

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC
Trabalho de Conclusão de Curso | Bacharelado em Química

Cristiane Akemi Marques Enobe

Síntese e caracterização de nanopartículas de quitosana contendo cobre II

Santo André
Agosto – 2021

Cristiane Akemi Marques Enobe

Síntese e caracterização de nanopartículas de quitosana contendo cobre II

Monografia de Trabalho de
Conclusão de Curso, apresentado ao
Bacharelado em Química da UFABC
para obtenção do título de Bacharel
em Química
Orientador: Amedea Barozzi Seabra

Sumário

Resumo.....	1
Abstract.....	1
Introdução	2
Objetivos	3
Materiais e Métodos	4
Materiais.....	4
Métodos	4
Síntese das nanopartículas de quitosana (CS NP).....	4
Síntese das nanopartículas de quitosana contendo íons cobre (CS/Cu ^{II} NP).....	4
Caracterização por espectroscopia de correlação de fótons (DLS)	6
Estabilidade de nanopartículas.....	6
Eficiência de encapsulamento de íons cobre nas nanopartículas de quitosana.....	6
Resultados e Discussões	7
Síntese de nanopartículas de quitosana contendo cobre (CS/Cu ^I).....	7
Caracterização por DLS e Estabilidade das nanopartículas	10
Eficiência de encapsulamento de íons cobre nas nanopartículas de quitosana.....	14
Aplicabilidade das nanopartículas de quitosana na agricultura.....	15
Conclusão	17
Referências Bibliográficas	18

Resumo

Na agricultura, o desenvolvimento de biomateriais que possam substituir os agroquímicos tem se tornado necessário não só porque a resistência de organismos patógenos tem aumentado, mas também pela existência de problemas ambientais relacionados ao uso destes. Neste trabalho a síntese e a caracterização de nanopartículas de quitosana contendo íons cobre são preparadas e caracterizadas como uma potencial alternativa aos agroquímicos aplicados em plantas sob condições de stress, seja ele seca ou solo pobre em nutrientes, que possam causar restrições em seus desenvolvimentos. As nanopartículas de quitosana e nanopartículas de quitosana-cobre foram preparadas baseadas na gelificação ionotrópica da quitosana com ânions tripolifosfato e íons de cobre II. Foram avaliadas a variação de concentração de cobre, a eficiência do encapsulamento dos íons, a estabilidade das nanopartículas e sua potencial aplicação em culturas agrícolas. As nanopartículas sintetizadas possuem valores de PDI entre 0,30 e 0,46 e raio hidrodinâmico entre 140 a 270 nm, sendo estáveis por 9 semanas e com alta eficiência de encapsulação. Sabe-se da literatura que estas nanopartículas possuem alto potencial para induzir o crescimento de algumas culturas de plantas e combater alguns organismos patógenos.

Palavras chaves: Íons cobre; Quitosana; Nanopartículas; agricultura.

Abstract

In agriculture, the development of biomaterials that can replace agrochemicals has become necessary not only because the resistance of pathogenic organisms has increased, but also because of the existence of environmental problems related to their use. In this work, the synthesis and characterization of chitosan nanoparticles containing copper ions are prepared and characterized as a potential alternative to agrochemicals applied to plants under stress conditions, whether dry or nutrient-poor soil, which may restrict their development. Chitosan nanoparticles and chitosan-copper nanoparticles were prepared based on the ionotropic gelling of chitosan with tripolyphosphate anions and copper II ions. The variation of copper concentration, the encapsulation efficiency of the ions, the stability of the nanoparticles and its potential application in agricultural crops were evaluated. The synthesized nanoparticles have PDI values between 0.30 and 0.46 and hydrodynamic radius between 140 and 270 nm, being stable for 9 weeks and with high encapsulation efficiency. It is known from the literature that these nanoparticles have a high potential to induce the growth of some plant cultures and fight some pathogenic organisms. Keywords:

Copper ions; Chitosan; Nanoparticles; agriculture.

Introdução

Agroquímicos são utilizados na agricultura com o objetivo de combater pragas e organismos patógenos que possam comprometer a produção agrícola. No entanto, a utilização destes insumos não só é responsável pelo aumento da resistência desses organismos como também causa diversos problemas ambientais, como por exemplo, a deterioração do solo e contaminação de aquíferos (Gould et al, 2018; Hawkins et al, 2018; Rigotto et al, 2012). O Brasil é um dos maiores consumidores de agroquímicos do mundo (G1, 2019) e por essa razão o desenvolvimento de alternativas a defensivos agrícolas baseados em materiais biodegradáveis que possam assegurar a aplicação segura, efetiva e não poluente nas plantações se torna uma forma sustentavelmente atrativa para diminuição dos impactos ambientais causados pelos agroquímicos convencionais.

Dentre os biomateriais existentes, muita atenção tem sido dada à quitina, quitosana e aos seus oligômeros como materiais bioativos naturais, devido a sua não-toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade (Laranjeira & Fávere, 2009). As nanopartículas de quitosana chamam atenção por seu potencial multidimensional e sua aplicação na agricultura é um campo de pesquisa muito atraente, o que tem sido corroborado pelo grande número de publicações científicas.

A quitosana possui potencial como veículo de liberação controlada de fármacos, ação já confirmada por diversos trabalhos na área farmacêutica (Liu et al, 2018; Mohamed et al, 2017) e na agricultura essa característica tem sido avaliada na aplicação de fertilizantes encapsulados e conseqüentemente na liberação controlada de micronutrientes, de forma a se obter uma taxa efetiva de proteção e nutrição, reduzindo impactos ambientais. (Perez e François, 2016; Kashyap, Xiang e Heiden, 2015). Além da atuação como veículo de liberação, a quitosana também possui a capacidade de induzir inúmeras respostas biológicas em plantas como resistência a stress e o aumento de produtividade (Malerba e Cerana, 2016). Essas são as características que tornam seu uso atrativo na agricultura. Além da quitosana, muitas nanopartículas usadas para crescimento e proteção de plantas são baseadas no encapsulamento de metais e recebem tanto atenção como concernimento da comunidade acadêmica (Saharan et al, 2016; Saifuddin, et al 2011; Takur et al 2017).

Os metais como ferro, manganês, cobre, níquel e zinco são micronutrientes importantes para o crescimento e reprodução das plantas (Kirkby & Romheld, 2007). O cobre, em especial, é um constituinte de enzimas, participa do processo de fotossíntese e

está particularmente envolvido na fase reprodutiva do crescimento das plantas e, conseqüentemente, na determinação da produtividade e da qualidade da cultura colhida. Além disso, os solos brasileiros possuem a particularidade em serem deficientes nesse micronutriente (Bortolon & Gianello, 2009), o que faz com que seja necessário a suplementação no cultivo.

A quitosana tem alta afinidade com o cobre em comparação com outros metais e com essa habilidade distinta, nanopartículas à base de quitosana-cobre têm sido sintetizadas. Em culturas de milho, o tratamento de nanopartículas de quitosana contendo íons cobre promovem efeitos no comprimento e número de raízes, diâmetro do caule e no aumento da defesa contra doenças, como por exemplo, a ferrugem que ocorrem nas folhas, deixando-as com pontos amarelados (Choudhary et al, 2017). Em culturas de tomates, o uso das nanopartículas de quitosana-cobre também tem apresentado resultados positivos no combate de fungos patogênicos (Saharan et al 2015). Através destes estudos, podemos observar que a necessidade da incorporação de íons cobre em nanopartículas de quitosana se dá não só por ele ser um micronutriente essencial para o desenvolvimento e crescimento natural das plantas, atuando em inúmeros processos fisiológicos, como também possuir atuação no combate de doenças que atingem as plantações, o que torna seu uso na agricultura justificável.

Objetivos

Este trabalho tem como objetivo geral a síntese de nanopartículas de quitosana contendo íons de cobre para potencial uso em aplicações agrícolas. Os objetivos específicos envolvem:

- A variação na concentração de íons cobre encapsulados nas nanopartículas;
- A caracterização das nanopartículas obtidas pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons (DLS);
- A avaliação da estabilidade das nanopartículas sintetizadas;
- A avaliação da eficiência de encapsulamento do micronutriente via ICP-MS;

Materiais e Métodos

Materiais

- Cloreto de cobre II anidro (Sigma Aldrich);
- Ácido acético glacial (Labsynth);
- Tripolifosfato de sódio (Sigma Aldrich);
- Quitosana de baixo peso molecular (Sigma Aldrich)

Métodos

Síntese das nanopartículas de quitosana (CS NP)

As nanopartículas de quitosana foram preparadas pela técnica de gelificação ionotrópica, obedecendo a proporção volumétrica de 3 quitosana (CS): 1 tripolifosfato de sódio (TPP) (Oliveira, H.C et al, 2016). Adicionou-se 1,6 mg de quitosana em 12 ml de solução aquosa de ácido acético 1%. Com o auxílio de um agitador magnético em potência média, agitou-se o preparado por cerca de quarenta minutos até a completa solubilização. Em paralelo, adicionou-se 9,6 mg de tripolifosfato de sódio (TPP) em 4 ml de água destilada. Com o auxílio de um agitador magnético em potência média, agitou-se o preparado até a completa solubilização. Em seguida, adicionou-se sob agitação toda solução aquosa de TPP preparada (4 ml) numa vazão de 3 gotas/minuto na solução de quitosana. A mistura final foi agitada por mais 30 minutos, a temperatura ambiente, resultando numa suspensão de nanopartículas de quitosana (CS NP).

Síntese das nanopartículas de quitosana contendo íons cobre (CS/Cu^{II} NP)

As nanopartículas de quitosana contendo íons cobre (CS/Cu^{II} NP) foram preparadas pela técnica de gelificação ionotrópica, obedecendo a proporção volumétrica de 3 quitosana(CS)/cobre (Cu): 1 tripolifosfato de sódio (TPP) (Oliveira, H.C et al, 2016). Realizou-se variações na concentração final de cobre e as relações de volumes e miligramas de reagentes utilizados nos processos de síntese podem ser observadas na Tabela 1. O procedimento geral para a síntese de quaisquer concentração de íons cobre é descrito a seguir. Adicionaram-se cloreto de cobre II e quitosana em uma solução aquosa de ácido acético 1%. Com o auxílio de um agitador magnético em potência média, agitou-se o preparado por cerca de quarenta minutos ou até a completa solubilização. Em paralelo, adicionou-se tripolifosfato de sódio (TPP) em água destilada. Com o auxílio de um agitador magnético em potência média, agitou-se o preparado até a completa solubilização. Em

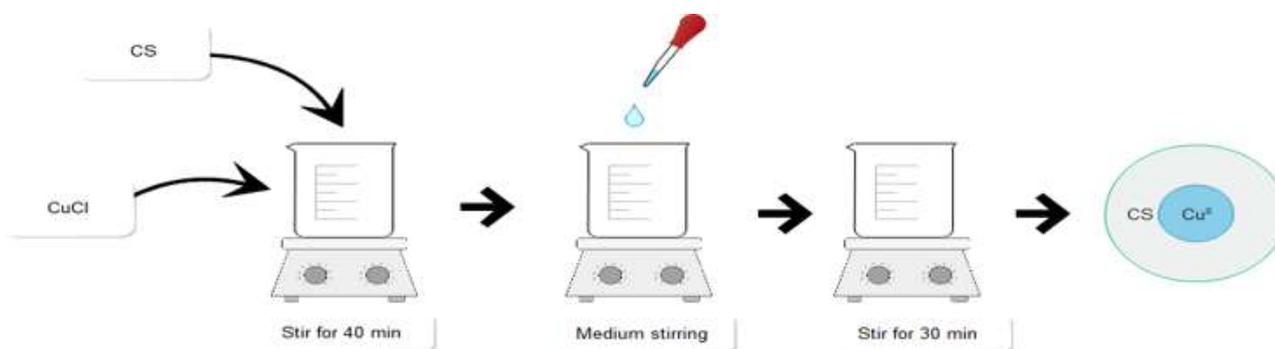
seguida, adicionou-se sob agitação toda solução aquosa de TPP preparada numa vazão de 3 gotas/minuto na solução de quitosana. A mistura final foi agitada por mais 30 minutos, a temperatura ambiente, resultando numa suspensão de nanopartículas de quitosana contendo íons cobre (CS/Cu^{II} NP) de concentração final segundo exemplificado na Tabela 1.

Tabela 1 - Relação de reagentes necessários para a síntese de CS/Cu^{II} NP conforme a concentração desejada

Concentração final de Cobre (mM)	Quitosana (mg)	Cloreto de cobre (mg)	Ácido Acético 1% (ml)	TPP (mg)	Água destilada (ml)
0,5	16,0	2,1	12,0	9,7	4,0
1,0	8,1	1,2	6,0	4,8	2,0
5,0	8,2	5,4	6,0	5,0	2,0
10,0	8,0	10,7	6,0	4,9	2,0
50,0	8,5	53,8	6,0	4,7	2,0

O esquema de síntese pode ser observado na Figura 1:

Figura 1 : Síntese esquemática das nanopartículas de CS/Cu^{II}



Caracterização por espectroscopia de correlação de fótons (DLS)

O tamanho médio das nanopartículas em solução aquosa, sua distribuição de tamanho (PDI) e potencial zeta foram determinados por meio da espectroscopia de correlação de fótons (DLS - dynamic light scattering) através do Nano ZS Zetasizer, (Malvern Instruments Corp). As medidas foram realizadas em triplicata a 25°C usando um ângulo fixo de 173° em uma cubeta zeta específica com um caminho óptico de 10mm.

Estabilidade de nanopartículas

A estabilidade das nanopartículas foi monitorada através do distribuição de tamanho (PDI) ao longo de dois meses, a temperatura ambiente.

Eficiência de encapsulamento de íons cobre nas nanopartículas de quitosana

A eficiência de encapsulamento das nanopartículas CS/Cu^{II} foi mensuradas através da Espectrometria de Massa por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-MS) utilizando uma curva de calibração externa. O cobre livre foi separado das nanopartículas poliméricas usando ultracentrifugação por meio de um sistema de filtros para centrífuga Micron contendo membranas de ultra filtração (MWCO 10,000, Millipore). O cobre livre do filtrado foi medido por ICP. A porcentagem de cobre encapsulado foi determinada pela equação: (%) = (concentração de cobre encapsulado/concentração de cobre total) x 100.

Resultados e Discussões

Síntese de nanopartículas de quitosana contendo cobre (CS/CuII)

Neste trabalho, nanopartículas de quitosana contendo íons cobre foram preparadas pelo método da gelificação ionotrópica. Não foi observado a formação de precipitado nas concentrações de 0.5, 1.0 e 5.0 mM. Também não houve mudança na coloração desses sistemas, resultando em soluções incolores e turvas. Já as concentrações de 10 e 50 mM apresentaram coloração azul pálida e turbidez leve. A turbidez, em todos os casos, foi observada ao iniciar o gotejamento do TPP, concluindo que este seria um indicativo da formação das nanopartículas no sistema. (Haley et al, 2016) As figuras 2, 3 e 4 ilustram o início da síntese e algumas das concentrações de nanopartículas sintetizadas.

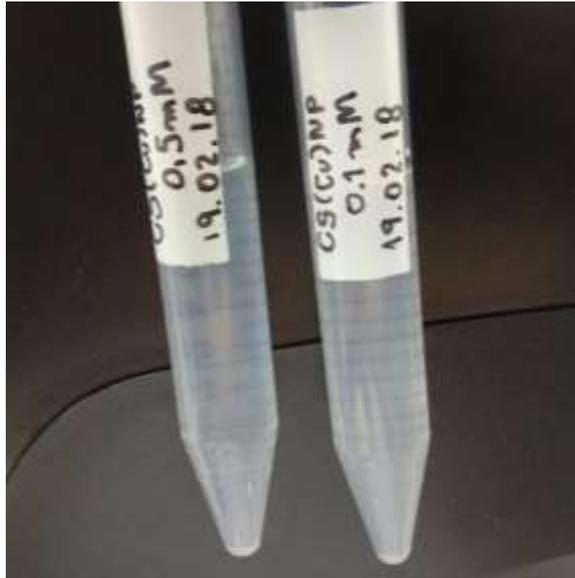
Figura 2- Aspecto da solução quitosana + cobre antes da adição de TPP



Figura 3 - Aspecto turvo que indica a formação de nanopartículas de quitosana

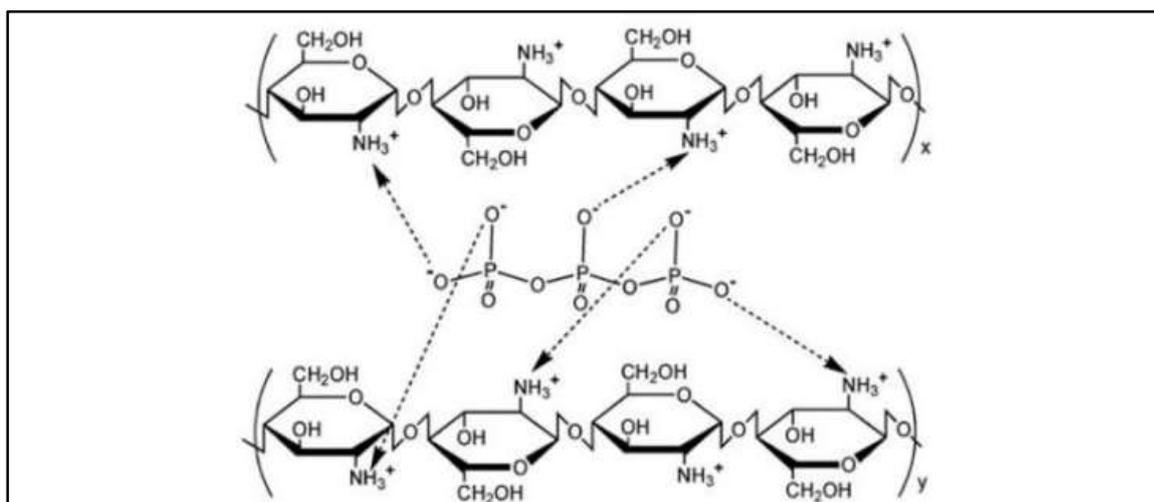


Figura 4 - Aspecto de nanopartículas de CS/Cu^{II}



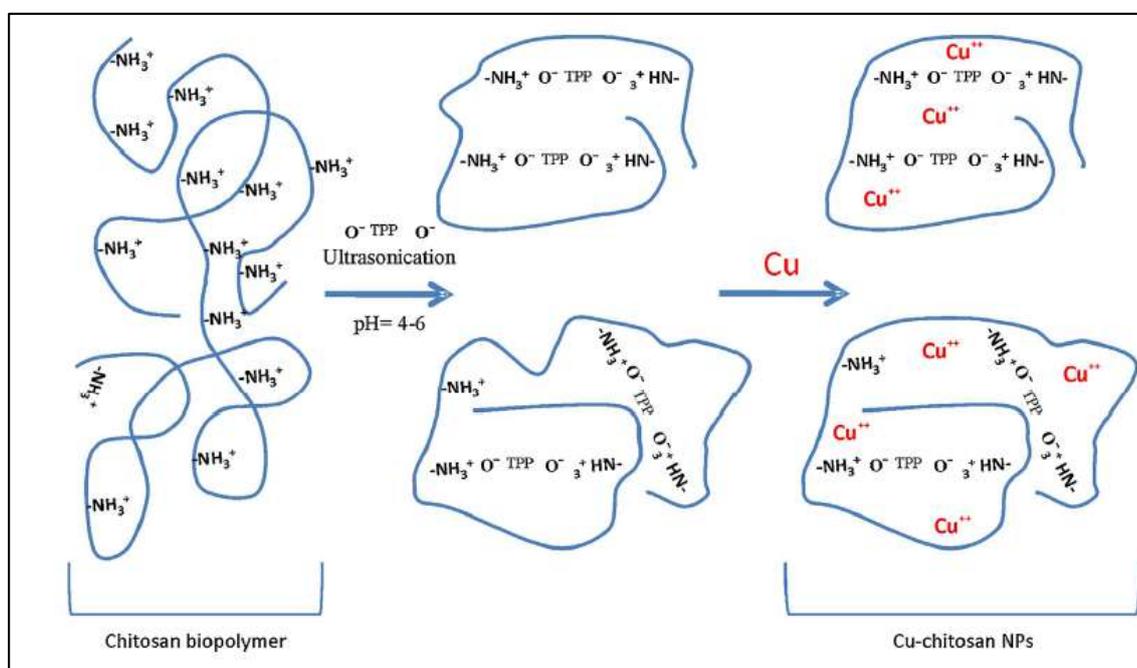
A gelificação ionotrópica consiste na formação de estruturas gelatinosas, geralmente de formato esférico, que ocorre em consequência do intercruzamento de polieletrólitos com cargas opostas, em outras palavras, na presença de contra íons (Kashyap, P.L et al, 2015). Os compósitos formados por esses entrecruzamentos tendem a formar estruturas, geralmente em dimensões nanométrica, de elevada área superficial, além de apresentar afinidade por uma série de compostos que apresentam grupos polares ou terminais carregados (Patil et al., 2012). A utilização da quitosana e do tripolifosfato de sódio (TPP) no processo de gelificação iônica se trata de um processo atóxico e livre de solventes orgânicos. O ponto chave deste processo é a adição gota a gota do TPP, pois este irá direcionar a formação das nanopartículas, uma vez que a gelificação ocorre pela interação entre grupos fosfatos negativamente carregados, presentes na estrutura do TPP com os grupos amino protonados da quitosana. Este mecanismo de síntese, apresentado por Yang et al., (2009) pode ser observado na Figura 5.

Figura 5: Mecanismo de interação entre quitosana e TPP, baseado na dissociação dos fosfatos em ânions $P_3O_{10}^{5-}$



Baseando-se em caracterizações físico-químicas, alguns modelos hipotéticos foram propostos na literatura para compreensão dos aspectos estruturais e sintéticos das nanopartículas de quitosana contendo íons cobre (Choudhary, et al, 2017). A afinidade da quitosana com metais, especialmente com o cobre, são descritas com frequência na literatura e fortes evidências sugerem que o sistema CS/Cu^{II} exista como um complexo polimérico que encapsula o Cu^{II}, como descrito por Saharan et al (2015). Este modelo pode ser observado na Figura 6.

Figura 6 – Modelo hipotético da reação de formação das CS/Cu^{II} NP



Ao contrário de outros estudos (Manikandan, A. & Sathiyama, M, 2015; Saharan et al, 2015) optou-se por não purificar o sistema obtido, uma vez que não foram utilizados solventes e pensando em um processo em alta escala, essa etapa poderia reduzir os custos e tempo em sua produção.

Caracterização por DLS e Estabilidade das nanopartículas

O espalhamento dinâmico de luz foi utilizado para medir o tamanho das nanopartículas sintetizadas, tendo em vista a distribuição de tamanho da partícula em função de intensidade, volume e quantidade. Os parâmetros avaliados foram o PDI e o raio hidrodinâmico que referem-se respectivamente a: largura do tamanho da distribuição da partícula, ou seja, sua dispersividade (um valor adimensional) e a média geral de intensidade baseada em um ajuste específico dos dados brutos da função de correlação, ou seja, um ajuste do resultado para uma distribuição gaussiana simples.

Utilizaram-se as nanopartículas de quitosana (CS NP) como controle para este estudo. Na tabela 2 podem ser observados os resultados obtidos para as CS NP preparadas.

Tabela 2 - Valores obtidos para os parâmetros de PDI e raio hidrodinâmico das CS NP sintetizadas

	PDI	Raio Hidrodinâmico (nm)
	0,375 ± 0,001	167 ± 1
	0,382 ± 0,002	169 ± 1
	0,374 ± 0,002	166 ± 2
Média	0,377 ± 0,002	167 ± 1

As nanopartículas de quitosana sintetizadas possuíam tamanho de 167 ± 1 nm. Na literatura, é possível encontrar para o mesmo tipo de nanopartículas tamanhos que variam de $478,6 \pm 52,3$ nm (Maruyama et al, 2016), e até 83,32 nm (Manikandan et al, 2015). Manikandan et al (2015) reportaram que a adição do TPP na quitosana em pH 5,0 influencia na formação de nanopartículas de tamanhos controlados. Segundo eles, uma vez que o pH é alterado, a formação das nanopartículas variam, logo em pH apropriado, é possível obter controle e uniformidade do tamanho das nanopartículas de quitosana sintetizadas. Neste trabalho, não foi realizado controle de pH durante a síntese, o que nos leva a acreditar que o tamanho obtido para as nanopartículas poderia ser menor com esse controle.

As nanopartículas de CS/Cu^{II} foram sintetizadas em diferentes concentrações. Na tabela 3 podem ser observados os resultados médios obtidos para as nanopartículas preparadas.

Tabela 3 – Valores médios obtidos para os parâmetros de PDI e raio hidrodinâmico das CS/Cu^{II} NP sintetizadas

Concentração de Cu ^{II} nas nanopartículas (mM)	PDI	Raio Hidrodinâmico (nm)
0,5	0,366 ± 0,002	146,2 ± 1,1
1,0	0,410 ± 0,001	160,8 ± 0,8
5,0	0,478 ± 0,008	178,1 ± 0,4
10,0	0,505 ± 0,005	199,1 ± 0,3
50,0	0,619 ± 0,004	191,6 ± 1,0

O PDI, como mencionado anteriormente, é o índice de poli dispersão da partícula. Esse índice é adimensional e sua escala diz que valores menores que 0.05 são sistemas extremamente monodispersos e maiores que 0.7 indicam que a amostra é polidispersa, ou seja, mais propensa a formar aglomerados (Danaei et al, 2018). Embora o padrão ISO (ISO 22412:2017) para nanopartículas ideais seja ter PDI de até 0.7, decidiu-se utilizar um limite menor, de 0.5. Desta forma, as amostras na concentração de 5,0 10 e 50 mM foram dispensadas dos demais ensaios.

Nanopartículas com PDI superior a 0.5 tendem a ter partículas muito polidispersas, sem uniformidade e com tendência de coalescer ou se sedimentar, impactando na qualidade do produto final. Optou-se então pelas concentrações mais baixas de cobre para se conduzir o estudo de estabilidade. Na estabilidade, foram avaliadas as nanopartículas de quitosana e as duas concentrações mais baixas de nanopartículas contendo os íons cobre (0.5 mM e 1.0 mM).

Na Tabela 4 podemos observar os resultados obtidos para as nanopartículas preparadas com concentração de 0.5 mM de cobre através dos parâmetros de PDI e raio hidrodinâmico ao longo de nove semanas, a temperatura ambiente.

Tabela 4 - Dados obtidos ao longo de 9 semanas para CS/Cu^{II} NP 0.5 mM

Período (Semana)	PDI	Raio hidrodinâmico (d.nm)
1	0,364 ± 0,001	145,5 ± 0,2
2	0,380 ± 0,001	144,10 ± 0,03
3	0,303 ± 0,002	145,31 ± 0,02
4	0,348 ± 0,001	141,12 ± 0,02
7	0,423 ± 0,003	267,6 ± 0,2
9	0,447 ± 0,002	173,4 ± 0,1

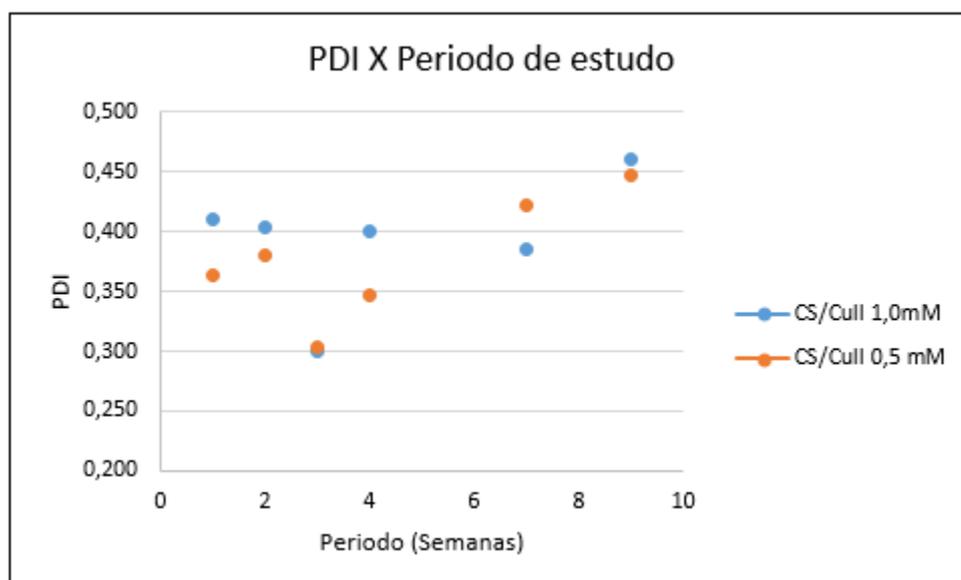
Já na Tabela 5, podemos observar os resultados obtidos para as nanopartículas preparadas com concentração de 1.0 mM de cobre através dos mesmos parâmetros e períodos citados anteriormente.

Tabela 5 - Dados obtidos ao longo de 9 semanas para CS/Cu^{II} NP 1.0mM

Período (Semana)	PDI	Raio hidrodinâmico (d.nm)
1	0,411 ± 0,001	161,7 ± 0,3
2	0,403 ± 0,001	165,0 ± 0,4
3	0,300 ± 0,002	165,4 ± 0,5
4	0,400 ± 0,001	166,03 ± 0,03
7	0,385 ± 0,001	166,2 ± 0,1
9	0,461 ± 0,001	212,60 ± 0,15

A Figura 7 representa de forma mais elucidativa as flutuações no PDI ao longo da estabilidade.

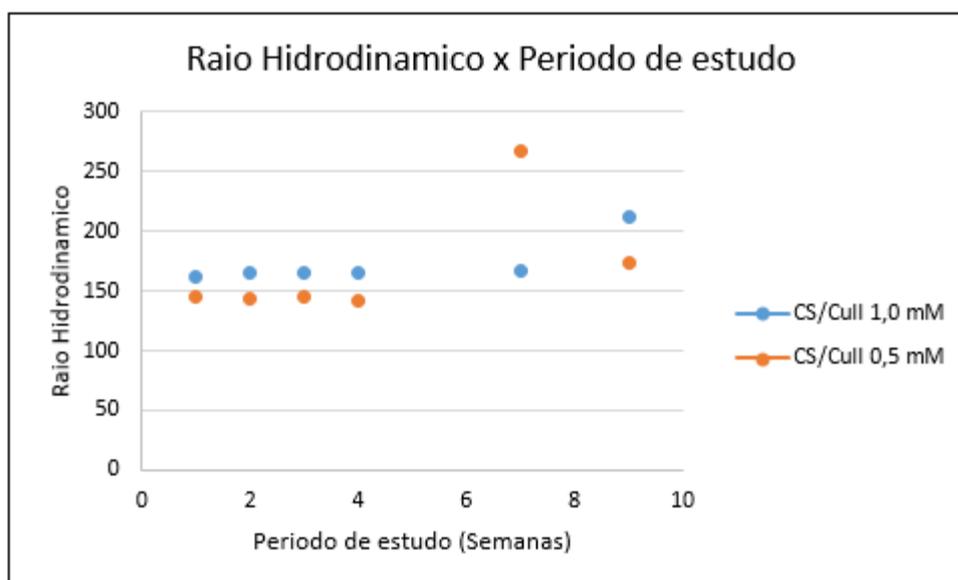
'Figura 7 - PDI ao longo do período de estudo



Como pode ser observado, os valores de PDI variaram entre 0,300 e 0,460, resultando em uma média de $0,38 \pm 0,05$ para a concentração de 0,5 mM de cobre e $0,39 \pm 0,05$ para a concentração de 1,0 mM de cobre ao longo de todo estudo. O valor obtido é considerado bom, uma vez que o PDI é um indicador de agregação das partículas, quanto maior seu resultado temos a indicação de que o sistema é polidisperso e quanto mais próximo de zero, denotamos um sistema monodisperso. Quanto mais polidisperso o sistema, maior será a tendência de agregação das partículas comparadas com um sistema monodisperso. Em suma, foi sintetizado um sistema de nanopartículas satisfatório, o que explica sua forte estabilidade.

A Figura 8 representa de forma mais elucidativa as flutuações no raio hidrodinâmico ao longo da estabilidade.

Figura 8 - Raio hidrodinâmico ao longo do período de estudo



Como pode ser observado, os valores obtidos para o raio hidrodinâmico variaram entre 140 a 270, resultando em uma média de 170 ± 50 para a concentração de 0.5 mM de cobre e 173 ± 20 para a concentração de 1,0 mM de cobre ao longo de todo estudo. A partir dos dados obtidos, podemos dizer que ao longo do estudo de estabilidade conduzido, as nanopartículas de quitosana em ambos os casos, apesar da interação puramente eletrostática, as nanopartículas sintetizadas apresentaram comportamento estável ao longo do período estudado.

Em estudos, Choudhary (2017) relatou nanopartículas de PDI 0,20 e raio hidrodinâmico de $361,3 \pm 2,1$ nm. Já Saharan (2015) relatou partículas de PDI 0,33 e raio hidrodinâmico de $374,3 \pm 8,2$ nm. Manikandan (2015) por sua vez, relatou partículas de PDI 0,45. Comparando esses registros com os resultados obtidos podemos concluir que os sistemas de nanopartículas sintetizados são compatíveis com os encontrados na literatura e estão relativamente melhores dos divulgados até o momento.

Eficiência de encapsulamento de íons cobre nas nanopartículas de quitosana

A eficiência de encapsulamento dos íons cobre nas nanopartículas de quitosana foi mensurada através da Espectrometria de Massa por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-MS) utilizando uma curva de calibração externa. Esse experimento foi realizado pela equipe do professor Bruno Lemos, sendo fornecidas apenas amostras do cobre livre obtido pela filtração mencionada na metodologia.

Os resultados obtidos, tanto de uma síntese recente quanto a da síntese em estabilidade foram extremamente satisfatórios. A média das amostras cuja síntese era recente, atingiu 97.7% de eficiência de encapsulamento de íons cobre nas nanopartículas de quitosana, ou seja, apenas 2.3% dos íons cobre adicionados durante a síntese permaneceu livre. Isso indica um rendimento alto e de imenso interesse uma vez que estamos dosando um metal e é necessário saber a concentração para que ele não exerça efeitos tóxicos.

Já a média das amostras de estabilidade, atingiram eficiência de 76.7%. Ou seja, poderíamos estimar que a taxa de decaimento de cobre encapsulado é de cerca de 10.5% ao mês. Essa estimativa é considerando o rendimento da síntese recente em relação ao período de dois meses de estabilidade, como descrito na equação a seguir:

$$\% \text{ Decaimento do cobre encapsulado} = \frac{(\text{Ef. síntese recente} - \text{Ef. síntese estabilidade})}{n^{\circ} \text{ de meses em estabilidade}}$$

Essas análises foram repetidas para verificar a reprodutibilidade, obtendo para outra síntese recente e outra em estabilidade no mesmo tempo, respectivamente 95.5% e 73.4%. Considerando que as nanopartículas são mantidas por interação puramente eletrostática, podemos dizer que a síntese é reprodutível e que as nanopartículas são estáveis diante dos resultados obtidos. Embora este seja um dado relevante, não foram encontrados estudos que realizassem a análise da eficiência de encapsulamento. Em sua maioria (Saharan et al 2015; Maninkandan et al, 2015; Choudhary et al 2017; Saharan et al 2017), os estudos relatam apenas a absorção do cobre nas plantas ou sementes e não na nanopartículas de quitosana em si.

Aplicabilidade das nanopartículas de quitosana na agricultura

O estudo de nanopartículas de quitosana contendo cobre possuindo diferentes características, tamanhos, formas e atividade biológica têm sido desenvolvido por apenas alguns grupos de pesquisadores (Thuesombat et al, 2014; Saharan et al, 2015; Choudhary

et al, 2017; Sathiyabama et al, 2018) e todos os estudos apontam para aplicações promissoras no campo da agricultura.

O cobre, por si só, já é utilizado como componente de muitos agroquímicos não só por ser relativamente atóxico para mamíferos mas também por apresentar efeitos contra vários microrganismos (Choudhary et al, 2017). Ele também é um dos metais que pode coordenar facilmente com a quitosana e esta já tem seus efeitos reportados por induzir resistência a doenças e aumentar a imunidade inata de plantas (Zain et al, 2014 ; Chandra et al, 2015) . Essas propriedades combinadas podem ser aumentadas utilizando os compostos, quitosana e cobre, na forma de nanopartículas, uma vez que aumenta-se a superfície de contato com o material ativo e as plantas. (Chandra et al, 2015, Manikandan et al, 2016).

Saharan et al (2015) avaliaram a eficácia das nanopartículas de quitosana/cobre contra fungos patogênicos do tomate. Neste estudo, além da inibição de esporos em *Alternaria solani* e *Fusarium oxysporum* (fungos comuns que atingem as plantações de tomates) de respectivamente 61.5% e 83.0%, os autores observaram também um aumento na germinação das sementes e no comprimento das raízes. A concentração utilizada que apresentou os resultados mais efetivos foi de 0.12% de nanopartículas de quitosana/cobre. Este estudo confirmou efeitos significativos na promoção do crescimento da planta avaliada bem como os efeitos antifúngicos causados pelas nanopartículas utilizadas.

Em outro estudo, Choudhary et al (2017) avaliaram o crescimento e o aumento na resposta de defesa a *Curvularia*, uma doença que causa pontos amarelos nas folhas em culturas de milho. As concentração que apresentaram melhores resultados variaram de 0.12% a 0.16% em cobre. Observou-se a inibição da doença em experimentos in-vitro demonstrando que as nanopartículas de quitosana/cobre são promissoras como protetoras de plantas e também como agentes promotores de crescimento, possuindo imenso potencial para ser explorado comercialmente para utilização agrícola.

Em plantações de milhete, Sathiyabama et al (2018), reportaram que o uso das nanopartículas estimularam o crescimento e induziram o aumento de resistência da planta contra o fungo da brusone. Usando a combinação de aplicação foliar e tratamento da semente, foram observados 89% de aumento no crescimento da cultura. Plantas tratadas com as nanopartículas mostraram também a supressão do desenvolvimento da doença de cerca de 75%.

Conclusão

Neste trabalho, nanopartículas de quitosana contendo íons de cobre foram preparadas pelo método de gelificação ionotrópica com alta eficiência de encapsulamento. As mesmas nanopartículas foram avaliadas quanto sua estabilidade e declaradas como estáveis por pelo menos 9 semanas. A literatura indica um alto potencial em aplicações agrícolas relacionadas ao crescimento de culturas.

Os próximos passos para este projeto seriam testar as nanopartículas aplicando-as em alguns tipos de cultura, estudar se há diferença em purificar ou não as nanopartículas obtidas e se o controle e variação de pH durante a síntese interferem em sua estabilidade/formação.

Referências Bibliográficas

Baker D.E, Senef J.P. COPPER. IN: ALLOWAY BJ (ed) HEAVY METALS IN SOIL pp. 179-205, Blackie Academic and Professional, London (1995).

Bortononi, L. & Gianello, C. Disponibilidade de cobre e zinco em solos do sul do Brasil. Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas. Rev. Bras. Ciênc. Solo 33 (3) • Jun 2009.

Choudhary, Ram Chandra, Kumaraswamy R. V., Kumari Sarita, Sharma, S. S., Pal A, Raliya, R., Biswas, P. & Saharan, V. Cu-chitosan nanoparticles boost defense responses and plant growth in maize. Nature Scientific Reports,2017.

Dahl, J. A.; Maddux, B. L. S.; Hutchison, J. E. Toward Greener Nanosynthesis. Chemical Reviews 2007, 107, 2228.

Ghormade, V.; Deshpande, M. V.; Paknikar, K. M. Perspectives for nano-biotechnology enabled protection and nutrition of plants.

Goosen, M. E. A – “Applications of chitin and chitosan”, Technomic Publishing Company, Lancaster (1996).

Halley C. Oliveira, Bruna C.R. Gomes, Milena T. Pelegrino, Amedea B. Seabra Nitric oxide-releasing chitosan nanoparticles alleviate the effects of salt stress in maize plants . Nitric Oxide 61 (2016) 10 e 19.

ISO 22412:2017. Particle size analysis – Dynamic light scattering (DLS). Disponível em: <https://www.iso.org/standard/65410.html>. Acesso em: 04/05/2021.

Junior, D.M., Ramos, U.M., Quaggio, J.A & Furlani, P.R. Nitrogênio e cobre na produção de mudas de citros em diferentes porta-enxertos. Solo e Nutrição de Plantas, Bragantia 69 (1), 2010.

Laranjeira, M.C.M & Fávere, V.T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. Quím. Nova 32 (3). 2009

Melo, Luiza. Brasil usa 500 mil toneladas de agrotóxicos por ano, mas quantidade pode ser reduzida, dizem especialistas. G1, 27 de maio de 2019. Disponível em: <https://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2019/05/27/brasil-usa-500-mil-toneladas-de-agrotoxicos-por-ano-mas-quantidade-pode-ser-reduzida-dizem-especialistas.ghtml>. Acesso em: 29/11/2020.

PATIL, P.; CHAVANKE, D.; WAGH. M. A review on ionotropic gelation method: novel approach for controlled gastroretentive gelspheres. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. v.4, n. 4, p. 27-32, 2012.

Rigotto RM, Porto MF, Folgado C, Faria NM, Augusto LG, Bedor C et al. Dossiê ABRASCO - Parte 3 - Agrotóxicos, conhecimento científico e popular: construindo a ecologia de saberes. Porto Alegre: RS; 2012.

Talamone, Rose. Brasil se destaca nas pesquisas em nanotecnologia. Jornal USP. São Paulo, 13 de set. de 2019. Disponível em: <<https://jornal.usp.br/universidade/brasil-se-destaca-nas-pesquisas-em-nanotecnologia/>>. Acesso em 24 de jan. de 2020.

V. Saharan, et al. Synthesis and in vitro antifungal efficacy of Cu-chitosan nanoparticles against pathogenic fungi of tomato., Int. J. Biol. Macromol. (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.01.027>

V. V. C. Azevedo, S. A. Chaves, D. C. Bezerra, M. V. Lia Fook, A. C. F. M. Costa. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. Revista Eletrônica de Materiais e Processos, v.2.3 (2007)27-34 ISSN 1809-8797

Yruela, I. Copper in plants, Braz. J Plant Physiol, 17(1):145-156, 2005