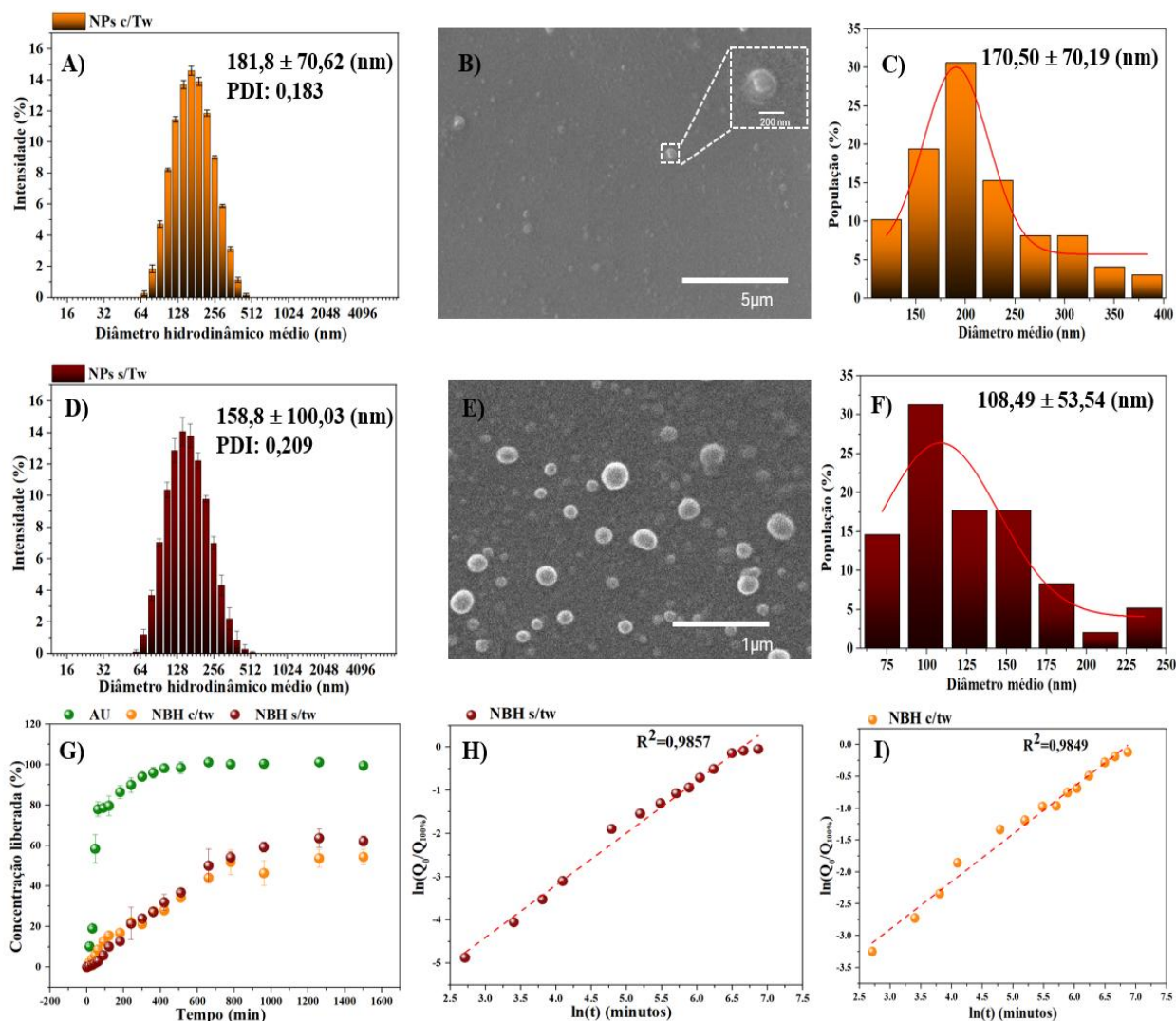
A Figura 2 apresenta uma representação esquemática da formação das nanopartículas por microfluídica. A síntese bem-sucedida pode ser atribuída a interações físico-químicas específicas entre os constituintes. A natureza apolar do AU favorece sua afinidade pelas regiões hidrofóbicas tanto do CNPPV quanto do surfactante Tween 20. Essa interação apolar é potencialmente mediada por forças de Van der Waals, além de possíveis ligações de hidrogênio entre grupos funcionais do AU e do polímero. A presença do surfactante também contribuiu para a formação de uma camada estabilizadora ao redor das partículas, evitando agregação e garantindo estabilidade coloidal durante e após a síntese.

Por outro lado, a ausência do surfactante não impediu a formação de nanopartículas, graças à natureza controlada do processo microfluídico, que permite tempos de mistura rápidos e taxa de nucleação bem definidas. Como será demonstrado nos resultados a seguir, mesmo na ausência do surfactante, foi possível obter partículas com boa estabilidade e desempenho funcional.

3.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS NBHs .

A Figura 3 apresenta a caracterização morfológica, dimensional e de liberação das formulações NBH c/Tw e NBH s/Tw. Na Figura A, observa-se que os NBH c/Tw apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio de $181,8 \pm 70,62$ nm e PDI de 0,183, indicando uma população relativamente homogênea.

Figura 3: Caracterizações dos NBHs: A) e D) - Diâmetro hidrodinâmico médio(nm), C) e F) - Distribuição de tamanho, B) e E) - morfologia por MEV e G), H) e I) - cinética de liberação das formulações NBH com e sem surfactante



Fonte: Autor

A Figura 3 apresenta a caracterização morfológica, dimensional e de liberação das formulações de NBH c/Tw e NBH s/Tw. Na Figura A, observa-se que os NBH c/Tw apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio de $181,8 \pm 70,62$ nm e PDI de 0,183, indicando uma população relativamente homogênea. A imagem de MEV correspondente (Figura 3- B) revela estruturas esféricas, com morfologia compatível com núcleo denso envolto por uma possível camada externa, sugerindo a formação de uma estrutura micelar estabilizada por Tween 20. A presença do surfactante, no entanto, dificulta a visualização de partículas menores, possivelmente devido à formação de uma camada superficial espessa. A distribuição de tamanho obtida por análise de imagem (Figura 3- C) apresenta média de $170,5 \pm 70,19$ nm, corroborando os dados de DLS.

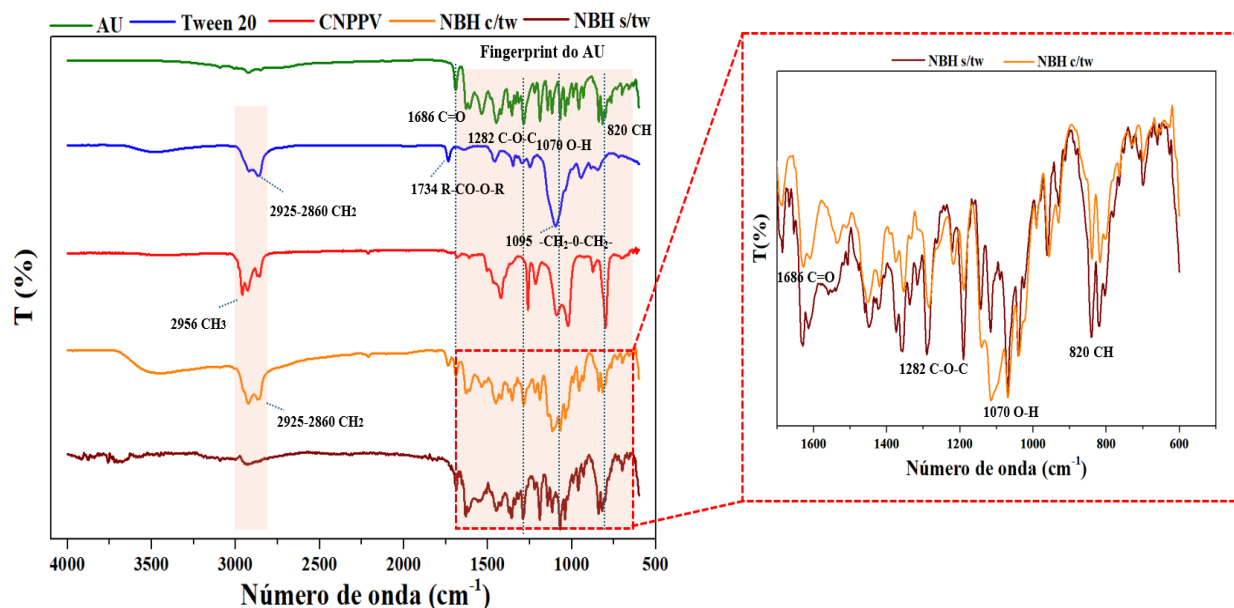
Para a formulação de NBH s/Tw, a Figura 3-D mostra um diâmetro hidrodinâmico médio de $158,8 \pm 100,03$ nm e PDI de 0,209, indicando uma dispersão um pouco maior que o NBH c/Tw. A imagem de MEV (Figura 3-E) revela partículas esféricas bem definidas, com contraste nítido e sem interferência de camada externa, o que facilita a visualização da estrutura do núcleo. A distribuição de tamanhos obtida a partir das imagens de MEV (Figura 3-F) apresentou média inferior às demais técnicas, com valor de $108,49 \pm 53,54$ nm, possivelmente refletindo apenas o núcleo denso visível na microscopia.

Na Figura 3-G, observa-se o perfil de liberação do ácido úsnico e dos NBHs ao longo do tempo. A forma livre do AU apresentou liberação rápida e completa, enquanto as formulações de NBH, com e sem Tween, apresentaram perfis semelhantes, com liberação mais lenta e sustentada, característica de sistemas nanoestruturados. A ausência de diferença significativa entre os perfis de NBH c/Tw e s/Tw sugere que a presença do surfactante não influenciou de forma marcante a cinética de liberação. As curvas foram ajustadas ao modelo de Korsmeyer-Peppas, cujas linearizações estão apresentadas nas Figuras H e I. Ambas as formulações apresentaram alto coeficiente de correlação ($R^2 = 0,9857$ para NBH s/Tw e $R^2 = 0,9849$ para NBH c/Tw), indicando boa aderência ao modelo e compatibilidade com mecanismos de liberação mediados por difusão.

Esses resultados demonstram que a síntese controlada das formulações de NBHs, por microfluídica, possibilita a produção de nanocarreadores com características físico-químicas adequadas para aplicação agrícola, com estabilidade coloidal e liberação sustentada do ácido úsnico. A presença do surfactante Tween 20, embora tenha contribuído para maior homogeneidade e estabilidade das nanopartículas, não alterou

significativamente os perfis de liberação do ativo, mas pode influenciar outros aspectos biológicos, como a toxicidade. Nesse contexto, torna-se essencial investigar os possíveis efeitos tóxicos das formulações de NBH com e sem Tween 20 em modelos biológicos sensíveis, como o teste de toxicidade embrionária com *Danio rerio* (ZFET).

Figura 4: Espectros de Infravermelho dos NBHs e seus compostos individuais.



Fonte: Autor

Podemos observar na Figura 4, a comparação entre os espectros dos compostos e dos nanocarreadores (NBH); notam-se as assinaturas esperadas de cada componente e como elas se combinam nas formulações. O AU livre apresenta bandas características entre 800 e 1800 cm^{-1} , atribuídas à flexão C-H aromática ou associada ao grupo metil, alongamento e flexão O-H ($\sim 1070 \text{ cm}^{-1}$) e alongamento C=O ($\sim 1686 \text{ cm}^{-1}$) de um éter, que compõem a impressão digital do composto e se repetem em ambos os NBHs (Alpsoy et al., 2018; Chircov et al., 2023b). Quando comparamos essas bandas nos NBHs, elas se tornam mais largas e levemente deslocadas para menor número de onda, o que pode estar indicando interações por ligação de hidrogênio e confinamento do AU na matriz (Chircov et al., 2023c; Stoica (Oprea) et al., 2023). Ao analisarmos o espectro do Tween 20, observamos também seus sinais característicos; é interessante notar que as vibrações de estiramento metilênico assimétrica e simétrica CH_2 ($2925\text{--}2860 \text{ cm}^{-1}$) aparecem no NBH c/tw e não são vistas no NBH s/tw, conforme esperado. Além disso, identificamos no NBH

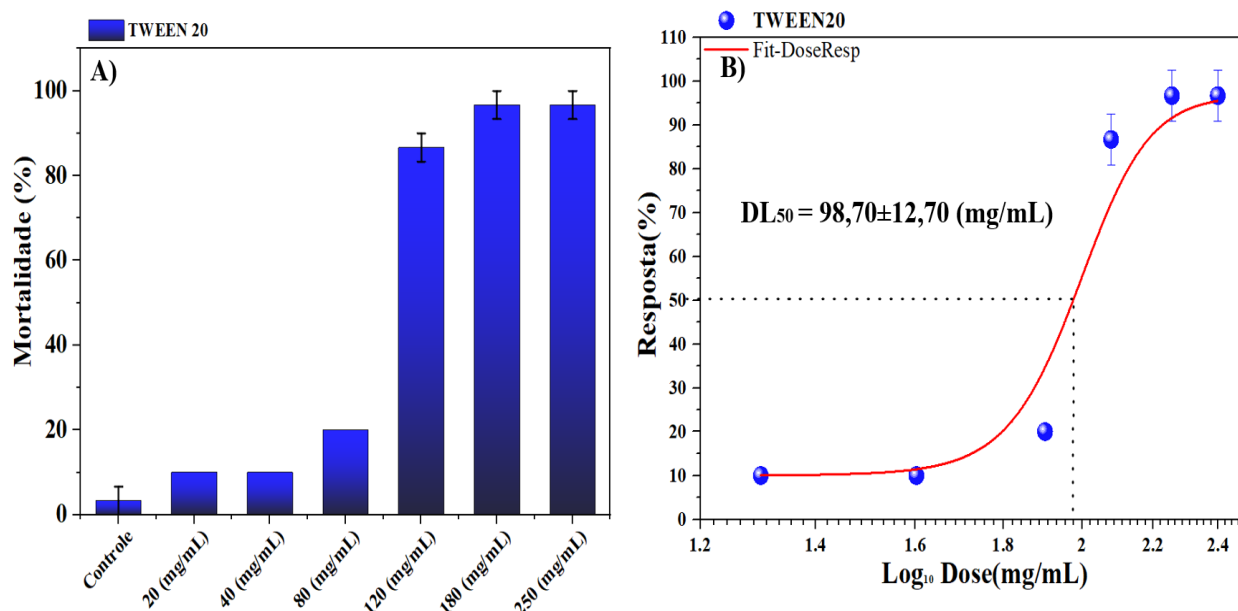
c/tw uma banda sutil em $\sim 2956\text{ cm}^{-1}$, correspondente ao alongamento assimétrico CH_3 , característica atribuída ao CNPPV, o que pode indicar interação com o Tween 20 e estar relacionado à formação de micela, uma vez que tal banda não é observada na NBH s/tw.

Na Figura 4-B ao compararmos os fingerprints dos NBHs sobrepostos, verifica-se que, na faixa $1700\text{--}500\text{ cm}^{-1}$, a alta coincidência espectral indica a manutenção da mesma arquitetura química (CN-PPV + AU), sem indícios de transformação química do polímero ou do AU. Já na NBH c/tw, as bandas apresentam menor intensidade, o que sugere encapsulamento do AU e possível atenuação da resposta espectral pelo surfactante. Ademais, a banda em 1421 cm^{-1} , característica do CNPPV, permanece presente em ambos os NBHs, assim como o pico em 1017 cm^{-1} , assim como todas as bandas características dos grupos funcionais do AU.

3.3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE EMBRIONÁRIA EM *DANIO RERIO* (ZFET).

Antes de iniciar os ensaios de toxicidade com as formulações nanoestruturadas contendo ácido usnício, foi avaliado o potencial tóxico do surfactante Tween 20 isoladamente no modelo ZFET, com o objetivo de estabelecer uma faixa segura de concentração. A Figura 5 mostra que concentrações acima de 80 mg/mL resultaram em aumento significativo da mortalidade dos embriões de *Danio rerio*, alcançando 100% de letalidade em 250 mg/mL após 96 horas de exposição. A análise dose-resposta (Figura 5-B) permitiu estimar uma DL_{50} de $98,70 \pm 12,70\text{ mg/mL}$, valor consistente com estudos prévios que relatam efeitos tóxicos de surfactantes não iônicos em organismos aquáticos, mesmo em concentrações moderadas (Carraschi et al., 2011; Vaughan & van Egmond, 2010).

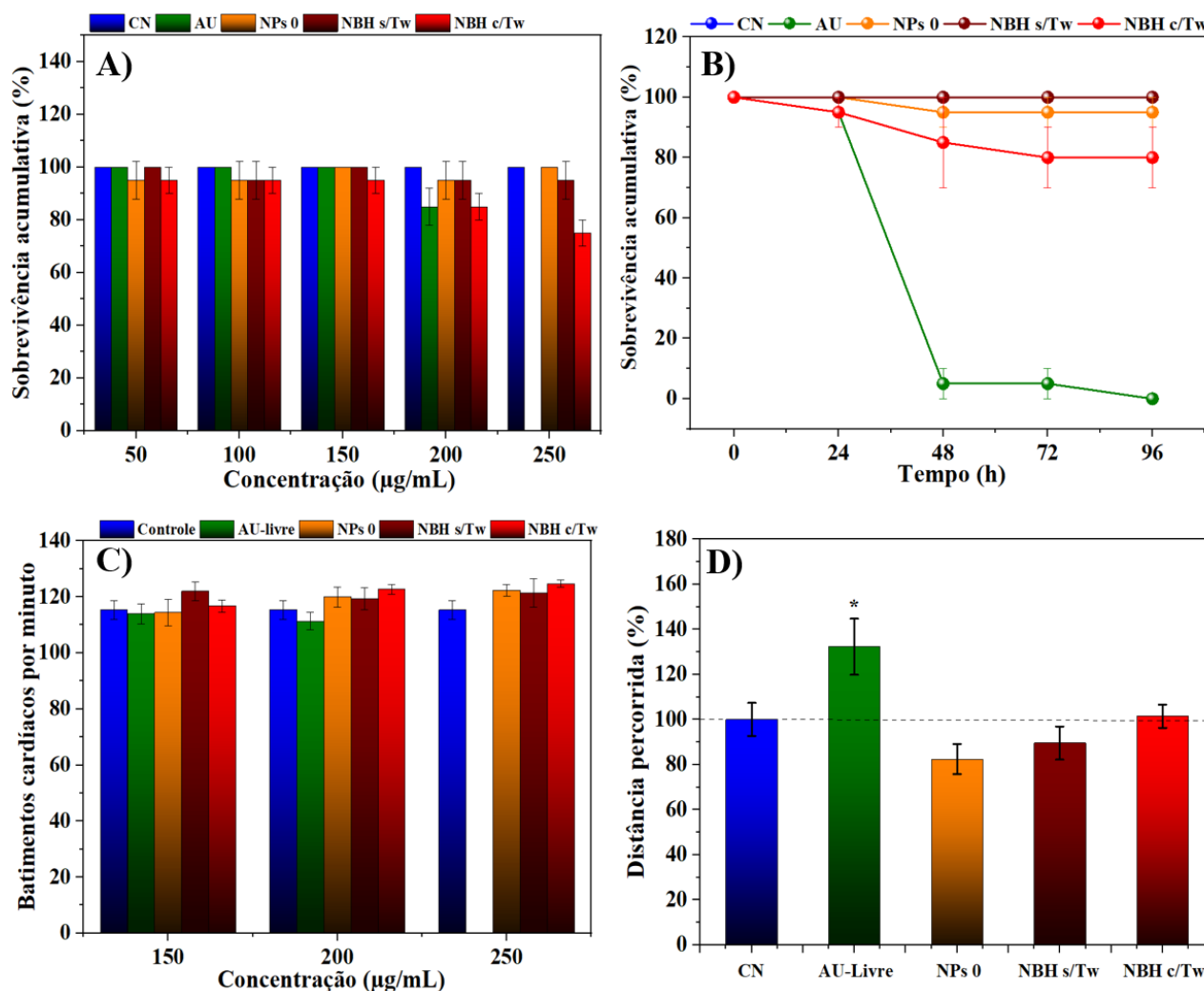
Figura 5. Avaliação da toxicidade aguda do surfactante Tween 20 no modelo ZFET. (A) Mortalidade acumulada após 96 horas de exposição a diferentes concentrações de Tween 20. (B) Curva dose - resposta, ajustada ao modelo log-logístico.



Fonte: Autor

Com base nesses dados, foi possível definir que concentrações abaixo de 20 mg/mL por não causar efeitos letais no modelo, sendo consideradas seguras para os testes subsequentes com os nanobioherbicidas. Importante ressaltar que, nos ensaios com NBH e AU, as concentrações finais de Tween 20 utilizadas foram da ordem de µg/mL, ao menos 1000 vezes inferiores à DL₅₀ estimada, o que descarta interferência significativa do surfactante nos efeitos observados, garantindo maior confiabilidade na interpretação dos resultados biológicos das formulações testadas.

Figura 6. Avaliação da toxicidade aguda e subletal das formulações NBHs e de seus componentes em embriões de *Danio rerio* (ZFET). A) Sobrevivência acumulada após 96 h de exposição a diferentes concentrações. B) Curva de sobrevivência ao longo do tempo para a maior concentração (250 µg/mL). C) Frequência cardíaca média aos 48h após exposição. D) Distância percorrida em teste de locomoção, como indicador de neurotoxicidade (200 µg/mL).

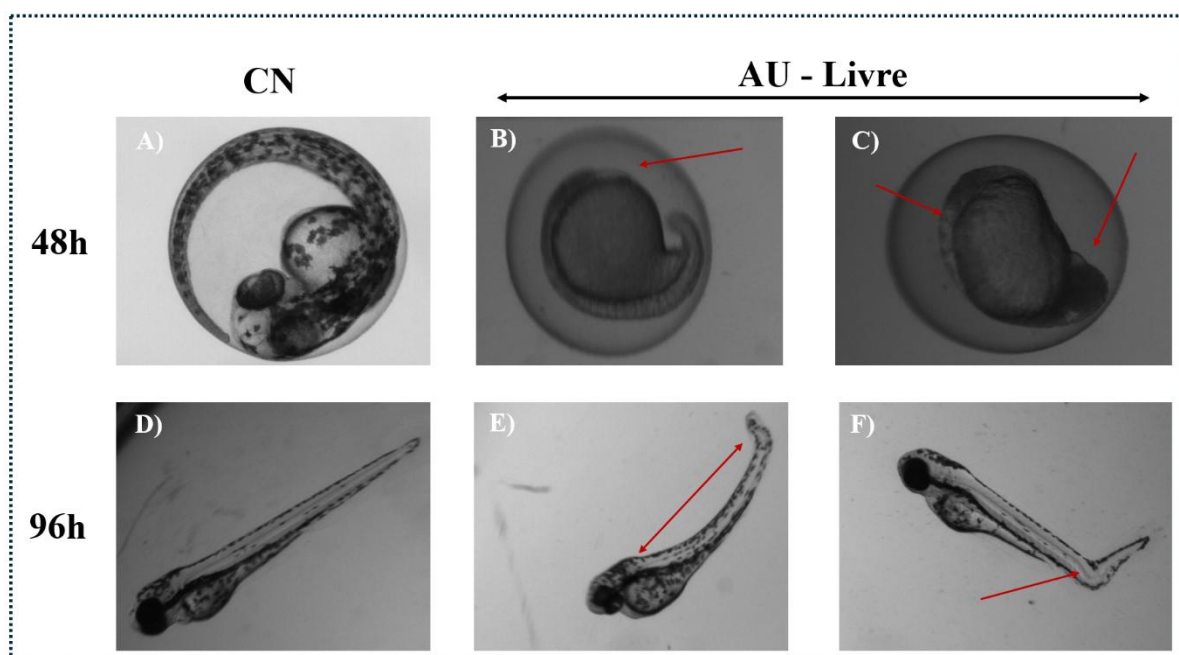


Fonte: Autor

A Figura 6 apresenta os dados de toxicidade aguda e subletal das formulações NBHs e seus respectivos controles no modelo ZFET. Os resultados de sobrevivência acumulada (Figura 6-A) demonstram que a formulação contendo ácido úsnico livre foi a única a causar 100% de mortalidade na maior concentração testada (250 µg/mL), enquanto o NBH c/Tw apresentou uma letalidade moderada (~20%) nessa mesma concentração. Os demais grupos, incluindo NBH s/Tw, NPs 0 e os controles, não apresentaram efeitos letais significativos, mesmo em concentrações elevadas. Essa tendência foi confirmada ao longo do tempo (Figura 6-B), onde se observa que a toxicidade do AU livre foi progressiva e

acentuada, levando à mortalidade total em 48 h. Nas concentrações subletais de (200 $\mu\text{g/mL}$) também foi possível ver algumas alterações no desenvolvimentos embriões de Zebrafish, tanto em 48h quanto em 96h, ver Figura 7, ao passo que as formulações nanoestruturadas mantiveram alta taxa de sobrevivência até 96 h, e sem observar alterações morfológicas nos embriões de Zebrafish.

Figura 7: Efeitos morfológicos induzidos pelo AU-livre em embriões de Zebrafish avaliados por microscopia óptica após 48 e 96 horas de exposição A) e D) controles, B) e C) atrasos no desenvolvimento respectivamente, e E) e F) Lordose e entorse na calda, respectivamente.



Fonte: Autor

Esses achados indicam que a nanoencapsulação do ácido úsnico, sobretudo na ausência de surfactante, reduz significativamente sua toxicidade aguda, possivelmente devido à liberação controlada do ativo e à menor interação direta com tecidos embrionários. No entanto, a presença do Tween 20 parece ter contribuído para um leve aumento da toxicidade da NBH c/Tw em relação à NBH s/Tw, o que corrobora dados anteriores sobre os efeitos subletais de surfactantes em modelos aquáticos (Carraschi et al., 2011; Vaughan & van Egmond, 2010).

Nas avaliações subletais, os batimentos cardíacos por minuto (Figura 7-C) não apresentaram alterações significativas entre os grupos, sugerindo ausência de efeitos cardíacos tóxicos nas formulações testadas. Por outro lado, o teste de locomoção (Figura 7-D), que avalia potenciais efeitos neurocomportamentais, revelou um aumento significativo

da distância percorrida apenas no grupo tratado com AU livre, indicando possível excitação neuromuscular ou efeito neurotóxico agudo (Kanungo et al., 2024). As formulações de NBHs, com ou sem surfactante, não apresentaram alterações significativas nesse parâmetro, reforçando seu perfil de segurança em relação à neurotoxicidade.

Os resultados observados neste estudo corroboram achados prévios que demonstram a elevada toxicidade do AU-livre em modelos aquáticos, especialmente em embriões de *Danio rerio*, com relatos de efeitos letais e subletais associados à sua alta lipofilicidade e capacidade de atuar como desacoplador mitocondrial (Draut et al., 2017). Por outro lado, a encapsulação do AU em nanocarreadores tem sido amplamente estudada como estratégia para mitigar sua toxicidade, promover liberação controlada e aumentar sua seletividade biológica (Croce et al., 2022c; Zugic et al., 2020). Trabalhos recentes com nanopartículas poliméricas à base de PLGA e outros copolímeros demonstraram que o encapsulamento de moléculas ativas, reduz drasticamente a toxicidade em modelos in vivo, inclusive no ZFET (Agraharam et al., 2021; Singha et al., 2024).

Com relação ao uso de polímeros conjugados, como o CNPPV presente nas formulações de NBHs, estudos demonstram que, apesar de sua alta fluorescência e aplicação biomédica, esses materiais apresentam baixo impacto tóxico quando devidamente processados em sistemas nanoestruturados estáveis (Guo et al., 2023; T. Li et al., 2023). Isso respalda a segurança observada nas formulações NPs 0 e NBHs, indicando que o polímero conjugado utilizado não contribuiu significativamente para efeitos adversos no modelo ZFET.

Nossos dados reforçam esses achados ao demonstrar que ambas as formulações de NBH, com e sem Tw, apresentaram perfis de segurança superiores ao AU livre, mesmo em concentrações elevadas. Além disso, a ausência de alterações nos batimentos cardíacos e no comportamento locomotor nas formulações encapsuladas indicam uma redução eficaz da toxicidade neurológica e cardiotóxica associada ao AU.

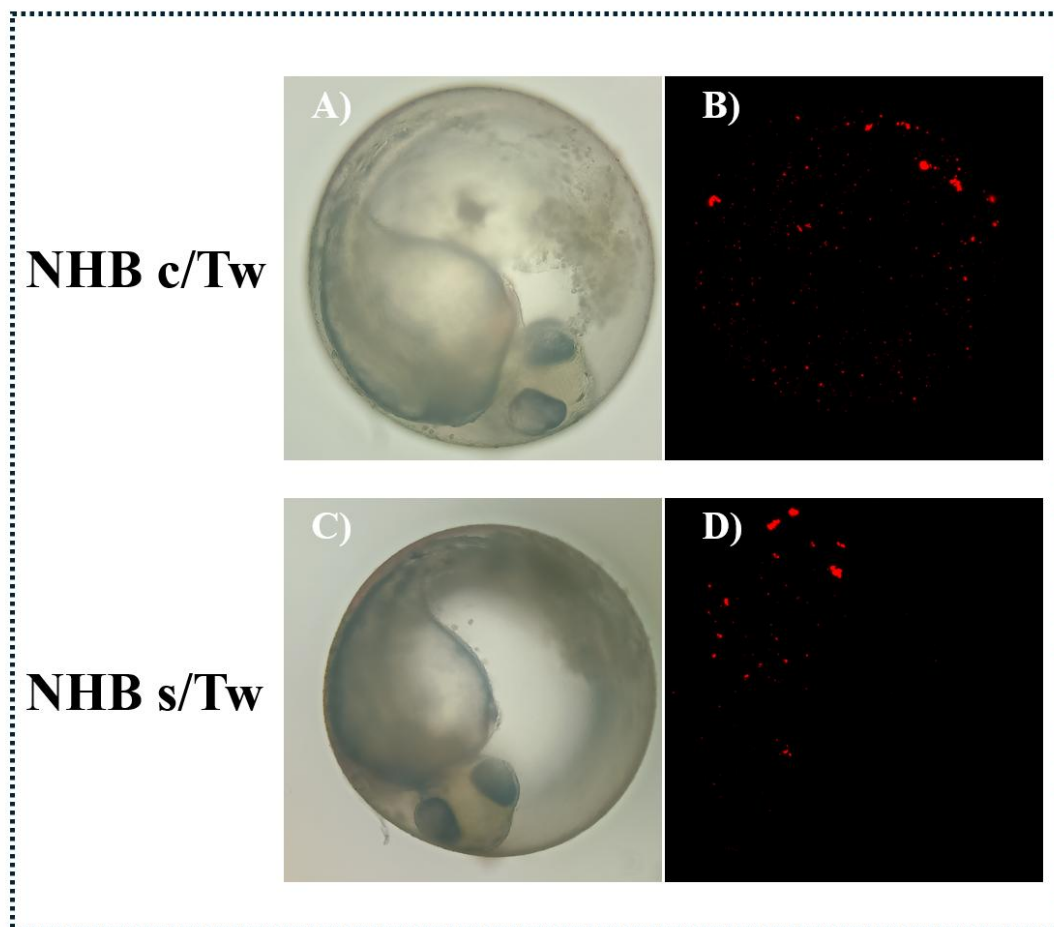
Esses resultados demonstram que a nanoencapsulação do AU foi eficaz em reduzir sua toxicidade global no modelo embrionário, sendo uma abordagem promissora para o desenvolvimento de nanobioherbicidas ambientalmente seguros.

3.4 VISUALIZAÇÃO E ANÁLISE DA INTERNALIZAÇÃO DE NBH EM EMBRIÕES DE ZEBRAFISH

A Figura 8 apresenta imagens representativas de embriões de Zebrafish ainda nos ovos, expostos ao NBH c/Tw e NBH s/Tw, para identificar onde as nanopartículas se

internalizam nos embriões. As imagens em campo claro (A e C) mostram embriões aparentemente íntegros, sem malformações visíveis no estágio observado, sugerindo que a exposição às nanopartículas em ambas as formulações não induziu efeitos morfológicos agudos visíveis no tempo analisado.

Figura 8. Comparação NBH com e sem Tween em Embriões de Zebrafish em 48h após exposição: A) e C) Imagens em Campo Claro e B) e D) Fluorescência Confocal



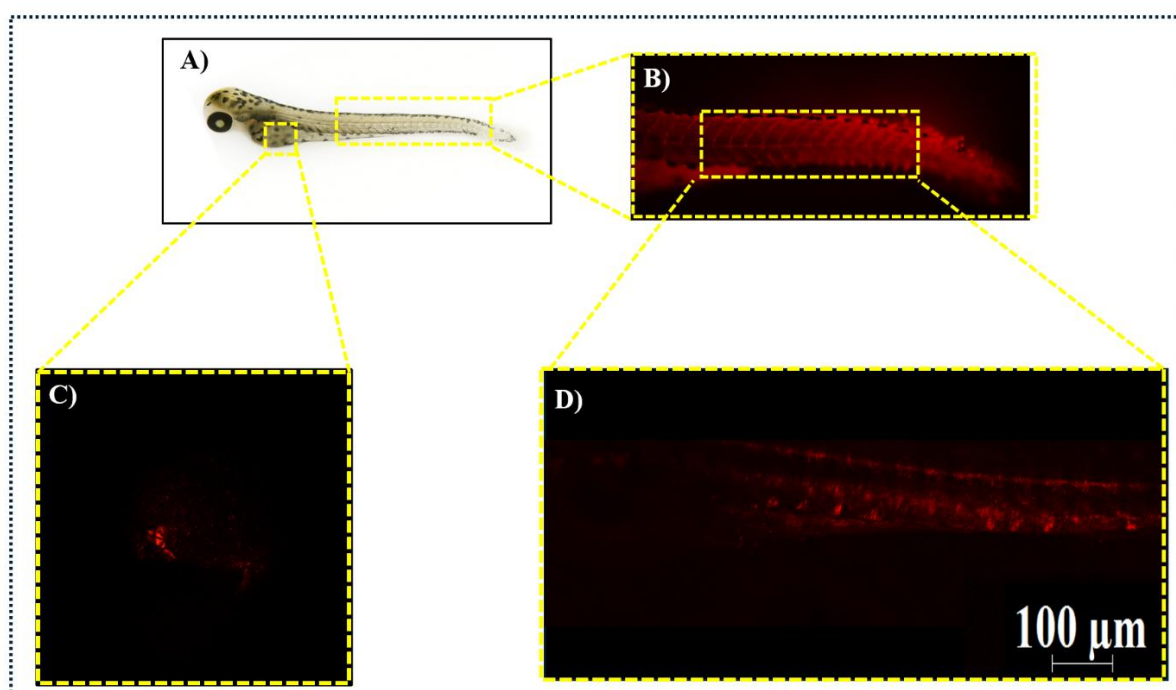
Fonte: Autor

Por outro lado, as imagens obtidas por microscopia confocal (Figura 8 B e D) revelam diferenças marcantes na distribuição da fluorescência associada às nanopartículas. No caso da formulação NBH c/Tw (Figura 8-B), observa-se uma distribuição homogênea e intensa de pontos fluorescentes ao longo da superfície do córion, indicando boa estabilidade coloidal e dispersão das nanopartículas, provavelmente devido à presença do surfactante.

Em contraste, a formulação NBH s/Tw (Figura 8-D) mostra fluorescência mais espaçada e concentrada em aglomerados, sugerindo maior tendência à agregação, o que pode ser atribuído à ausência do Tween. Além disso, os achados reforçam a importância

do surfactante na formulação de sistemas nanoestruturados aplicados a modelos biológicos. A distribuição mais difusa e intensa da fluorescência no córion em NBH c/Tw também pode estar associada a maior interação inicial com a membrana externa do embrião, o que pode estar relacionado dados de toxicidade, visto anteriormente, uma vez que a melhor dispersão e adesão das partículas podem potencializar a absorção e os efeitos biológicos do ácido úsnico encapsulado.

FIGURA 9. Internalização dos NBH c/Tw em embriões de Zebrafish: (A) imagem de campo claro do embrião de zebrafish (B) imagem de fluorescência da calda do zebrafish (C) imagem de microscopia confocal da NBH no estomago do Zebrafish, (D) imagem de microscopia confocal em planos mais internos da calda do zebrafish



Fonte: Autor

A Figura 9, composta evidencia a localização das nanopartículas fluorescentes (NBH) em embriões de zebrafish aos 96 hpf. A imagem em campo claro (Figura 9-A) situa as regiões anatômicas onde os sinais de fluorescência foram detectados. Em (Figura 9-B), observa-se fluorescência intensa na região externa da cauda, sugerindo adesão superficial ou retenção nas estruturas epiteliais, sem necessariamente refletir toxicidade interna. Em (Figura 9-C), a fluorescência concentrada na região abdominal pode indicar ingestão passiva ou acúmulo no trato gastrointestinal. porém não associado a alterações fisiológicas nos parâmetros de frequência cardíaca ou natação, como observado nos ensaios anteriores.

Já (Figura 9-D) demonstra distribuição mais interna ao longo do eixo corporal, indicando possível absorção sistêmica em baixa intensidade.

Apesar dessa biodistribuição, os dados de toxicidade aguda e subletal demonstraram que os NBHs, tanto com quanto sem Tween, foram significativamente menos tóxicos que o AU-livre. Os resultados reforçam que, embora os NBHs possam ser internalizadas, a sua formulação nanoestruturada mitiga os efeitos adversos, provavelmente por reduzir a liberação abrupta e o contato direto do ácido úsnico com tecidos sensíveis. A visualização da fluorescência, portanto, complementa os dados funcionais e corrobora a segurança dos NBH como alternativa promissora para aplicações biológicas controladas.

4 CONCLUSÃO

Neste capítulo, foram desenvolvidos, caracterizados e avaliados dois sistemas de nanocarreadores baseados em polímero condutor (CNPPV) encapsulando ácido úsnico (AU), utilizando abordagem microfluídica, com e sem a presença do surfactante Tween 20. A caracterização físico-química confirmou a formação de nanopartículas com morfologia esférica, tamanhos nanométricos bem distribuídos e baixos valores de polidispersividade, especialmente para o sistema contendo Tween 20 (NBH c/Tw), evidenciando maior estabilidade coloidal.

O perfil de liberação indicou que ambos os sistemas nanoestruturados foram capazes de promover uma liberação controlada do AU ao longo do tempo, em contraste com a liberação imediata do composto livre. A análise espectroscópica por FTIR corroborou o encapsulamento eficaz do AU nas nanopartículas, mantendo as principais bandas características e revelando indícios de interação intermolecular entre os componentes da formulação.

A avaliação toxicológica utilizando o modelo de embriões de zebrafish demonstrou que os nanocarreadores apresentaram significativamente menor toxicidade em comparação ao AU livre, que causou mortalidade precoce, alterações comportamentais e malformações morfológicas severas. Por outro lado, os sistemas NBH não induziram efeitos adversos significativos, mantendo altos índices de sobrevivência, frequência cardíaca estável e comportamento motor preservado. A internalização das nanopartículas foi confirmada por microscopia confocal, com fluorescência distribuída em regiões específicas como trato digestivo e cauda, sugerindo que a internalização ocorre de forma controlada e segura.

Em conjunto, os dados obtidos reforçam o potencial dos NBHs como sistemas promissores para veiculação segura de AU, mitigando sua toxicidade intrínseca e favorecendo futuras aplicações como bioherbicidas e/ou terapêuticas.

5 CONCLUSÃO GERAL

O conjunto de resultados apresentados nesta tese demonstra que a nanoencapsulação do AU em matrizes poliméricas fotoativas de CNPPV constitui uma estratégia promissora para o desenvolvimento de nanobioherbicidas mais controlados, rastreáveis e potencialmente mais seguros do que o uso do composto livre. Ao longo do trabalho, foi possível estabelecer uma trajetória coerente que avança desde o desenho e a caracterização físico-química dessas formulações, passando pela otimização da rota de síntese por microfluídica, até a avaliação integrada de desempenho bioherbicida e toxicidade em modelos representativos de diferentes níveis tróficos. Essa progressão experimental permitiu não apenas cumprir os objetivos específicos propostos, mas também construir uma visão abrangente sobre as potencialidades e os limites desses sistemas na perspectiva de aplicações ambientais.

Do ponto de vista conceitual, a tese confirmou a hipótese central de que a combinação entre um polímero conjugado (CNPPV) e um composto bioativo de origem natural (AU) pode originar um sistema híbrido capaz de associar função herbicida, resposta à luz e rastreabilidade óptica em um único nanomaterial. A possibilidade de modular a liberação do AU por meio de irradiação em comprimentos de onda específicos insere esses nanobioherbicidas em um cenário de “agroquímicos de ação controlada”, em que o tempo, o local e a intensidade da ação podem ser ajustados de forma mais precisa. Essa característica dialoga diretamente com a demanda contemporânea por tecnologias agrícolas que reduzam o uso indiscriminado de insumos e minimizem impactos em organismos não alvo.

Em termos tecnológicos, a migração da rota convencional de nanoprecipitação para a síntese por microfluídica representou um avanço importante. A microfluídica possibilitou maior controle sobre o tamanho das partículas, a polidispersividade e a reprodutibilidade dos lotes, sem perda das propriedades fotofísicas do sistema CNPPV–AU. Esse ganho de controle coloidal não é apenas um refinamento técnico: ele é fundamental quando se pensa em escalonamento, registro regulatório e uso em larga escala, pois formulações mais homogêneas tendem a apresentar comportamento mais previsível no ambiente e em sistemas biológicos. Ao mesmo tempo, este trabalho mostrou

que a introdução de surfactante deve ser cuidadosamente ponderada, uma vez que pode influenciar tanto a formação das nanopartículas quanto a interação com organismos vivos.

No eixo biológico, os resultados com *Lemna minor* mostraram de forma consistente que as formulações desenvolvidas são capazes de interferir na fotossíntese, reduzindo parâmetros associados à eficiência fotoquímica do fotossistema II e ao índice de vitalidade das plantas. Isso confirma o potencial herbicida dos nanobioherbicidas, não apenas pela presença do AU, mas também pela forma como ele é apresentado e liberado no sistema. Importante ressaltar que a abordagem baseada em fluorescência de clorofila permitiu acompanhar de maneira sensível e não destrutiva as alterações foto-fisiológicas ao longo do tempo, oferecendo um modelo robusto para estudar mecanismos de ação de bioherbicidas que atuam sobre o aparato fotossintético.

Em paralelo, a avaliação em embriões de *Danio rerio* (ZFET) contribuiu para posicionar esses nanobioherbicidas dentro de uma perspectiva de risco-benefício mais realista. A comparação entre AU livre e AU nanoencapsulado evidenciou que a nanoestruturação reduz significativamente a toxicidade aguda e subletal em organismo vertebrado modelo, mesmo em concentrações nas quais o composto livre apresenta efeitos mais graves. Esse achado é particularmente relevante, pois reforça a ideia de que a nanotecnologia pode ser utilizada não apenas para “potencializar” a ação de um princípio ativo, mas também para modular sua toxicidade, ampliando a janela de segurança para uso ambiental. Ao mesmo tempo, a confirmação da internalização das nanopartículas nos embriões sublinha a necessidade de manter uma postura cautelosa: embora mais seguras que o AU livre, essas formulações não são isentas de interação com organismos não alvo, e seu uso demanda estudos complementares em condições mais próximas da realidade de campo.

Dessa forma, a progressão entre os capítulos que vão do desenvolvimento à otimização e, por fim, à avaliação de segurança, permite afirmar que esta tese contribui em três frentes principais: (i) científica, ao aprofundar a compreensão dos mecanismos de liberação e ação fotoinduzida de sistemas CNPPV–AU, bem como dos efeitos em parâmetros fotoquímicos e toxicológicos; (ii) metodológica, ao integrar técnicas de espectroscopia de fluorescência de clorofila, ensaios ecotoxicológicos em ZFET e plataformas microfluídica em um mesmo fluxo de investigação; e (iii) aplicada, ao apontar

direções concretas para o desenvolvimento de bioherbicidas nanoestruturados alinhados a práticas agrícolas mais sustentáveis.

Naturalmente, este trabalho também revela limitações e abre um conjunto amplo de perspectivas futuras. A principal limitação reside no fato de que os estudos foram conduzidos em condições controladas de laboratório, com modelos específicos de planta e organismo aquático. Ainda é necessário avançar para cenários mais complexos, que considerem solos reais, interações com microrganismos, espécies vegetais de interesse agrônomo e diferentes regimes de luz e clima. Além disso, a longo prazo, será importante avaliar o comportamento desses nanobioherbicidas em termos de degradação, persistência e possíveis efeitos crônicos em diferentes níveis tróficos, bem como investigar alternativas de polímeros biodegradáveis ou de menor impacto ambiental que possam substituir ou complementar o CNPPV.

Apesar dessas lacunas, o conjunto de evidências construído ao longo desta tese mostra que é possível desenhar nanobioherbicidas que conciliem eficácia, controle de liberação e redução de toxicidade em relação ao ativo livre, oferecendo um caminho concreto para a inovação em manejo de plantas daninhas. Ao articular síntese, caracterização, desempenho bioherbicida e segurança ambiental em uma mesma narrativa, este trabalho contribui para aproximar a nanotecnologia das demandas reais da agricultura e da proteção ambiental, e reforça o papel dos sistemas fotorresponsivos como uma ferramenta estratégica na transição para modelos de produção mais sustentáveis.

6 REFERÊNCIAS

AGRAHARAM, G.; GIRIGOSWAMI, A.; GIRIGOSWAMI, K. Nanoencapsulated Myricetin to Improve Antioxidant Activity and Bioavailability: A Study on Zebrafish Embryos. *Chemistry*, v. 4, n. 1, p. 1–17, 31 dez. 2021.

ALPSOY, L. *et al.* SPION@APTES@FA-PEG@Usnic Acid Bionanodrug for Cancer Therapy. *Journal of Superconductivity and Novel Magnetism*, v. 31, n. 5, p. 1395–1401, 14 maio 2018.

BUNDSCHUH, J.; TOMASZEWSKA, B. (EDS.). *Geothermal Water Management*. [s.l.] CRC Press, 2018.

CARRASCHI, S. P. *et al.* Efeitos tóxicos de surfactantes fitossanitários para o peixe mato grosso (*Hyphessobrycon eques*). *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v. 33, n. 2, 17 maio 2011.

CHAKRABORTY, C. *et al.* Zebrafish: A complete animal model to enumerate the nanoparticle toxicity. *Journal of Nanobiotechnology*, v. 14, n. 1, p. 65, 20 dez. 2016.

CHIRCOV, C. *et al.* Usnic Acid-Loaded Magnetite Nanoparticles—A Comparative Study between Synthesis Methods. *Molecules*, v. 28, n. 13, p. 5198, 4 jul. 2023a.

_____. Usnic Acid-Loaded Magnetite Nanoparticles—A Comparative Study between Synthesis Methods. *Molecules*, v. 28, n. 13, p. 5198, 4 jul. 2023b.

CROCE, N. *et al.* Toxicity of Usnic Acid: A Narrative Review. *Journal of Toxicology*, v. 2022, p. 1–12, 19 out. 2022.

DOOLEY, K. Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Current Opinion in Genetics & Development*, v. 10, n. 3, p. 252–256, 1 jun. 2000a.

_____. Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Current Opinion in Genetics & Development*, v. 10, n. 3, p. 252–256, 1 jun. 2000b.

DRAUT, H. *et al.* Antiangiogenic and Toxic Effects of Genistein, Usnic Acid, and Their Copper Complexes in Zebrafish Embryos at Different Developmental Stages. *Chemistry & Biodiversity*, v. 14, n. 3, 7 mar. 2017.

FARKAS, N.; KRAMAR, J. A. Dynamic light scattering distributions by any means. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 23, n. 5, p. 120, 21 maio 2021.

FRÖHLICH, E.; ROBLEGG, E. Oral uptake of nanoparticles: human relevance and the role of in vitro systems. *Archives of Toxicology*, v. 90, n. 10, p. 2297–2314, 25 out. 2016.

GAD, S. C. (ED.). *Animal Models in Toxicology*. [s.l.] CRC Press, 2006.

GIESE, B. *et al.* Risks, Release and Concentrations of Engineered Nanomaterial in the Environment. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 1565, 25 jan. 2018.

GLABERMAN, S.; PADILLA, S.; BARRON, M. G. Evaluating the zebrafish embryo toxicity test for pesticide hazard screening. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 36, n. 5, p. 1221–1226, 4 out. 2016.

GUO, W. *et al.* Biocompatibility and Biological Effects of Surface-Modified Conjugated Polymer Nanoparticles. *Molecules*, v. 28, n. 5, p. 2034, 21 fev. 2023.

HAFFTER, P. *et al.* The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development*, v. 123, n. 1, p. 1–36, 1 dez. 1996.

HAQUE, E.; WARD, A. C. Zebrafish as a Model to Evaluate Nanoparticle Toxicity. *Nanomaterials*, v. 8, n. 7, p. 561, 23 jul. 2018.

HSU, C.-H. *et al.* The Zebrafish Model: Use in Studying Cellular Mechanisms for a Spectrum of Clinical Disease Entities. *Current Neurovascular Research*, v. 4, n. 2, p. 111–120, 1 maio 2007.

HUANG, Y.-W.; CAMBRE, M.; LEE, H.-J. The Toxicity of Nanoparticles Depends on Multiple Molecular and Physicochemical Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 12, p. 2702, 13 dez. 2017.

KANUNGO, J. *et al.* Screening tools to evaluate the neurotoxic potential of botanicals: building a strategy to assess safety. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, v. 20, n. 7, p. 629–646, 2 jul. 2024.

KHAN, IBRAHIM; SAEED, K.; KHAN, IDREES. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, v. 12, n. 7, p. 908–931, nov. 2019.

LI, T. *et al.* Conjugated Polymer Nanoparticles for Tumor Theranostics. *Biomacromolecules*, v. 24, n. 5, p. 1943–1979, 8 maio 2023.

MACRAE, C. A.; PETERSON, R. T. Zebrafish as a Mainstream Model for In Vivo Systems Pharmacology and Toxicology. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 63, n. 1, p. 43–64, 20 jan. 2023.

PANDELIDES, Z.; ARBLASTER, J.; CONDER, J. Establishing Chronic Toxicity Effect Levels for Zebrafish (*Danio rerio*) Exposed to Perfluorooctane Sulfonate. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 43, n. 1, p. 7–18, 1 jan. 2024.

RIBAS, L.; PIFERRER, F. The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research. *Reviews in Aquaculture*, v. 6, n. 4, p. 209–240, 31 dez. 2014.

SINGHA, A. *et al.* Exploring the potential of curcumin-loaded PLGA nanoparticles for angiogenesis and antioxidant proficiency in zebrafish embryo (*Danio rerio*). *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 10, n. 1, p. 167, 25 nov. 2024.

STARK, W. J. *et al.* Industrial applications of nanoparticles. *Chemical Society Reviews*, v. 44, n. 16, p. 5793–5805, 2015.

STOICA (OPREA), A. E. *et al.* Electrospun Nanofibrous Mesh Based on PVA, Chitosan, and Usnic Acid for Applications in Wound Healing. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 13, p. 11037, 3 jul. 2023.

TADA-OIKAWA, S. *et al.* Titanium Dioxide Particle Type and Concentration Influence the Inflammatory Response in Caco-2 Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, n. 4, p. 576, 16 abr. 2016.

Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. [s.l.] OECD Publishing, 2025.

UDE, V. C. *et al.* Impact of copper oxide nanomaterials on differentiated and undifferentiated Caco-2 intestinal epithelial cells; assessment of cytotoxicity, barrier integrity, cytokine production and nanomaterial penetration. *Particle and Fibre Toxicology*, v. 14, n. 1, p. 31, 23 dez. 2017.

VAUGHAN, M.; EGMOND, R. VAN. The Use of the Zebrafish (*Danio rerio*) Embryo for the Acute Toxicity Testing of Surfactants, as a Possible Alternative to the Acute Fish Test. *Alternatives to Laboratory Animals*, v. 38, n. 3, p. 231–238, 1 jun. 2010.

ZUGIC, A.; TADIC, V.; SAVIC, S. Nano- and Microcarriers as Drug Delivery Systems for Usnic Acid: Review of Literature. *Pharmaceutics*, v. 12, n. 2, p. 156, 15 fev. 2020.

