



ADNEIA DE FÁTIMA ABREU VENCESLAU

**FORMAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
COMPLEXOS DE INCLUSÃO ENTRE
ATRAZINA E CICLODEXTRINAS
SUPPORTADAS EM SÍLICA**

LAVRAS - MG

2016

ADNEIA DE FÁTIMA ABREU VENCESLAU

**FORMAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS DE
INCLUSÃO ENTRE ATRAZINA E CICLODEXTRINAS
SUPPORTADAS EM SÍLICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Bioquímica, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a Luciana de Matos Alves Pinto

Co-Orientadora:

Prof^a. Dr^a Larissa Fonseca Andrade-Vieira

**Lavras - MG
2016**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Venceslau, Adneia de Fátima Abreu.

Formação e caracterização de complexos de inclusão entre
atrazina e ciclodextrinas suportadas em sílica / Adneia de Fátima
Abreu Venceslau. – Lavras : UFLA, 2016.

71 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de
Lavras, 2016.

Orientador(a): Luciana de Matos Alves Pinto.

Bibliografia.

1. Agroquímico. 2. Herbicida. 3. Liberação modificada. 4.
Lactuca sativa. 5. Ciclodextrina funcionalizada em sílica. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

ADNEIA DE FÁTIMA ABREU VENCESLAU

**FORMAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS DE
INCLUSÃO ENTRE ATRAZINA E CICLODEXTRINAS
SUPPORTADAS EM SÍLICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Bioquímica, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 19 de fevereiro de 2016

Prof^ª. Dr^ª Juliana Mesquita Freire UFLA

Prof. Dr Leonardo Fernandes Fraceto UNESP/Sorocaba

Orientadora:

Prof^ª. Dr^ª Luciana de Matos Alves Pinto

Co-Orientadora:

Prof^ª. Dr^ª Larissa Fonseca Andrade-Vieira

**LAVRAS - MG
2016**

A meus pais, José e Margarida Abreu

Por sempre acreditarem, me fazendo ir mais longe.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus que tudo fez.

Aos meus pais, Margarida e José, por toda simplicidade, exemplo, força, compreensão e amor.

Aos meus irmãos: Adilson, Adriane, Ademir e Adilo (*in memoriam*); sobrinhos: Pedro Henrique, Rubieny e Diogo; cunhados: Dionaldo, Gorety, Juliana e Marília, sogros: Roberto e Ângela, por sermos uma Grande Família!

Ao Lucas por partilhar seus dias comigo com tamanha generosidade, carinho e amor!

À minha orientadora Luciana por todos esses anos de orientação, confiança, amizade, paciência, dedicação e ensinamentos fundamentais para a condução deste trabalho.

À minha co-orientadora Larissa por me receber em seu grupo de braços abertos e por todos os ensinamentos.

Ao pessoal do laboratório de bioquímica por tornar meus dias mais leves e por tudo que me ensinaram. Em especial: Aline S., Lucas, Mariana, Denise, Lucimara, Laís, Flávia e Pricila.

Ao pessoal do “citotox”: Fábio (por preparar e ler todas as minhas lâminas), Graciele, Mayra, Maria Gabriela, Franceli, Milena, Marcos e Marcel, por serem uma maravilhosa Equipe! E por toda a ajuda na condução dos experimentos e companheirismo.

Ao professor Leonardo pela disponibilidade e atenção.

Ao pessoal de Sorocaba: Jhones, Estefânia e Patrícia, pela intensa semana de trabalho e boas conversas! Daniele e Diego pela hospitalidade.

Ao CNPq, à CAPES e à FAPEMIG pelo financiamento desse projeto e bolsa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica pela oportunidade de me desenvolver enquanto realizava esse trabalho.

Ao Prof. Dr Luís Antônio Augusto Gomes – DAG/UFLA, que gentilmente nos doou as sementes de alface.

Ao Prof. Dr Rafael Pio – DAG/UFLA, Arnaldo e Evaldo pela doação do solo.

À Prof^ª. Dr^ª Adelir Aparecida Sackz e à Bethânia, pelo apoio inicial com as análises no HPLC.

Ao Prof. Dr Paulo Preté, à Prof^ª. Dr^ª Juliana Freire e à Prof^ª. Dr^ª Luciana Lopes, por todas as considerações iniciais no texto da qualificação.

Ao CAPQ - UFLA pelas análises de infravermelho e DSC.

Ao DQI e UFLA por tudo que aprendi.

Ao laboratório de Bioquímica por se tornar meu segundo lar!

A todos que torceram por mim e se fizeram presentes (mesmo que em pensamento!) ao longo desta jornada!

Minha eterna gratidão!

"El hombrequito promedio de nuestras grandes ciudades, deambula entre las financieras y el tedio rutinario de las oficinas, a veces atemperadas con aire acondicionado. Siempre sueña con las vacaciones y la libertad, siempre sueña con concluir las cuentas, hasta que un día, el corazón se para, y adiós."

José Alberto Mujica Cordano

RESUMO

A atrazina (ATZ) é um dos agroquímicos mais difundidos e utilizados no mundo todo, sendo importante na chamada lavoura de conservação, pois aumenta a produtividade, diminuindo a erosão. Os principais inconvenientes relacionados ao seu uso são a lixiviação e sua toxicidade intrínseca. Ciclodextrinas (CD) e ciclodextrinas funcionalizadas em sílica (CDSI) tem se mostrado alternativas eficientes contra esses problemas, modificando a liberação das moléculas-hóspedes e reduzindo a toxicidade. Foram preparados complexos de inclusão entre ATZ e CD (ATZ/ α -CD; ATZ/ γ -CD) e CDSI (ATZ/ α -CDSI; ATZ/ γ -CDSI) e realizados testes de caracterização (infravermelho e calorimetria diferencial de varredura) que indicaram a inclusão da ATZ no interior da cavidade. Isotermas de solubilidade também foram feitas e demonstraram que a estequiometria é 1:1. Testes de liberação em água demonstraram que todos os tratamentos tiveram uma liberação mais lenta que a ATZ não complexada, sendo que ATZ/ γ -CDSI, reduziu em 75% a velocidade de liberação. Já nos testes de liberação em coluna de solo, os tratamentos responderam de forma equivalente devido às possíveis interações com o solo. Bioensaios no modelo *Lactuca sativa* indicaram que todos os tratamentos foram menos tóxicos que a ATZ não complexada, sendo que, no teste de aberração cromossômica, houve redução de 38,75% para γ -CD e 33,52% para γ -CDSI, comparados à ATZ não complexada. Assim, ATZ/ γ -CD e ATZ/ γ -CDSI mostraram-se mais eficientes e menos tóxicas, provavelmente devido ao tamanho da cavidade interna da γ -CD.

PALAVRAS-CHAVE: Agroquímico. Herbicida. Liberação modificada. *Lactuca sativa*. Ciclodextrina funcionalizada em sílica.

ABSTRACT

Atrazine (ATZ) is one of the most used agrochemicals around the world, since it is important in conservation tillage in order to increase productivity and decrease erosion. The main issues concerning the usage of ATZ are related to leaching and toxicity. Cyclodextrins (CD) and cyclodextrins functionalized in silica (CDSI) have been proving to be effective alternatives to avoid these issues, changing the liberation of the guest molecules and reducing toxicity. Inclusion complexes between ATZ and CD (ATZ/ α -CD; ATZ/ γ -CD) and CDSI (ATZ/ α -CDSI; ATZ/ γ -CDSI) have been prepared and characterization tests (infrared and differential scanning calorimetry) have been conducted. These tests indicated the inclusion of ATZ in the cavity. Phase solubility has shown that the stoichiometry is 1:1. Liberation tests have shown that all samples had a slower liberation in comparison with the uncomplexed ATZ. The ATZ/ γ -CDSI reduced the liberation speed in 75%. In liberation tests conducted in soil columns, the samples had the same reactions due to possible interactions in the soil. Bioassays with *Lactuca sativa* have indicated that all samples were less toxic than uncomplexed ATZ. In the chromosome aberration test, there was reduction of 38,75% for γ -CD and 33,52% for γ -CDSI, compared to the uncomplexed ATZ. Thus, ATZ/ γ -CD and ATZ/ γ -CDSI have been proving to be more efficient and less toxic, probably due to the size of the internal cavity of γ -CD.

Keywords: Agrochemical. Herbicide. Controlled release. *Lactuca sativa*. Cyclodextrin functionalized in silica.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química da atrazina (SENE, CONVERT <i>et al.</i> , 2010)	15
Figura 2 - Estruturas funcionais da α , β e γ -CD (CRINI, 2014)	17
Figura 3- Estrutura da sílica-gel. Em destaque, grupo silanol geminal (1), silanol vicinal (2) e siloxano (3) (PRADO, FARIA e PADILHA, 2005).....	19
Figura 4 – Esquema de associação entre ciclodextrinas livres e substratos, formando complexos de inclusão em diferentes estequiometrias (CRINI, 2014)	21
Figura 5 - Esquema de bioensaio no modelo <i>Lactuca sativa</i> (GARCIA, SIMIONATO <i>et al.</i> , 2009).....	24
Figura 6 - Isotermas de solubilidade para ATZ em presença de α -CD, α -CDSI, γ -CD e γ -CDSI.....	33
Figura 7 - Isotermas de solubilidade.....	34
Figura 8 - Espectros de absorção na região do infravermelho da ATZ; alfa-CD; alfa-CDSI; complexos e misturas físicas	37
Figura 9 - Espectros de absorção na região do infravermelho da ATZ; gama-CD; gama-CDSI; complexos e misturas físicas	38
Figura 10 - Termogramas de calorimetria diferencial de varredura da ATZ; alfa-CD; alfa-CDSI; complexos e misturas físicas	41
Figura 11 - Termogramas de calorimetria diferencial de varredura da ATZ; gama-CD; gama-CDSI; complexos e misturas físicas.....	42
Figura 12 - Curvas de liberação em água para a ATZ; alfa-CD e alfa-CDSI	45
Figura 13 - Curvas de liberação em água para a ATZ; gama-CD e gama-CDSI	46
Figura 14 - Valores médios relativos de umidade, nas 4 camadas da coluna de solo (0-4 cm; 4-8 cm; 8-12 cm; 12-16 cm) determinados em quadruplicata, à temperatura de 25°C.....	47

Figura 15 - Valores médios da concentração de ATZ em diferentes camadas de solo, nos tratamentos: ATZ não complexada; ATZ/ α -CD; ATZ/ β -CD; ATZ/ γ -CD; ATZ/ α -CDSI; ATZ/ β -CDSI e ATZ/ γ -CDSI.....	49
Figura 16 - Valores médios de liberação de ATZ no solo, livre e complexada com CD e CDSI.....	50
Figura 17 - Alterações cromossômicas nos tratamentos com ATZ não complexada, ATZ/CD, ATZ/CDSI e água.	55
Figura 18 - Exemplo de C-não orientado (Imagem obtida por Santos no Laboratório de Genética Molecular, DBI/UFLA).....	57
Figura 19 - Exemplo de ponte (Imagem obtida por Santos no Laboratório de Genética Molecular, DBI/UFLA).....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores médios de taxa de germinação (GR), índice de velocidade de germinação (IVG) e taxa de crescimento radicular (CR) para os controles negativo (água) e positivo (ATZ) e os tratamentos com CD e CDSI.	51
Tabela 2: Valores médios de índice mitótico (IM) e percentuais de cada fase da mitose em raízes de <i>Lactuca sativa</i> para os controles negativo (água) e positivo (ATZ) e os tratamentos com CD e CDSI.	53
Tabela 3: Valores médios percentuais de alterações celulares (AC) e alterações nucleares (AN) em células meristemáticas de <i>Lactuca sativa</i> após tratamento com os controles negativo (água) e positivo (ATZ) e os tratamentos: ATZ/CD e ATZ/CDSI.	56

LISTA DE ABREVIACOES

Alfa-ciclodextrina	α -CD
Alfa-ciclodextrina funcionalizada em sílica	α -CDSI
Alteracoes celulares	AC
Alteracoes nucleares	AN
Atrazina	ATZ
Beta-ciclodextrina	β -CD
Beta-ciclodextrina funcionalizada em sílica	β -CDSI
Calorimetria diferencial de varredura	DSC
Ciclodextrina	CD
Crescimento radicular	CR
Espectroscopia na regio do infravermelho	IV
Gama-ciclodextrina	γ -CD
Gama-ciclodextrina funcionalizada em sílica	γ -CDSI
ndice de velocidade de germinaco	IVG
ndice mittico	IM
Infravermelho	IV
Taxa de germinaco	GR

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	12
2.REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 Agroquímicos.....	13
2.2 Atrazina.....	14
2.3 Ciclodextrinas	16
2.4 Sílica... ..	18
2.5 Formação de complexos de inclusão	20
2.6 Bioensaios no modelo <i>Lactuca sativa</i>	23
3.MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. Funcionalização da sílica com CD.....	25
3.2.Isotermas de solubilidade e determinação da constante de associação.....	25
3.3.Espectroscopia na região do infravermelho (IV)	26
3.4.Calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	26
3.5.Ensaio de liberação da atrazina dos complexos de inclusão ATZ/CD e ATZ/CDSI.....	27
3.6.Análises em coluna de solo.....	27
3.6.1.Umidade.....	28
3.6.2.Análise da concentração de ATZ ao longo do perfil de solo	28
3.6.3.Liberação em camada de solo	29
3.7.Bioensaios no modelo <i>Lactuca sativa</i>	29
3.7.1.Análise macroscópica	29
3.7.2.Análise microscópica	31
3.8.Análise estatística	32
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1.Isotermas de solubilidade e determinação da constante de associação.....	33
4.2.Espectroscopia na região do infravermelho	36
4.3.Calorimetria diferencial de varredura	40

4.4.Ensaio de liberação da atrazina dos complexos de inclusão ATZ/CD e ATZ/CDSI.....	43
4.5.Análises em coluna de solo.....	46
4.5.1.Umidade.....	46
4.5.2.Análise de concentração de ATZ ao longo do perfil do solo.....	47
4.5.3.Avaliação da liberação de ATZ dos complexos de inclusão com CD e CDSI no solo.....	49
4.6.Ensaio de aberração cromossômica em <i>Lactuca sativa</i>	51
5.CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS.....	59

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, os efeitos da contaminação ambiental junto com as modificações climáticas têm alcançado proporções drásticas, provocando a escassez de água. Há tempos já se sabe a respeito da contaminação de águas superficiais e subterrâneas por rejeitos domésticos, industriais e principalmente agrícolas.

Em contrapartida, existe a necessidade de se alimentar um contingente populacional cada vez maior e crescente sem a degradação do ambiente. Uma forma de preservar o que ainda resta de florestas nativas seria conter a expansão agrícola, por meio do desenvolvimento de tecnologias que visem plantios mais resistentes e mais produtivos.

Para isso, podem ser utilizados diversos tipos de agroquímicos, como por exemplo, os herbicidas. Estes consistem em compostos amplamente utilizados no controle de ervas intrusas de diversas culturas como o milho, soja e cana-de-açúcar. Porém, os resíduos de herbicidas podem contaminar os alimentos e são muito persistentes no meio ambiente, além de serem potencialmente tóxicos às pessoas que os manuseiam.

Nesse contexto, as ciclodextrinas surgem como uma alternativa à essas entraves, por permitirem interações capazes de melhorar propriedades físico-químicas de uma vasta gama de moléculas. Sua associação com outras estruturas, como a sílica, formando um híbrido, além de produzir um material que associa propriedades de ambos os materiais, facilita seu manuseio, visto que este sistema pode ser recuperado e reutilizado com facilidade.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi preparar, caracterizar e avaliar a toxicidade dos complexos de inclusão entre ATZ/CD e ATZ/CDSI, visando gerar um sistema de liberação mais eficiente e seguro, para esse agroquímico.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Agroquímicos

No Brasil, o Decreto 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei 7.802/1989, em seu artigo 1º, inciso IV, define os agroquímicos como:

“Produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias de produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento”.

Os agroquímicos podem ser classificados quanto à natureza da praga a que se destinam, nas seguintes categorias: acaricidas, inseticidas, fungicidas, raticidas e herbicidas. Também são classificados por sua toxicidade, pela DL₅₀, ou seja, a dose necessária para matar 50% de uma população, sob determinadas condições (MULLIN, FRAZIER *et al.*, 2010).

O uso destes insumos químicos tem uma participação importante na agricultura mundial, mantendo a viabilidade econômica e a produtividade agrícola (ECOBICHON, 2001) já que existe atualmente a necessidade de alimentar um contingente populacional cada vez maior, que segundo a Organização das Nações Unidas será de 9 bilhões em 2050 (GILLAND, 2002).

O grande problema do uso de agroquímicos, é sua toxicidade intrínseca. Em experimentos com ratos e herbicidas da classe dos cloro-s-triazinas (por exemplo: atrazina, cianazina, propazina e simazina), demonstraram toxicidade

associadas a uma redução no ganho de peso corporal, sendo o fígado geralmente o órgão mais afetado (BRECKENRIDGE, CHARLES *et al.*, 2008).

Além disso, grande parte da quantidade de agroquímicos aplicada é perdida antes de atingir seu alvo, seja por evaporação, lixiviação, escoamento ou degradação biológica. Estes fatos contribuem para as altas doses administradas para combater as ervas intrusas, como forma de compensar a quantidade perdida (CORREIA e LANGENBACH, 2005).

Assim, sistemas de liberação controlada de agroquímicos vêm sendo desenvolvidos para minimizar os efeitos nocivos à flora, fauna e meio ambiente.

2.2 Atrazina

Desde 1900, os rendimentos agrícolas vêm aumentando significativamente ao redor do mundo. Um exemplo é referente a cultura de milho, cuja produção média na década de 1950 era de 2,76 ton ha⁻¹, enquanto entre os anos 2000-2004, para a mesma área, uma produção de 8,87 ton ha⁻¹ foi alcançada. Esse fato deve-se ao uso dos agroquímicos da classe das triazinas que contribuíram para melhorias na produtividade de culturas ao redor do mundo (LEBARON, MCFARLAND e BURNSIDE, 2008).

Esta classe de agroquímicos pode ser dividida em triazinas assimétricas: metribuzin e metamitron; e triazinas simétricas. Dentre as principais triazinas simétricas, pode haver ainda mais uma divisão: em cloro-s-triazinas: (simazina, atrazina, a terbutilazina, propazina, cianazina); em tiometil-s-triazinas, também referidos como metil-tio triazinas (ametrina, prometrina, terbutrina) e em metoxi-s-triazina (prometone) (CARLSON, 2008).

Dentre as cloro-s-triazinas, a atrazina (ATZ) é a mais difundida e utilizada, especialmente nas culturas de milho, sorgo e cana de açúcar (LEBARON,

MCFARLAND e BURNSIDE, 2008). A ATZ favorece a conservação do solo, na chamada lavoura de conservação, promovendo uma maior produção com menor desgaste do solo e menor erosão (FAWCETT, 2008).

Porém, a ATZ aplicada para o aumento da produção é persistente no ambiente. Estudos mostram que mesmo após duas décadas de sua aplicação, ainda restam cerca de 50% da quantidade inicialmente aplicada nas lavouras (JABLONOWSKI, KÖPPCHEN *et al.*, 2009).

A ATZ (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina) (**Figura 1**) é uma base fraca ($pK_a = 1,7$), apolar, possui massa molecular igual a $215,69 \text{ g mol}^{-1}$, apresenta solubilidade em água de apenas 33 mg L^{-1} (20 a 25°C) e sua estabilidade pode ser explicada pela configuração eletrônica de seu anel heterocíclico (PICCOLO, 2002; NOVAK e KOVAC, 2011). Este herbicida é solúvel em alguns solventes orgânicos como éter, acetona, benzeno, clorofórmio, etanol e acetato de etila. Seu mecanismo de ação está relacionado à inibição da atividade fotossintética na membrana do cloroplasto, ligando-se à polifenoloxidase do complexo B do fotossistema II, prejudicando a reação de Hill e interrompendo o fluxo de elétrons (LEBARON, MCFARLAND e BURNSIDE, 2008)

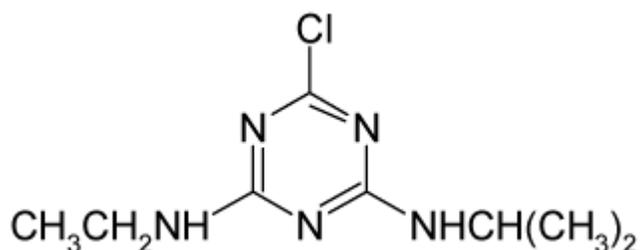


Figura 1 - Estrutura química da atrazina (SENE, CONVERT *et al.*, 2010)

O uso intensivo da ATZ no mundo e sua considerável mobilidade nos solos têm contribuído para a detecção desta em níveis acima do limite permitido em águas de superfície e subterrâneas (CEREJEIRA, VIANA, *et al.*, 2003). Seu tempo de meia vida pode variar de 2 meses a 6 anos, dependendo das condições do meio, da concentração, da textura do solo, de variações no clima, do método de aplicação e diferenças nas práticas de lavoura (GRAYMORE, STAGNITTI e ALLINSON, 2001; KOSKINEN e BANKS, 2008).

Estudos revelam que esta substância pode interferir no funcionamento natural do sistema endócrino de espécies animais (HAYES, HASTON *et al.*, 2002). Avaliações dos níveis de ATZ e metais pesados em amostras de solo devem ser realizados constantemente, pois alimentos produzidos em solos contaminados podem representar risco à saúde dos consumidores (MARKOVIC, CUPAC *et al.*, 2010).

2.3 Ciclodextrinas

Villiers, em 1891, foi o primeiro cientista a descrever o isolamento de 3 g de uma substância cristalina oriunda da digestão bacteriana de 1.000 g de amido. Era resistente à hidrólise ácida e, como a celulose, não apresentava propriedades redutoras. Os resultados experimentais indicaram que a substância era uma dextrina, de composição $(C_6H_{10}O_5)_2 \cdot 3H_2O$, a qual ele nomeou "celulosina" (LOFTSSON e DUCHÊNE, 2007; CRINI, 2014).

Em 1903, Schärddinger, identificou-as como ciclodextrinas (CD) que são moléculas de oligossacarídeos cíclicos de ocorrência natural com número variável de unidades de glicose, obtidas por ação enzimática das ciclodextrinas- α -glicosiltransferases sobre o amido (LOFTSSON e DUCHÊNE, 2007; WELLIVER e MCDONOUGH, 2007; CRINI, 2014).

As CDs tem seu nome derivado do número de resíduos de glicose na sua estrutura. Assim, o hexâmero de glicose é designado por α -CD, o heptâmero como β -CD e o octômero como γ -CD (**Figura 2**). O perfil de solubilidade em água à 25°C é 145 g L⁻¹; 18 g L⁻¹ e 232 g L⁻¹, respectivamente.

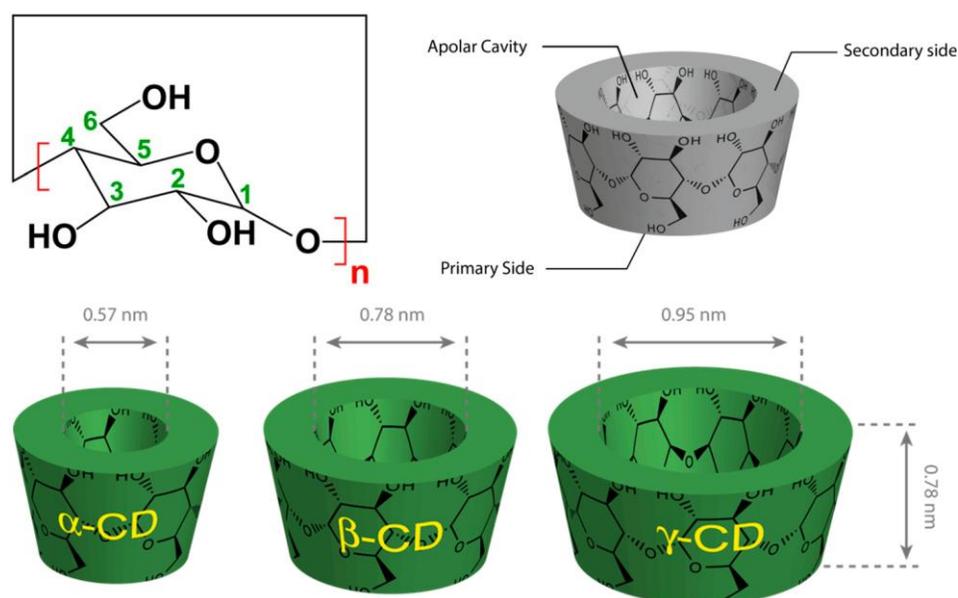


Figura 2 - Estruturas funcionais da α , β e γ -CD (CRINI, 2014)

Freudenberg e colaboradores, em 1953, foram os primeiros pesquisadores a receberem a patente de utilização de CDs em formulações de drogas. Esta patente englobava a maior parte dos conceitos importantes que são utilizados até hoje, como a formação de complexos de inclusão, que promovem a melhoria das propriedades físico-químicas da droga incluída, tais como aumento da solubilidade aquosa e maior estabilidade perante a oxidação (DAVIS e BREWSTER, 2004; CRINI, 2014).

Excelente biocompatibilidade e capacidade de formação de complexos de inclusão entre substratos de diferentes tamanhos tem possibilitado a utilização de CDs em diferentes áreas da ciência e tecnologia (DODZIUK, 2006; ZHANG e MA, 2013). A CD é praticamente atóxica e tem sido comumente utilizada como carreadora e no melhoramento das propriedades de fármacos (DE JESUS, 2006; RODRIGUES, CHAVES *et al.*, 2011, ZHANG e MA, 2013) e de compostos com uso agrícola (VENTURINI, NICOLINI *et al.*, 2008; GRILLO, PEREIRA *et al.*, 2011; JINYAN, BIN *et al.*, 2014). E ainda, na remoção de metais e compostos orgânicos do meio aquoso (MAHLAMBI, MALEFETSE *et al.*, 2010; SHAO, SHENG *et al.*, 2010). Como fase estacionária em cromatografia (KAWAGUCHI, TANAKA *et al.*, 1983; WÖßNER e BALLSCHMITER, 2000; ZHAO, TAN *et al.*, 2010; ZHANG, 2011; WANG, 2015). Em processos de catálise e no mascaramento de sabores e odores (BINELLO, CRAVOTTO *et al.*, 2004), dentre outras aplicações.

2.4 Sílica

A sílica gel é um típico polímero inorgânico, que apresenta grupos siloxanos (Si-O-Si) em seu interior e grupos silanóis (Si-OH) em sua superfície (**Figura 3**). É um sólido inerte, amorfo, resistente e com alta porosidade. O fato de sua superfície ser recoberta por silanóis favorece sua modificação química, com o intuito de sintetizar novos materiais para as mais diversas aplicações (CORRIU, MOREAU *et al.*, 1996). A densidade eletrônica nos grupos silanóis é distribuída de maneira não uniforme e isso faz com que apresentem comportamento ácido. Estes sítios ácidos são distribuídos de forma aleatória na molécula e são os responsáveis pelo controle da reatividade que ocorre na superfície da sílica. Os silanóis podem ser denominados como vicinais, isolados ou geminais (PRADO, FARIA e PADILHA, 2005).

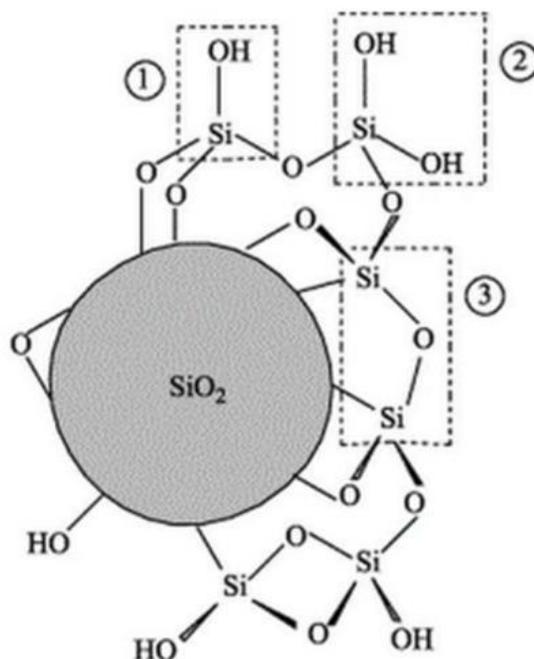


Figura 3- Estrutura da sílica-gel. Em destaque, grupo silanol geminal (1), silanol vicinal (2) e siloxano (3) (PRADO, FARIA e PADILHA, 2005)

Uma das formas mais utilizadas para modificar a superfície da sílica é através de reações com agentes silantes, $(\text{RO})_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{X}$, sendo R um radical alquila e X uma função orgânica. Esses reagentes proporcionam uma série de reações diferentes de imobilização que dão origem aos compostos híbridos inorgânico-orgânicos (CARVALHO e PINTO, 2012).

Xu e colaboradores (2011) sintetizaram β -CD funcionalizada com sílica (β -CDSI) para a fabricação de eletrodos modificados de carbono seletivo para isômeros de nitrofenol. Como resultado, obtiveram com êxito um sensor eletroquímico sensível.

Carvalho e Pinto (2012) trabalharam com β -CD ancorada em sílica para liberação controlada do agroquímico ATZ, encontrando resultados promissores para esta aplicação.

Baracho e colaboradores (2015) mostraram que a funcionalização da sílica gel com α e γ ciclodextrinas é um processo viável e com boa porcentagem de ancoramento. Demonstraram ainda, que o ácido cítrico é um bom substituto para os organossilanos, que são mais dispendiosos.

2.5 Formação de complexos de inclusão

As CDs possuem excelente biocompatibilidade e capacidade de formarem complexos de inclusão com vários tipos de substratos, sendo inclusive estereoespecíficas (ZHANG e MA, 2013). A principal condição é que o substrato possa se adaptar à cavidade, mesmo que parcialmente. Devido a esta habilidade, estas moléculas estão sendo utilizadas como modelos para investigação de interações não covalentes envolvendo diferentes compostos. Podem ser encontradas várias razões estequiométricas dos complexos de inclusão sendo que as mais comuns são: 1:1, 1:2, 2:1 e 2:2, (**Figura 4**) dependendo do tamanho e aspecto estrutural do substrato em relação à cavidade da CD (VENTURINI, NICOLINI *et al.*, 2008; CRINI, 2014).

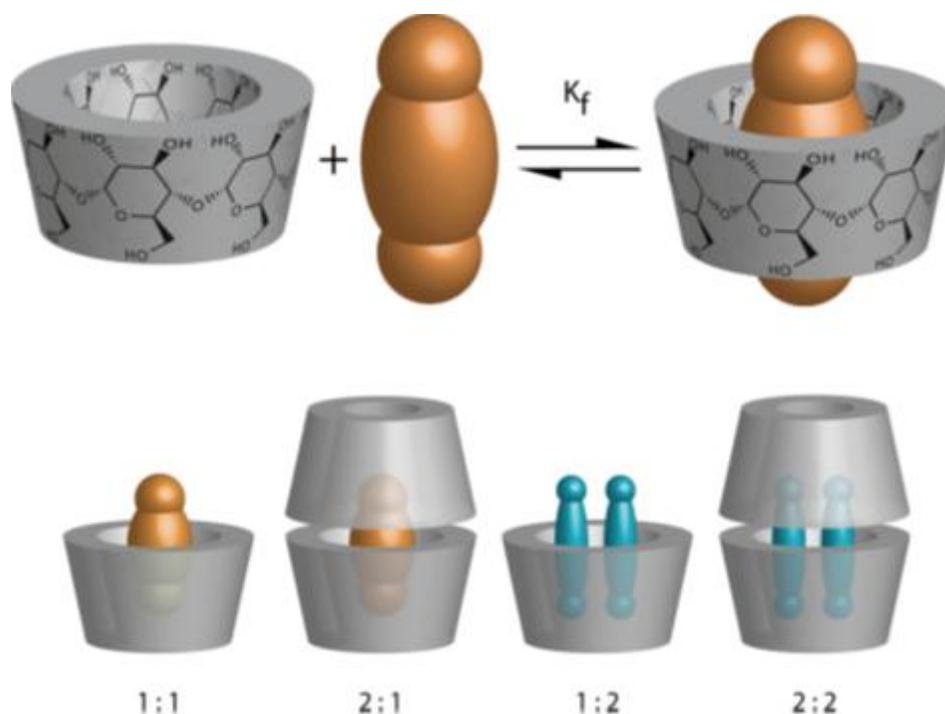


Figura 4 – Esquema de associação entre ciclodextrinas livres e substratos, formando complexos de inclusão em diferentes estequiometrias (CRINI, 2014)

O complexo CD + hóspede hidrofóbico tem hidratação favorecida se comparado à hidratação de seus componentes separadamente. Em solução aquosa, a cavidade apolar das CDs é ocupada por moléculas de água, que se encontra em ambiente energeticamente desfavorável, o que favorece a substituição das moléculas de água por moléculas hóspede que sejam menos polares (MATIOLI, 2000; CRINI, 2014).

Esta complexação das CDs com a molécula hóspede altera algumas das propriedades físico-químicas dos mesmos, tais como solubilidade e estabilidade. De fato, durante a formação do complexo, não se formam nem se rompem ligações covalentes (LOFTSSON e DUCHÊNE, 2007; CRINI, 2014).

A maioria dos agroquímicos é aplicada em doses excedentes para alcançar o organismo alvo, assegurando assim o controle efetivo. E, também, as formulações existentes são altamente disponíveis, no que se refere ao meio ambiente. O processo de adsorção natural do solo contribui para diminuir as perdas dos agroquímicos e é em princípio um processo de adsorção superficial, seguido de um processo de difusão lenta do pesticida nos agregados do solo. Mas, se ocorrem precipitações pluviais em períodos próximos ao da aplicação dos agroquímicos, a maioria se move livremente na solução do solo sem ao menos entrar em contato com os sítios de adsorção (COX, CELIS *et al.*, 2000).

Por ser um sistema promissor, e auxiliar também na relação de exposição do agricultor a fim de minimizá-la, o uso de ciclodextrinas como sistema de liberação modificada de agroquímicos vem se expandido ao longo dos anos. A interação de atrazina com α , β e γ -ciclodextrinas já foi testada por polarografia (POSPISIL, TRSKOVA *et al.*, 1998). BAUR, 1980 realizou estudos de liberação lenta de herbicidas ácidos como o dicamba, 2,4D e o picloram encapsulados em amido, demonstrando uma ação sustentada com o tempo, mas sem medir a quantidade liberada dos herbicidas, nem a diminuição das perdas por percolação. A preparação e caracterização de complexos de inclusão entre ciclodextrinas e norflurazon foi testada, além dos processos envolvendo sua remoção do solo (VILLAVERDE, MORILLO *et al.*, 2004; VILLAVERDE, PÉREZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2005; VILLAVERDE, 2007). Alguns pesticidas alteraram a absorção de luz após inclusão na cavidade de ciclodextrinas (DODZIUK, 2006). A velocidade de fotodegradação também foi estudada observando-se que poderia haver um aumento ou inibição desta (KAMIYA, NAKAMURA e SASAKI, 1994; DODZIUK, 2006).

2.6 Bioensaios no modelo *Lactuca sativa*

Dentre os ensaios disponíveis para avaliar danos causados por agentes químicos a um organismo e ao seu DNA, destacam-se os bioensaios com plantas superiores (ANDRADE-VIEIRA, CAMPOS e DAVIDE, 2012). Esses ensaios, envolvendo o efeito de substâncias químicas na germinação, desenvolvimento inicial da plântula e ciclo celular, têm sido amplamente utilizados em estudos de monitoramento ambiental (PALMIERI, LUBER *et al.*, 2014). Além disso, são reconhecidos e validados como eficientes para tal fim, por órgãos e corporações como Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (US EPA) e Organização para a Cooperação e Desenvolvimento (OECD, 2003; US EPA, 1996; GRANT, 1999).

Na **Figura 5**, foi apresentado um esquema de bioensaio no modelo *Lactuca sativa*. Com a definição das placas de Petri, controles (negativo e positivo), simulações de condições na condução do experimento (ausência de luz, temperatura, e outros), além de identificar parte aérea e raiz das plântulas.

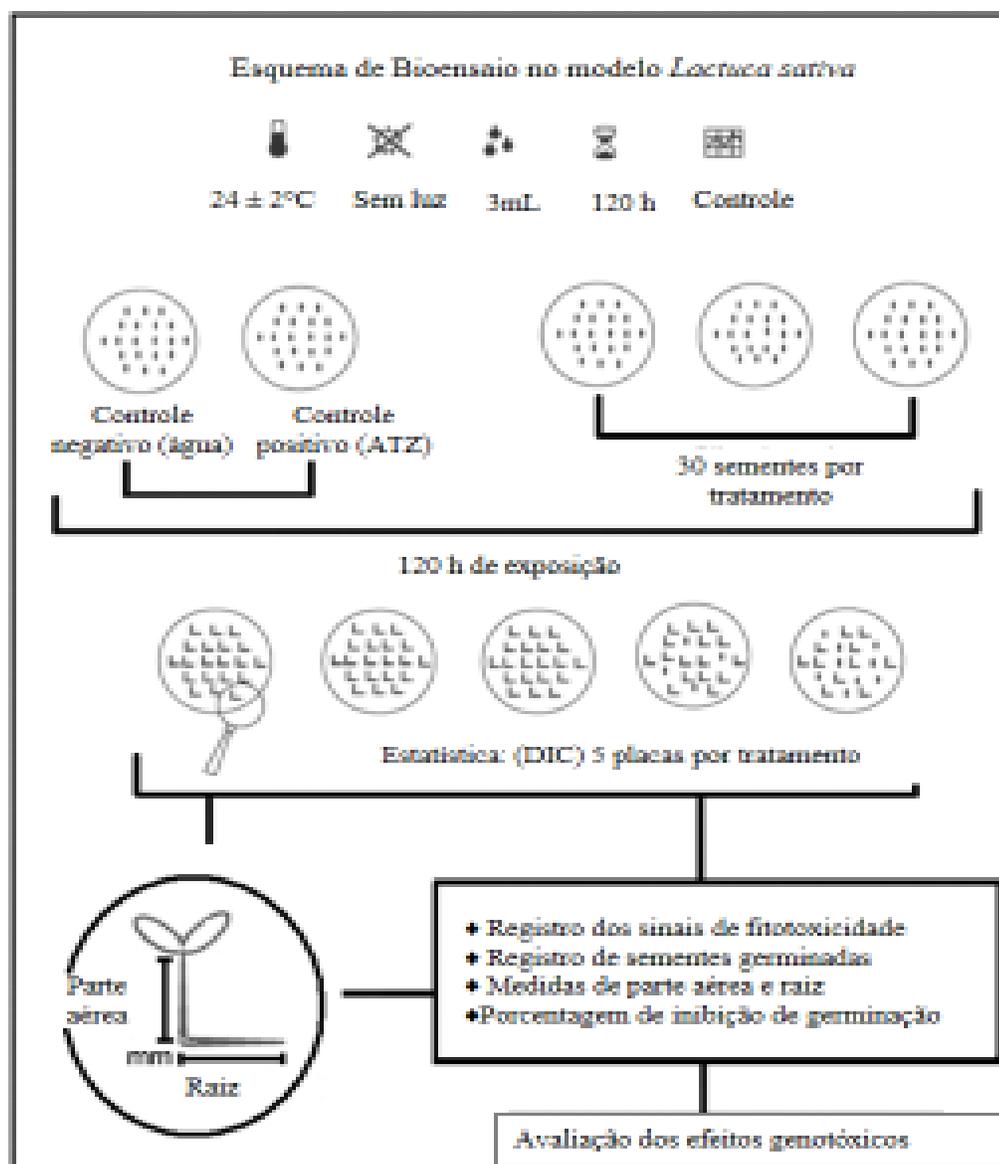


Figura 5 - Esquema de bioensaio no modelo *Lactuca sativa* (adaptada de GARCIA, SIMIONATO *et al.*, 2009)

As vantagens apontadas sobre o uso das plantas como modelos para os estudos de toxicidade ambiental são: baixo custo, a facilidade do manuseio e a

sensibilidade (ANDRADE, DAVIDE e GEDRAITE, 2010), além de ter relação com modelos animais, e não necessitar, no caso das plantas, passar por conselhos de bioética em função do sacrifício de animais (ANDRADE-VIEIRA, BOTELHO *et al.*, 2014.). Dentre os modelos vegetais disponíveis, a *Lactuca sativa* se destaca por possibilitar a realização de análises macroscópicas (germinação e desenvolvimento inicial) e microscópicas (alterações no ciclo celular) concomitantemente, permitindo que o mecanismo de ação do agente químico seja determinado (ARAGAO, ANDRADE-VIEIRA *et al.*, 2015).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Funcionalização da sílica com CD

As CDs usadas neste estudo foram obtidas da Sigma (α -CD – C4642; β -CD - C4767; γ -CD – C4892). A sílica gel (60 G, volume de poro 0,65 – 0,85 mL g⁻¹, área superficial específica 350 – 450 m² g⁻¹), o ácido cítrico (99,5% de pureza) e o xilol foram obtidos da Vetec. O ancoramento da CD na superfície da sílica foi realizado segundo metodologia de Carvalho e Pinto (2012). O produto (CDSI) foi filtrado, seco, macerado e armazenado em freezer para posterior uso.

3.2. Isotermas de solubilidade e determinação da constante de associação

As isotermas de solubilidade foram realizadas com o intuito de se verificar se houve um aumento da solubilidade da ATZ após a complexação em CD ou CDSI.

Em frascos erlenmeyer foram adicionadas concentrações crescentes de α - ou γ -CD e α - ou γ -CDSI (0, 6, 9, 12 e 15 mM), com um excesso de solução

aquosa de ATZ (1,53 mM), em um volume final de 10 mL. Os frascos foram agitados por 24 h à temperatura ambiente e, em seguida, o conteúdo foi centrifugado a 2.500 xg por 10 min. O sobrenadante foi então filtrado, utilizando-se filtros de seringa MillexGP de 0,22 μm (Millipore). Foi realizada uma diluição de 1:10 com água ultrapura para a leitura em espectrofotômetro UV-VIS, a 220 nm. A constante de associação (K_a) foi determinada através do gráfico de solubilidade da ATZ *vs* concentração de ciclodextrina.

3.3. Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

A caracterização por espectroscopia na região do infravermelho foi utilizada para obter informações sobre a formação do complexo de inclusão ATZ/CD e ATZ/CDSI. A técnica já foi utilizada para avaliação de complexos de inclusão de outras moléculas (CHAVES, RODRIGUES, *et al.*, 2010; RODRIGUES, CHAVES, *et al.*, 2011). A análise foi realizada no Departamento de Química/UFLA, em um espectrômetro Digilab Excalibur, série FTS 3000 com transformada de Fourier, empregando-se janelas de KBr. Os espectros foram obtidos na faixa de 4.000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 8 cm^{-1} e número de acumulações igual a 32 scans. Foram analisadas as moléculas isoladas (ATZ, α -CD, α -CDSI, γ -CD e γ -CDSI), os complexos ATZ/CD e ATZ/CDSI, além das respectivas misturas físicas.

3.4. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As análises de calorimetria diferencial de varredura (DSC) foram realizadas num calorímetro Shimadzu 60 AH. Amostras de aproximadamente 5 mg foram aquecidas a uma velocidade de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, numa faixa de 25 a 300 $^{\circ}\text{C}$ sob atmosfera de N_2 .

3.5. Ensaio de liberação da atrazina dos complexos de inclusão ATZ/CD e ATZ/CDSI

Nos ensaios de liberação foram utilizados sistemas de dois compartimentos, separados por membranas de diálise (Sigma Aldrich), de poro de exclusão molecular de 1.000 Da e mesma área de contato. Este sistema permite a observação da liberação da ATZ complexada e não complexada, desde o compartimento doador (5 mL) até o compartimento receptor (150 mL), contendo água ultrapura (MilliQ), sob agitação horizontal leve e constante. Foram montados 5 sistemas contendo solução 50 mg L^{-1} dos diferentes doadores: ATZ não complexada, ATZ/ α -CD, ATZ/ α -CDSI, ATZ/ γ -CD e ATZ/ γ -CDSI. As amostras do compartimento receptor foram coletadas em tempos específicos, durante 166 h, e lidas as absorbâncias em espectrofotômetro UV-VIS a 220 nm. A quantificação da porcentagem liberada foi realizada utilizando-se curvas analíticas para a ATZ.

3.6. Análises em coluna de solo

Para avaliar o perfil de mobilidade e distribuição da ATZ, dos complexos ATZ/CD e dos materiais híbridos ATZ/CDSI em solo, foi realizado o ensaio em coluna de solo, conforme metodologia de (PEREIRA, GRILLO *et al.*, 2014). As análises foram realizadas em quadruplicata.

O solo utilizado para o preparo das colunas foi do tipo latossolo, de textura média, coletado em camada de 0 a 0,2 m de área com histórico de plantio de citros. O solo não foi peneirado para melhor representação da realidade.

O solo foi colocado numa coluna de PVC de 20 cm, fracionada em 5 partes de 4 cm cada, sendo compactado manualmente.

3.6.1. Umidade

A coluna de solo foi fracionada em 4 anéis de 4 cm cada. Foram coletadas 2 gramas de solo de cada anel para análise da porcentagem de umidade do solo (h), conforme Equação 1.

$$h = (P - P_s) / P_s \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde P representa a massa do solo úmido e Ps a massa de solo seca em estufa a 100°C após um período de 24 h.

3.6.2. Análise da concentração de ATZ ao longo do perfil de solo

De cada anel da coluna de solo foram coletadas 5 g do mesmo. Neste solo foi realizada a extração da ATZ para quantificação do ativo nos diferentes anéis da coluna de solo. A extração foi realizada com 5 mL de metanol mantido sob agitação orbital por 20 minutos a 25°C. Após o período de agitação, a suspensão foi mantida em repouso por 30 minutos, sendo o sobrenadante retirado. Este procedimento foi realizado três vezes, a fim de garantir que toda ATZ fosse removida do solo. Após esta etapa, as frações foram unidas e rotoevaporadas até um volume final de 5 mL, sendo a quantidade de ATZ determinada por HPLC, utilizando as seguintes condições: fluxo de 1 mL min⁻¹ e fase móvel contendo 90% de acetonitrila e 10% de água. A quantificação da ATZ foi realizada comparando-se os dados obtidos com a curva analítica da ATZ não complexada (Equação 2).

$$y = (17,4814 \pm 0,05617) x - (2,9941 \pm 0,23827) \quad (\text{Equação 2})$$

$$R = 0,99974$$

3.6.3. Liberação em camada de solo

Para avaliar o perfil de liberação do herbicida ATZ dos complexos e materiais híbridos, foi realizado o ensaio de liberação no solo, seguindo metodologia adaptada de CAMPOS, OLIVEIRA *et al.*, 2015. Em funil de Büchner forrado com papel de filtro, foram adicionadas 20 g de solo e 1 mL dos seguintes tratamentos: ATZ/ α -CD; ATZ/ β -CD; ATZ/ γ -CD; ATZ/ α -CDSI; ATZ/ β -CDSI e ATZ/ γ -CDSI, além dos controles com água pura e ATZ não complexada. Foi utilizada a concentração recomendada pelo fabricante da ATZ comercial (2,5 Kg ha⁻¹). Foram realizadas 3 irrigações de 30 mL cada, com intervalos de 10 em 10 minutos (em duplicata) com água destilada. Posteriormente, foram realizadas mais 4 irrigações de 20 mL cada, com intervalos de 30 em 30 minutos, também em duplicata. O filtrado foi analisado por HPLC nas condições descritas acima. A quantificação da ATZ foi realizada comparando-se os dados obtidos com a curva analítica da ATZ não complexada (Equação 2).

3.7. Bioensaios no modelo *Lactuca sativa*

3.7.1. Análise macroscópica

As sementes de *Lactuca sativa* foram colocadas para germinar em placas de Petri de 12 cm de diâmetro contendo papel de filtro umedecido com 3 mL das

soluções teste (ATZ/ α -CD, ATZ/ β -CD, ATZ/ γ -CD, ATZ/ α -CDSI, ATZ/ β -CDSI e ATZ/ γ -CDSI) e controles negativo (água pura) e positivo (ATZ não complexada), todas na concentração de $3 \times 10^{-3} \text{g L}^{-1}$. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com cinco placas para cada tratamento, cada uma contendo 30 sementes. As placas foram lacradas com filme de PVC transparente para evitar contaminação e mantidas úmidas, em uma câmara de germinação (BOD) a $24 \pm 2^\circ\text{C}$, na ausência de luz ao longo do período do experimento.

O número de sementes germinadas em cada placa de Petri foi anotado após 8, 16, 24, 32, 40 e 48 horas de exposição aos tratamentos. Com os dados obtidos do experimento de germinação foi calculado: o índice de velocidade de germinação (IVG) através da Equação 3 e a taxa de germinação (GR), expressando a porcentagem de sementes germinadas após 48 h de exposição, conforme Equação 4.

$$\text{IVG} = (\text{N}_y - (\text{N}_y - 1)) \times 1 / y \quad (\text{Equação 3})$$

Onde N_y representa o número de sementes germinadas num dado período e y representa o número total de avaliações.

$$\text{GR} = (\text{SG} / \text{ST} \times 100) \quad (\text{Equação 4})$$

Onde SG é o número total de sementes germinadas e ST , o número total de sementes por tratamento.

Ao final do experimento (após 120 horas), o comprimento das raízes foi medido com auxílio de um paquímetro digital (LEE Tools, China) obtendo-se a

taxa de crescimento radicular (CR). A porcentagem de inibição do crescimento de cada tratamento foi comparada com o controle positivo (ATZ).

3.7.2. Análise microscópica

Para avaliar o potencial citogenotóxico dos complexos e dos materiais híbridos foram realizadas análises do ciclo celular de *Lactuca sativa*. Após 96 h de germinação, 5 raízes por placa de Petri foram coletadas e fixadas em Carnoy, sendo armazenadas a -20°C por 24 h. Para realização da análise citogenética, as lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento e coradas com orceína acética a 2%. Cada lâmina foi preparada com 2 meristemas tratados, sendo avaliadas 10 lâminas por tratamento. Para cada lâmina foram avaliadas 1.000 células, totalizando 10.000 células meristemáticas para cada tratamento. As diferentes fases da divisão mitótica, bem como possíveis alterações cromossômicas e nucleares foram observadas e anotadas. Os seguintes parâmetros foram obtidos, segundo Andrade-Vieira *et al.* (2014): índice mitótico (IM), alterações cromossômicas (AC) e nucleares (AN), conforme as Equações 5, 6 e 7, respectivamente.

$$IM = (D / CT) \quad \text{(Equação 5)}$$

Onde D é o número de células em divisão (prófase, metáfase, anáfase e telófase) e CT o número total de células avaliadas em cada tratamento.

$$AC = (C / CT) \quad \text{(Equação 6)}$$

Onde C é o número de alterações cromossômicas e CT o número total de células avaliadas em cada tratamento.

$$AN = (N / CT) \quad (\text{Equação 7})$$

Onde N é o número de alterações nucleares e CT o número total de células avaliadas em cada tratamento.

3.8. Análise estatística

Os parâmetros avaliados no ensaio com *L. sativa* (GR, IVG, CR, IM, AC e AN) e no ensaio de liberação no solo foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias obtidas comparadas com o controle positivo (ATZ) através do teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Carvalho e Pinto (2012) realizaram o trabalho de funcionalização da β -CD em sílica e obtiveram resultados importantes. No intuito de explorar mais possibilidades e dar continuação a esse trabalho, já que o grupo de estudos é o mesmo, esse trabalho foi proposto e desenvolvido. Portanto, alguns resultados com a β -CD e β -CDSI serão apresentados apenas com o intuito de comparação.

4.1. Isotermas de solubilidade e determinação da constante de associação

Este método foi descrito por Higuchi e Connors (1965) e tem como fundamento a variação da solubilidade do soluto, com o aumento da concentração da molécula hospedeira (no caso a CD ou CDSI). Este método é bastante utilizado e seu tratamento matemático permite o cálculo da constante de associação (K_a) do complexo (FRÖMMING e SZEJTLI, 1994).

Os resultados obtidos podem ser visualizados na **Figura 6**, assim como as equações das retas obtidas.

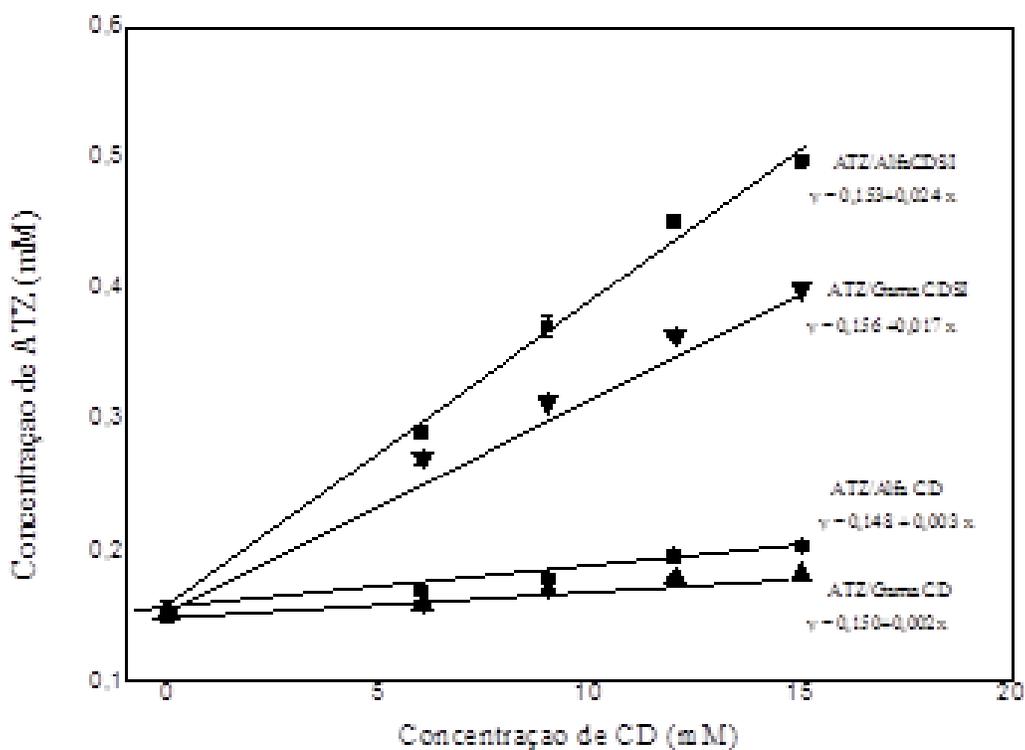


Figura 6 - Isotermas de solubilidade para ATZ em presença de α -CD, α -CDSI, γ -CD e γ -CDSI

Segundo Higuchi e Connors (1965), de acordo com o complexo formado, a solubilidade pode apresentar diversos tipos de isothermas, uma vez que pode haver um aumento ou diminuição na solubilidade. Uma correlação entre a solubilidade do composto a incorporar e a concentração de CD está ilustrada na **Figura 7**.

Dessa forma, os valores da constante de associação (K_a) para um complexo 1:1 podem ser calculados pela razão entre inclinação e intercepto da porção inicial linear do diagrama (Equação 8)

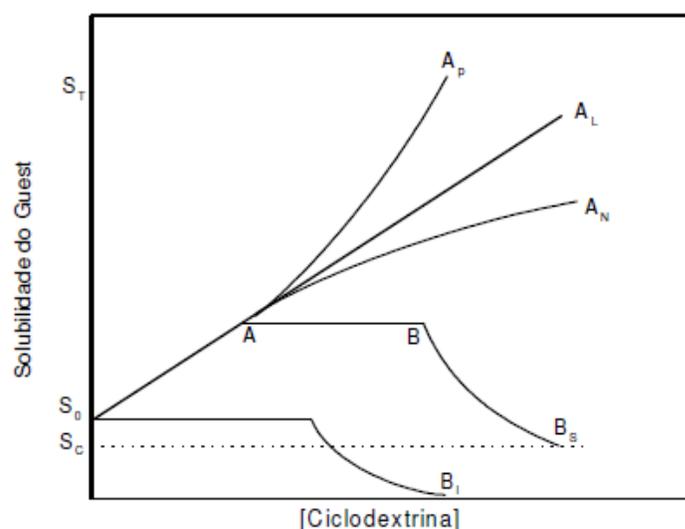


Figura 7 - Isothermas de solubilidade

$$K_a = \frac{S_t - S_0}{S_0 \{ [CD]_t - (S_t - S_0) \}} = \frac{tg \alpha}{S_0 (1 - tg \alpha)} \quad (\text{Equação 8})$$

Onde, K_a = constante de associação; S_t = [soluto] dissolvido (livre + complexado); S_0 = solubilidade do soluto na ausência de CD; S_c = solubilidade

limite do complexo pouco solúvel; Isotermas A_P , A_L , e A_N = complexos muito solúveis (limite de solubilidade determinado pela solubilidade da CD); Isoterma B_S = complexo de solubilidade limitada é formado; Isoterma B_I = complexo insolúvel é formado.

A análise deste experimento evidencia uma isoterma do tipo A_L , isto é, com um aumento linear de solubilidade, caracterizando a estequiometria de 1:1 para o complexo de inclusão ATZ/CD e ATZ/ CDSI, sendo possível utilizar a equação proposta por Higuchi e Connors (1965).

Comparando-se os complexos com CD e com os materiais híbridos, é possível observar que houve um aumento na concentração da ATZ em água quando associada a α -CDSI de 3,3 vezes e para a γ -CDSI, o aumento foi de 2,7 vezes. Nos complexos a α -CD e γ -CD o acréscimo na solubilidade foi de 1,3 vezes. Para a β -CDSI o aumento foi de 3,4 vezes (CARVALHO e PINTO, 2012). Desta forma, claramente se observa que a incorporação da molécula hóspede em CDSI é mais vantajosa em relação ao aumento da sua solubilidade do que em CDs livres.

A constante de associação do complexo de inclusão (K_a) é uma constante de equilíbrio e indica se a molécula está mais associada (inclusa no interior da cavidade da CD) ou dissociada (livre em solução). Seu valor numérico é diretamente proporcional a associação da molécula hóspede no interior da CD (LOFTSSON e BREWSTER, 1996). É um parâmetro importante na avaliação da afinidade e o grau de ligação das moléculas com a CD. Valores inferiores a 100 para a constante sugerem fraca afinidade da molécula hóspede com as CDs, enquanto valores elevados indicam que a molécula hóspede está fortemente ligada, o que pode reduzir consideravelmente sua biodisponibilidade (LYRA, MARQUES, *et al.*, 2010).

Duri e Tran (2013) trabalharam com compósitos supramoleculares a partir de celulose, quitosana e ciclodextrinas para adsorver disruptores

endócrinos (2-clorofenol; 3-clorofenol; 4-clorofenol; 3,4-diclorofenol; 2,4,5-triclorofenol e bisfenol A). De todos os materiais, o que mais se destacou foi a γ -TCD ((2,3,6-tri-O-acetil)- γ -ciclodextrina). A γ -CD possui a maior cavidade entre as CDs naturais (α , β , γ) e portanto pode incluir grupos volumosos em seu interior.

A solubilidade da ATZ nos complexos estudados aumenta consideravelmente e é proporcional ao aumento na concentração de α -CDSI ou γ -CDSI (**Figura 6**). No sistema contendo apenas α -CD ou γ -CD, o aumento na solubilidade é bem menor se comparado ao sistema com CDSI, tal fato pode estar relacionado à constante de associação do complexo (K_a) ser menor. No caso de ATZ/ α -CD, o K_a é igual a $20,3 \text{ L mol}^{-1}$ e para ATZ/ α -CDSI é de $161,1 \text{ L mol}^{-1}$, para ATZ/ γ -CD é de $13,4 \text{ L mol}^{-1}$ e para ATZ/ γ -CDSI é de $111,1 \text{ L mol}^{-1}$. ATZ/ β -CD possui K_a de $28,9 \text{ L mol}^{-1}$ e ATZ/ β -CDSI, K_a de $130,7 \text{ L mol}^{-1}$ (CARVALHO e PINTO, 2012).

Portanto a ordem crescente de K_a entre os complexos é ATZ/ γ -CD < ATZ/ α -CD < ATZ/ β -CD e entre os materiais híbridos é ATZ/ γ -CDSI < ATZ/ β -CDSI < ATZ/ α -CDSI e assim, os materiais híbridos possuem maior solubilidade que os complexos não funcionalizados (ATZ/CD < ATZ/CDSI).

4.2. Espectroscopia na região do infravermelho

Após o preparo dos complexos de inclusão as amostras foram enviadas para análise por espectroscopia na região do infravermelho (IV). Os resultados para a α -CD e α -CDSI estão representados na **Figura 8** e para a γ -CD e γ -CDSI na **Figura 9**.

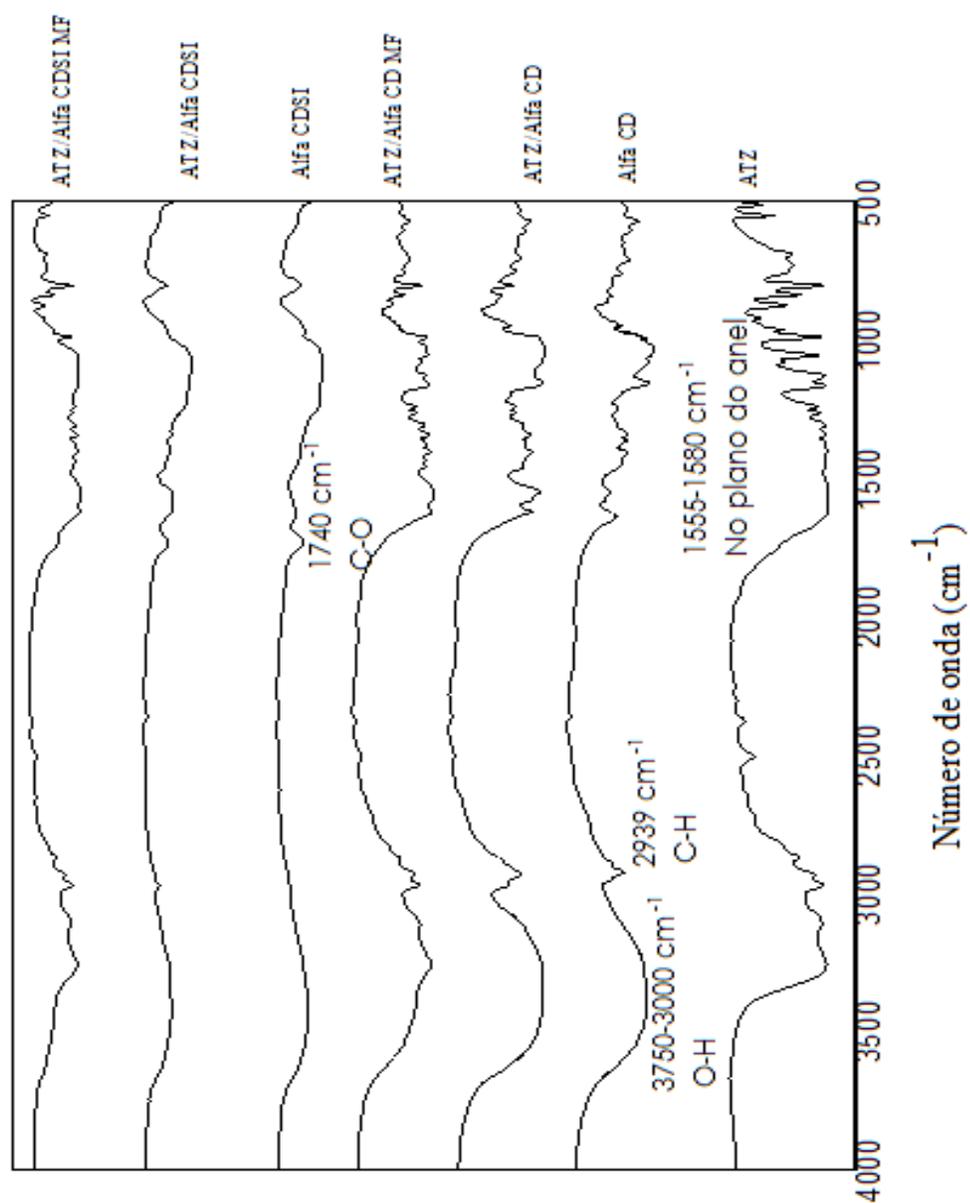


Figura 8 - Espectros de absorção na região do infravermelho da ATZ; alfa-CD; alfa-CDSI; complexos e misturas físicas

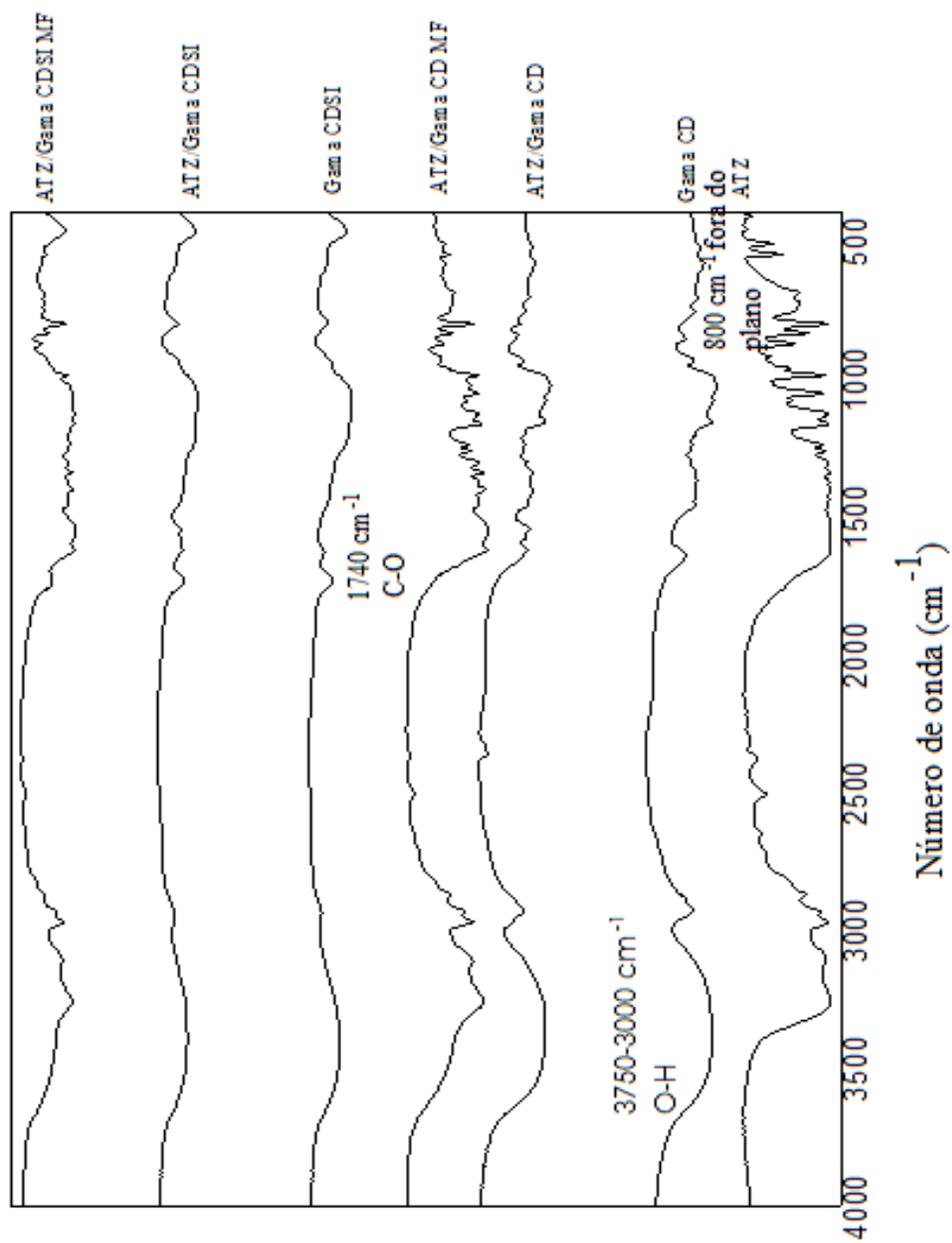


Figura 9 - Espectros de absorção na região do infravermelho da ATZ; gama-CD; gama-CDSI; complexos e misturas físicas

Analisando as espectroscopias, observa-se uma correspondência entre os espectros de α -CD/ γ -CD e α -CDSI / γ -CDSI, fato este justificado por serem moléculas que diferem apenas por uma unidade de glicose. Nas CDs puras, a banda de absorção em 2.939 cm^{-1} é atribuída à vibração de deformação axial de C-H. As bandas de absorção em $3.750\text{-}3.000\text{ cm}^{-1}$ são características de estiramentos O-H de grupos silanóis, referentes também à vibração de deformação axial de hidroxila livre e água remanescente adsorvida. Nos materiais híbridos CDSI, nota-se uma banda em 1.740 cm^{-1} , a qual se refere à carbonila (SILVERSTEIN, WEBSTER *et al.*, 2014).

A ciclodextrina ancorada na sílica provoca leve alteração na intensidade das vibrações angulares das moléculas de água em 1.640 cm^{-1} podendo estar relacionada a interações mais fortes destas moléculas com a estrutura da CDSI ou impedimentos de algumas vibrações pela estrutura (SILVERSTEIN, WEBSTER *et al.*, 2014).

O espectro do agroquímico ATZ já está bem consolidado na literatura e possui bandas típicas em $1.555\text{-}1.580$ e 1.622 cm^{-1} . Essas bandas são atribuídas às vibrações de deformações no plano do anel e a banda em 800 cm^{-1} devido à deformação fora do plano do anel (PEREIRA, GRILLO, *et al.*, 2014).

Nos espectros dos complexos e das misturas físicas, observa-se a sutil mudança nos picos atribuídos às deformações dos estiramentos N-H, por volta de 3.200 cm^{-1} e C=N, em 1.550 cm^{-1} (CARVALHO e PINTO, 2012).

Os espectros das misturas físicas ATZ/ α -CD; ATZ/ α -CDSI; ATZ/ γ -CD e ATZ/ γ -CDSI mostraram que existem interações entre os mesmos, pois bandas características da ATZ ficaram menos evidentes. Entre os complexos com CD e com os materiais híbridos, os com CDSI mostraram uma interação mais forte, visto que entre ATZ/CDSI as bandas características da ATZ desaparecem. Essas análises dão indícios de que os complexos entre os materiais híbridos α -CDSI e

γ -CDSI e o agroquímico ATZ foram formados e, também, indicam o suporte das CDs à superfície da sílica.

4.3. Calorimetria diferencial de varredura

Com as análises de DSC foram obtidos os termogramas contendo as seguintes amostras: ATZ; α -CD; α -CDSI; ATZ/ α -CD; ATZ/ α -CDSI; e misturas físicas dos complexos (**Figura 10**) e ATZ; γ -CD; γ -CDSI; ATZ/ γ -CD; ATZ/ γ -CDSI e também as respectivas misturas físicas dos complexos (**Figura 11**). Foi possível notar picos endotérmicos que caracterizam cada substância isoladamente e também os complexos de inclusão.

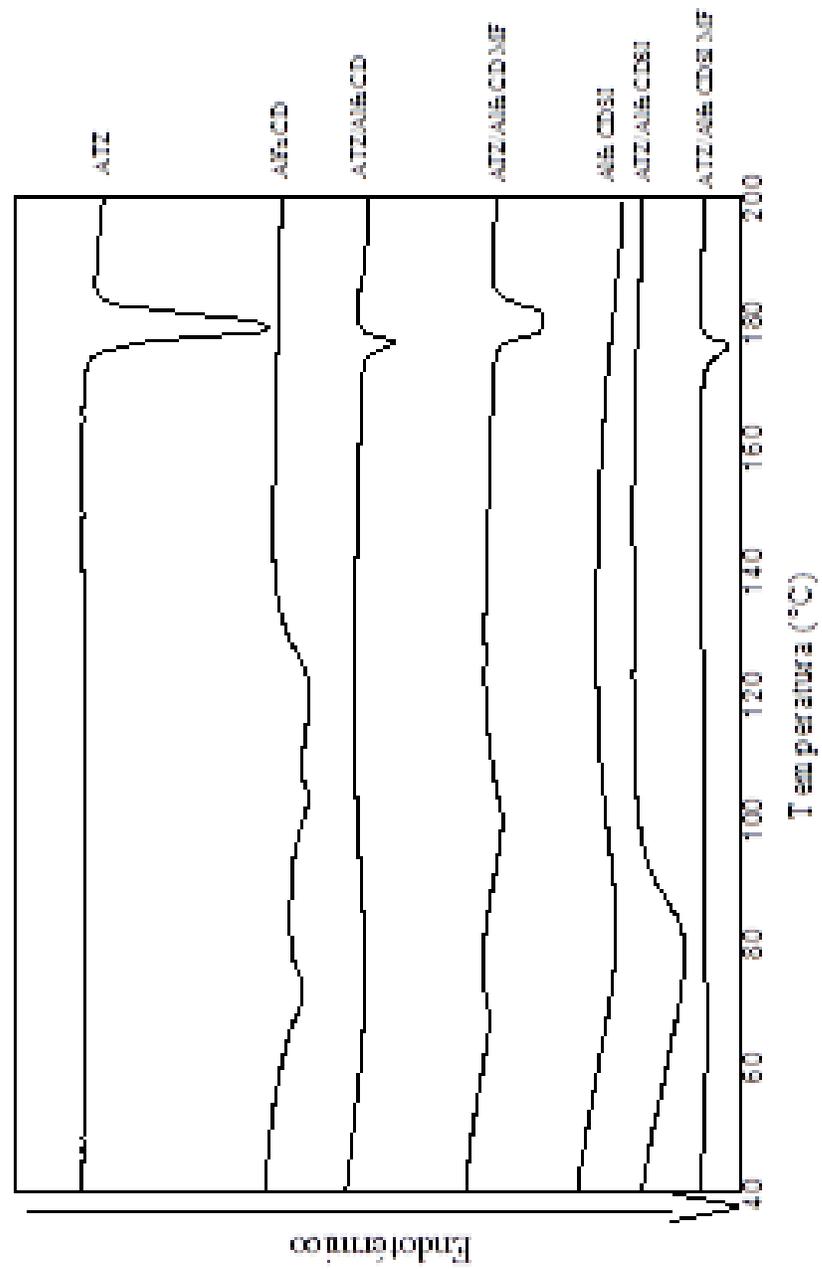


Figura 10 - Termogramas de calorimetria diferencial de varredura da ATZ; alfa-CD; alfa-CD/SI; complexos e misturas físicas

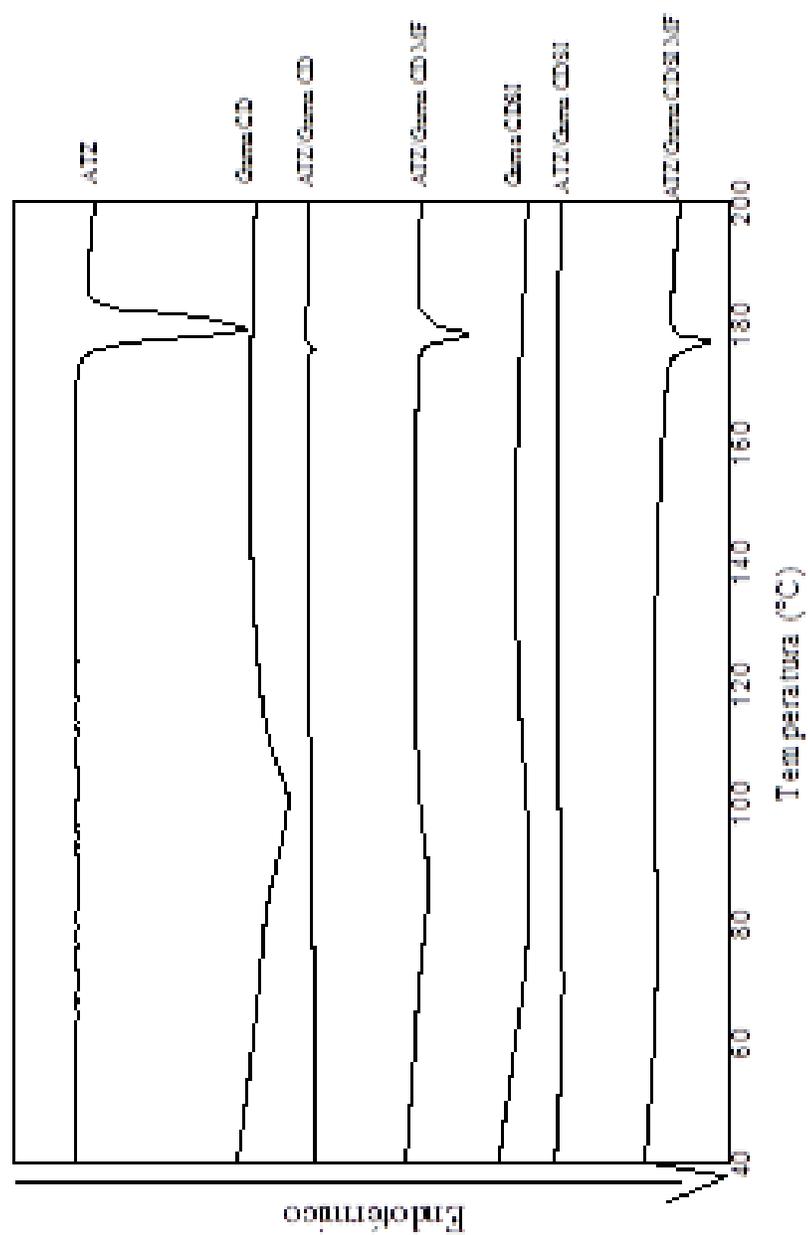


Figura 11 - Termogramas de calorimetria diferencial de varredura da ATZ; gama-CD; gama-CDSI; complexos e misturas físicas

A ATZ possui um pico endotérmico característico em 178°C presentes nas **Figuras 10 e 11**. Nos complexos formados entre ATZ/ α -CD e ATZ/ γ -CD esses picos estão menos intensos. Suspeita-se que possa haver, juntamente com a ATZ, água de solvatação inclusa na cavidade das ciclodextrinas e acredita-se que através da mudança do microambiente na inclusão da ATZ, as moléculas de água restantes se apresentaram mais fracamente associadas à cavidade (CARVALHO e PINTO, 2012).

Nas misturas físicas estes picos estão ainda menos evidentes do que nos complexos ATZ/ α -CD e ATZ/ γ -CD. Sendo a mudança de temperatura dos picos associadas à complexação, podemos afirmar que a mesma está ocorrendo, em menor proporção, nas misturas físicas. Picos endotérmicos semelhantes em α -CD e γ -CD também foram encontrados por Mura e colaboradores (2003) e este fato está relacionado ao processo de desidratação da CD.

Nos termogramas dos complexos e misturas físicas dos materiais híbridos ATZ/ α -CDSI e ATZ/ γ -CDSI, os picos relativos à ATZ desapareceram. Assim, a formação do complexo pode estar suprimindo a degradação da molécula ou mesmo devido a diferença entre a massa específica de CDSI e ATZ ser alta.

4.4. Ensaio de liberação da atrazina dos complexos de inclusão ATZ/CD e ATZ/CDSI

Os testes de liberação da ATZ foram conduzidos em sistema de diálise. Neste ensaio, a ATZ possui capacidade de atravessar os poros da membrana (1.000 Da), porém as estruturas de ciclodextrinas que são maiores, não a atravessam e, desta forma, foi possível observar o efeito da complexação na velocidade de liberação da molécula de ATZ.

Para que sejam interessantes, os sistemas de liberação modificados devem apresentar liberação mais lenta ao longo do tempo e eliminação reduzida o suficiente para que as concentrações da molécula-hóspede sejam retidas no local. Assim, os testes de liberação *in vitro* permitem observar e avaliar a permeação de moléculas-hóspede através de membranas, onde as formulações que apresentam menores taxas de liberação têm, possivelmente, maior constante de estabilidade na interação molécula-hóspede/CD (MORAES, ABRAMI *et al.*, 2007).

Analisando as **Figuras 12 e 13**, foi possível verificar que não houve diferença significativa entre as liberações de α -CD e γ -CD. Além disso, em 22 horas, de experimento, 51% da ATZ não complexada foi liberada, contra 19% (α -CD e γ -CD) e 15% (α -CDSI e γ -CDSI), representando uma redução de 63% e 71% na velocidade de liberação.

A liberação da ATZ foi, em ordem crescente, ATZ/CDSI < ATZ/CD < ATZ livre. Assim, de forma geral, a associação da ATZ aos materiais híbridos (CDSI), reduz em 75% a velocidade de liberação, enquanto que, nos complexos ATZ/CD, a redução é de 67%.

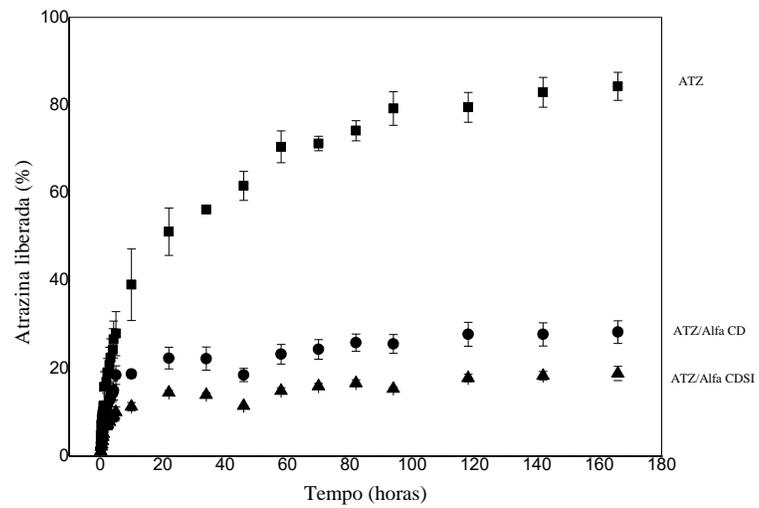


Figura 12 - Curvas de liberação em água para a ATZ; alfa-CD e alfa-CDSI

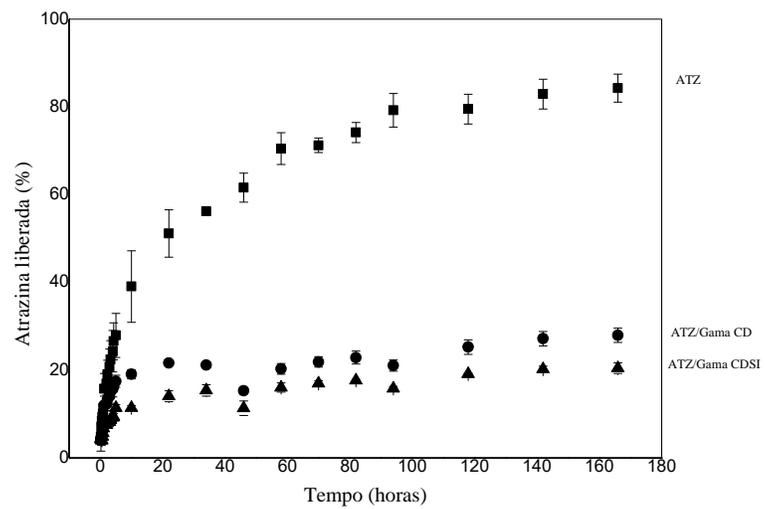


Figura 13 - Curvas de liberação em água para a ATZ; gama-CD e gama-CDSI

4.5. Análises em coluna de solo

O objetivo das análises em coluna de solo foi medir a mobilidade, quantificar e medir a liberação de ATZ dos complexos com CD e CDSI, comparando à ATZ livre.

4.5.1.Umidade

O perfil de umidade ao longo das colunas de solo foi definido com o intuito de simular as condições pluviométricas semelhantes às existentes no campo. Os valores de umidade obtidos em todas as amostras foram próximos de 20%. Avaliando os teores de umidade nas diferentes camadas de solo foi possível identificar que não houve diferenças significativas no perfil de umidade nas diferentes frações da coluna de solo (**Figura 14**). Isto indica que a hidratação realizada após as etapas de irrigação foi uniforme e, desta forma, a distribuição de ATZ não sofreu influência de escassez ou de excesso de água ao longo da coluna.

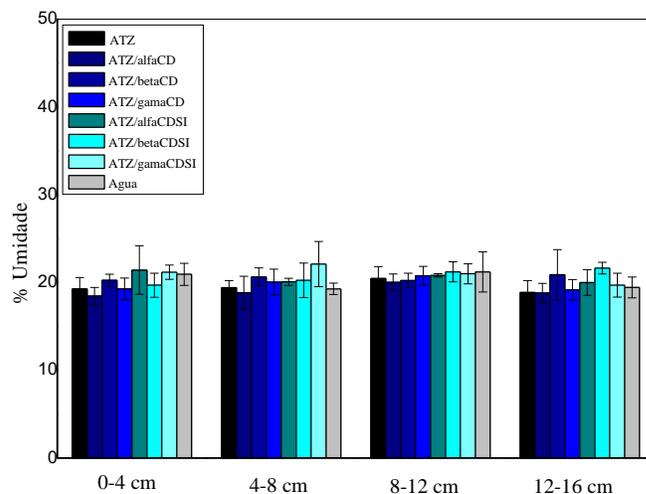


Figura 14 - Valores médios relativos de umidade, nas 4 camadas da coluna de solo (0-4 cm; 4-8 cm; 8-12 cm; 12-16 cm) determinados em quadruplicata, à temperatura de 25°C

4.5.2. Análise de concentração de ATZ ao longo do perfil do solo

Após a certificação de que o nível de hidratação ao longo da coluna de solo era homogêneo, foi realizada a análise de concentração de ATZ ao longo do perfil da coluna (**Figura 15**).

A concentração do agroquímico ATZ em todos os tratamentos testados com CD ou CDSI foi maior que o tratamento contendo a ATZ livre.

Para a primeira e segunda camadas de solo, entre os tratamentos ATZ/ α -CD; ATZ/ β -CD; ATZ/ γ -CD existe diferença significativa, sendo que a ATZ/ γ -CD possui a menor média de concentração. Na terceira e quarta camadas os valores foram iguais estatisticamente.

Entre os materiais híbridos (ATZ/CDSI), todos os tratamentos em todas as camadas da coluna foram iguais estatisticamente.

Acredita-se que a cinética de degradação da ATZ, em colunas de solo, não seja de primeira ordem, ou seja, não é diretamente proporcional à concentração de ATZ no solo. Existe um pico de degradação entre os primeiros 20 dias, uma fase de baixa atividade a partir de 25 dias até o ducentésimo dia, onde ocorre outro pico de degradação (CHEYNS, MERTENS, *et al.*, 2010).

Comparando os complexos (ATZ/CD) e os materiais híbridos (ATZ/CDSI) todos os materiais híbridos (ATZ/ α -CDSI; ATZ/ β -CDSI e ATZ/ γ -CDSI) apresentaram médias de concentração estatisticamente menores do que os complexos (ATZ/ α -CD; ATZ/ β -CD; ATZ/ γ -CD).

Em solos com micro-organismos adaptados ao uso de ATZ, ocorre a degradação da mesma por microflora presente no solo (JABLONOWSKI, KÖPPCHEN *et al.*, 2013).

Portanto os materiais híbridos ATZ/CDSI estão menos susceptíveis à lixiviação e o excedente pode ser degradado por micro-organismos do próprio ambiente.

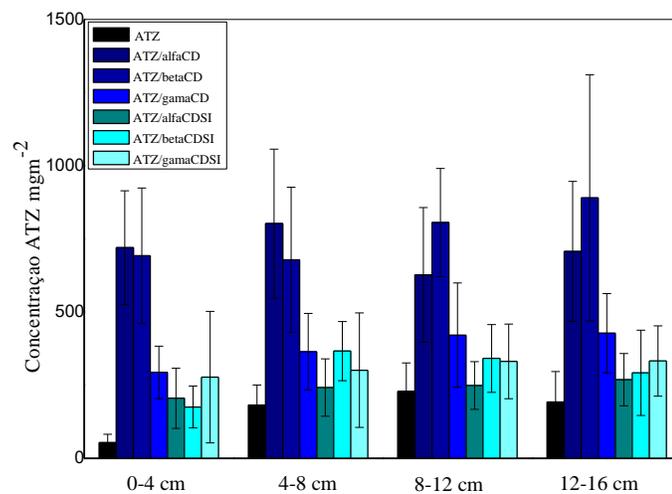


Figura 15 - Valores médios da concentração de ATZ em diferentes camadas de solo, nos tratamentos: ATZ livre; ATZ/ α -CD; ATZ/ β -CD; ATZ/ γ -CD; ATZ/ α -CDSI; ATZ/ β -CDSI e ATZ/ γ -CDSI

4.5.3. Avaliação da liberação de ATZ dos complexos de inclusão com CD e CDSI no solo

Com exceção do complexo ATZ/ α -CD, o perfil de liberação do herbicida ATZ no solo, livre e complexado em CD ou CDSI, não foi estatisticamente diferente para nenhum dos tratamentos (**Figura 16**). Assim, o perfil de liberação para a ATZ livre, ATZ/ β -CD, ATZ/ γ -CD e materiais híbridos ATZ/CDSI, são semelhantes após 7 irrigações.

Isso significa que, mesmo depois de 7 irrigações, o herbicida ainda está presente no solo, indicando que não há perda do material aplicado. Esse fato sugere uma economia para o produtor e para o ambiente, visto que não seriam necessárias novas aplicações do herbicida.

Trigo e colaboradores (2010) estudaram a biodisponibilidade de formulações organofílicas com ATZ em solo, cujo estudo também demonstrou biodisponibilidade semelhante entre a ATZ livre e as formulações.

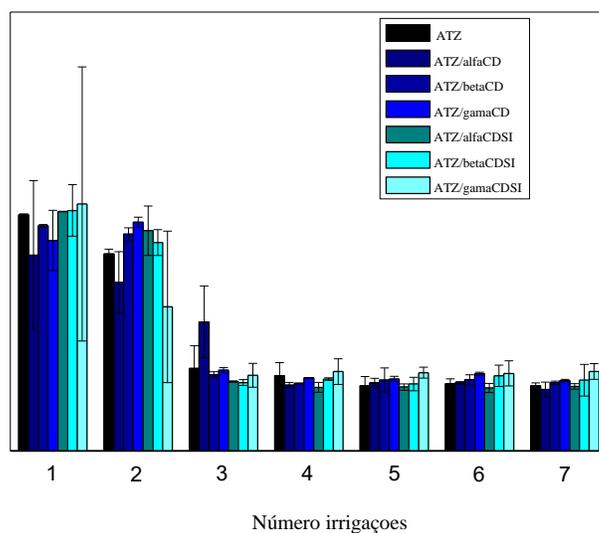


Figura 16 - Valores médios de liberação de ATZ no solo, livre e complexada com CD e CDSI

4.6. Ensaio de aberração cromossômica em *Lactuca sativa*

Os efeitos dos tratamentos na germinação das sementes e desenvolvimento de plântulas de *L. sativa* foram avaliados nos cinco primeiros dias de crescimento (120 h de exposição) e estão dispostos na **Tabela 1**. Os complexos de inclusão com CDs e com os materiais híbridos CDSI não apresentaram interferência significativa nos parâmetros GR e IVG. Já para o CR foi observada uma diminuição significativa do tamanho das raízes em todos os tratamentos. Esta inibição de crescimento foi de 23,10% para α -CD; 34,97% para β -CD; 38,75% para γ -CD e de 18,17% para α -CDSI; 30,97% para β -CDSI; 33,52% para γ -CDSI, todos comparados à ATZ livre.

Tabela 1: Valores médios de taxa de germinação (GR), índice de velocidade de germinação (IVG) e taxa de crescimento radicular (CR) para os controles negativo (água) e positivo (ATZ) e os tratamentos com CD e CDSI.

Tratamento	GR (%)	IVG	CR
Atrazina	88,00 \pm 5,05	12,35 \pm 0,78	25,93 \pm 0,97
ATZ/ α -CD	88,00 \pm 6,91	11,99 \pm 0,98	19,94* \pm 0,35
ATZ/ β -CD	89,30 \pm 6,83	12,23 \pm 1,91	16,87* \pm 0,83
ATZ / γ -CD	88,70 \pm 4,47	12,58 \pm 0,78	15,88* \pm 0,33
ATZ/ α -CDSI	88,00 \pm 6,91	11,97 \pm 0,96	21,22* \pm 0,90
ATZ/ β -CDSI	89,30 \pm 7,23	12,24 \pm 1,86	17,90* \pm 1,64
ATZ/ γ -CDSI	89,30 \pm 5,47	12,69 \pm 0,83	17,24* \pm 1,34
Água	91,30 \pm 7,67	13,00 \pm 0,78	26,06 \pm 0,61

Valores seguidos por * indicam diferença significativa com 95% de confiança, em relação à ATZ, segundo teste de Tukey.

Dentre os parâmetros macroscópicos (GR, IVG e CR) avaliados no modelo *L. sativa*, aqueles relacionados com a germinação (GR e IVG), segundo Valério *et al.* (2007), são menos sensíveis. Já o CR é mais eficiente em mostrar a toxicidade do composto testado, sendo diretamente afetado pelo efeito tóxico do composto testado sobre o atraso na germinação, que reflete na redução do IVG (MAURO *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, no prelo). Logo, as reduções significativas observadas para a ATZ complexada em CD e CDSI mostram que os complexos foram eficientes em aumentar o efeito herbicida da ATZ.

Não obstante, o crescimento radicular é um parâmetro importante nos bioensaios com modelos vegetais em estudos toxicológicos, pois pode ter relação com os parâmetros observados nos testes citogenéticos realizados: o IM, que reflete a frequência de divisão celular, é um parâmetro cariocinético diretamente relacionado à taxa de crescimento radicular (ANDRADE -VIEIRA *et al.*, 2010).

Os resultados da avaliação microscópica referentes ao IM e às porcentagens de cada fase da divisão mitótica observadas estão apresentados na **Tabela 2**. O IM reduziu em comparação aos tratamentos com a ATZ. No entanto, uma redução significativa de 17% foi observada apenas no tratamento ATZ/ γ -CD, em relação à ATZ não complexada.

Tabela 2: Valores médios de índice mitótico (IM) e percentuais de cada fase da mitose em raízes de *Lactuca sativa* para os controles negativo (água) e positivo (ATZ) e os tratamentos com CD e CDSI.

Tratamento	Nº de células contadas	Intérfase (%)	Fase Mitótica (%)				Índice Mitótico
			Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase	
Atrazina	11170	81,24	56,70	19,90	11,13	12,27	7,32 ± 4,47x10 ⁻³
ATZ/α- CD	10760	89,67	53,31	22,40	12,10	12,19	6,68 ± 9,99x10 ⁻³
ATZ/β- CD	11430	88,82	52,51	20,56	13,00	13,92	6,40 ± 0,012
ATZ/γ- CD	10930	87,14	52,69	21,54	12,76	13,02	6,04* ± 5,00x10 ⁻³
ATZ/α- CDSI	11020	87,64	57,43	19,79	10,75	12,03	7,21 ± 0,012
ATZ/β- CDSI	11060	84,55	55,83	20,05	9,81	14,31	7,30 ± 7,01x10 ⁻³
ATZ/γ- CDSI	11480	86,41	55,95	19,61	12,54	11,90	7,36 ± 8,21x10 ⁻³
Água	10800	89,38	56,29	18,14	11,17	14,40	7,85 ± 7,38x10 ⁻³

Valores acrescidos de * indicam diferença significativa com 95% de confiança, segundo teste de Tukey

A **Figura 17** e a **Tabela 3** mostram as frequências de alterações ao longo do ciclo celular de alface expostos aos tratamentos: ATZ não complexada; ATZ/ α -CD; ATZ/ β -CD; ATZ/ γ -CD; ATZ/ α -CDSI; ATZ/ β -CDSI e ATZ/ γ -CDSI. As maiores frequências de alterações foram observadas nos tratamentos com ATZ não complexada. Quando esta foi complexada com CD ou CDSI, a frequência de alterações observadas reduziu. Tal redução das AC foi de 21% para ATZ/ α -CD, 21% para ATZ/ β -CD e de 33% para ATZ/ γ -CD. Foi de 39% para ATZ/ α -CDSI, 36% para ATZ/ β -CDSI e 59% para ATZ/ γ -CDSI, todos comparados à ATZ não complexada. Para AN as taxas de diminuição foram de 68% para ATZ/ α -CD, 44% para ATZ/ β -CD e de 55% para ATZ/ γ -CD. E de 55% para ATZ/ α -CDSI, 29% para ATZ/ β -CDSI, 46% para ATZ/ γ -CDSI, todos comparados à ATZ não complexada.

Esses valores reduzidos de genotoxicidade para sistemas de liberação modificada de agroquímicos, especificamente a ATZ, também foram encontrados por outros pesquisadores (GRILLO et al, 2009; SRIVASTAVA & MISHA, 2009; GRILLO et al, 2012 e PEREIRA et al, 2014) corroborando com os resultados apresentados acima.

Bolle e colaboradores (2009) determinaram que a ATZ pode apresentar efeito genotóxico em *Allium cepa* em concentrações acima de $5 \mu\text{g L}^{-1}$.

Esses valores reduzidos de genotoxicidade para sistemas de liberação modificada de agroquímicos, especificamente a ATZ, também foram encontrados por outros pesquisadores. Grillo e colaboradores (2009) trabalharam com ATZ encapsuladas em microesferas e, também observaram redução significativa da genotoxicidade no teste da *Lactuca sativa* com apenas 24 h de exposição das raízes à ATZ. Grillo e colaboradores (2012) realizaram testes em *Allium cepa* com herbicidas da classe das triazinas, (ametryn, atrazina e simazina) encapsulados e, também demonstraram menores taxas de genotoxicidade associada aos herbicidas. Pereira e colaboradores (2014)

testaram a genotoxicidade de ATZ encapsuladas em nano partículas em testes de *Allium cepa*, e também obtiveram redução, corroborando com os resultados apresentados acima.

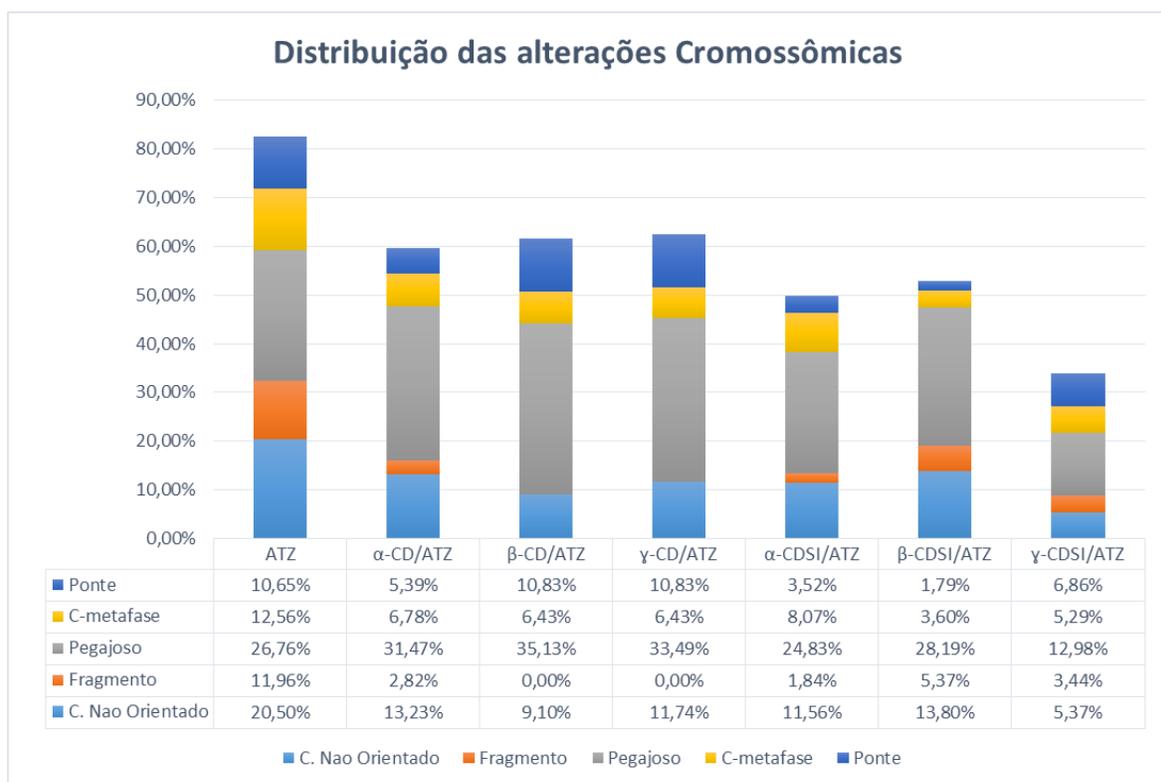


Figura 17 - Alterações cromossômicas nos tratamentos com ATZ não complexada, ATZ/CD, ATZ/CDSI e água

Tabela 3: Valores médios percentuais de alterações celulares (AC) e alterações nucleares (AN) em células meristemáticas de *Lactuca sativa* após tratamento com os controles negativo (água) e positivo (ATZ) e os tratamentos: ATZ/CD e ATZ/CDSI.

Tratamento	AC (%)	AN (%)
Atrazina	0,82 ± 3,10x10 ⁻³	11,45 ± 3,21x10 ⁻³
ATZ/α- CD	0,64* ± 1,91x10 ⁻³	3,65* ± 0,01
ATZ/β – CD	0,65* ± 1,35x10 ⁻³	6,46* ± 0,04
ATZ/γ- CD	0,55* ± 2,10x10 ⁻³	5,14* ± 0,03
ATZ/α -CDSI	0,50* ± 2,00x10 ⁻³	5,15* ± 0,03
ATZ/β- CDSI	0,53* ± 1,40x10 ⁻³	8,15* ± 0,05
ATZ/γ- CDSI	0,34* ± 1,92x10 ⁻³	6,23* ± 0,02
Água	0,02 ± 4,06x10 ⁻⁴	2,77 ± 0,02

Valores acrescidos de * indicam diferença significativa com 95% de confiança, segundo teste de Tukey.

Nas **Figuras 18 e 19** podem-se observar exemplos das alterações obtidas ao final do exame das lâminas nos tratamentos.

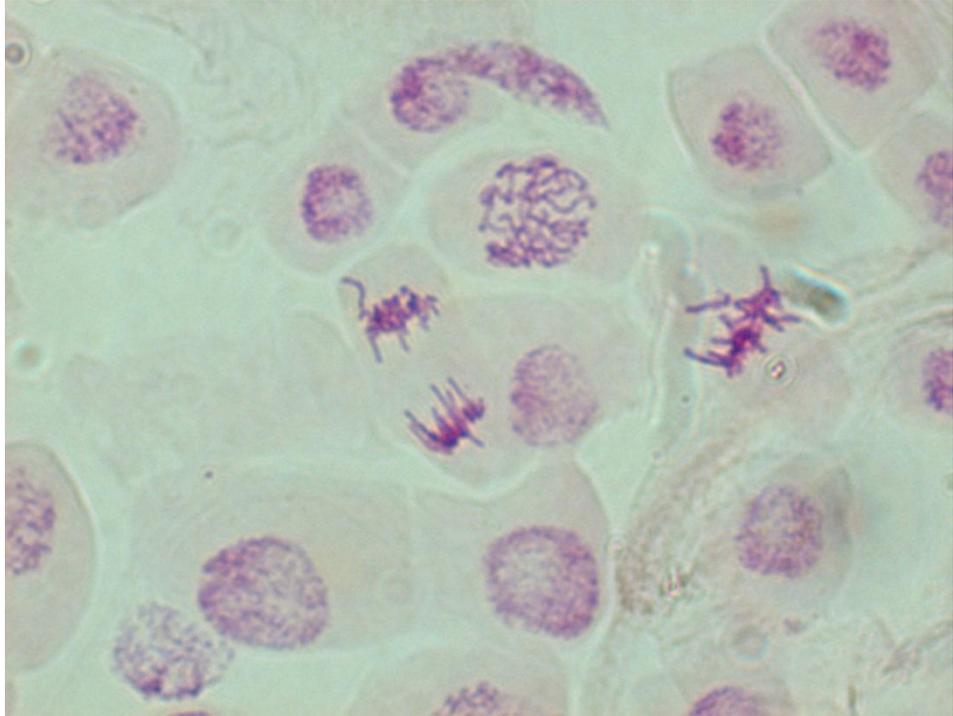


Figura 18 - Exemplo de C-não orientado (Imagem obtida por Santos no Laboratório de Genética Molecular, DBI/UFLA)



Figura 19 - Exemplo de ponte (Imagem obtida por Santos no Laboratório de Genética Molecular, DBI/UFLA)

5. CONCLUSÃO

A ATZ é um agroquímico amplamente utilizado e pode causar várias alterações citogenéticas em plantas e animais, sobretudo doenças neurodegenerativas em humanos. Contudo, os materiais híbridos são de fácil obtenção, síntese de baixo custo e podem ser utilizados para uma liberação modificada de ATZ. Todos os tratamentos testados: ATZ/ β -CD; ATZ/ γ -CD; ATZ/ α -CDSI; ATZ/ β -CDSI e ATZ/ γ -CDSI, apresentaram menores valores de citotoxicidade. No entanto, ATZ/ γ -CD e ATZ/ γ -CDSI, mostraram-se mais eficientes e menos tóxicos.

REFERÊNCIAS

ABARIKWU, S.O.; FAROMBI, E. O. Atrazine induces apoptosis of SH-SY5Y human neuroblastoma cells via the regulation of Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3-dependent pathway. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 2015. 90-98

ABARIKWU, S.O.; PANT, A.B.; FAROMBII, E. The protective effects of quercetin on the cytotoxicity of atrazine on rat Sertoli-germ cell co-culture. **International Journal of Andrology**, 2012. 590-600

ANDRADE, L. F.; DAVIDE, L. C.; GEDRAITE, L. S. The effect of cyanide compounds, fluorides, aluminum, and inorganic oxides present in spent pot liner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2010. 626-631.

ANDRADE-VIEIRA, L. F. et al. Effects of *Jatropha curcas* oil in *Lactuca sativa* root tip bioassays. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 2014. 373-382.

ANDRADE-VIEIRA, L. F.; CAMPOS, J. M. S.; DAVIDE, L. C. Effects of Spent Pot Liner on mitotic activity and nuclear DNA content

in meristematic cells of *Allium cepa*. **Journal of Environmental Management**, 26 May 2012. 140-146.

ARAGAO, F. B. et al. Phytotoxic and cytotoxic effects of Eucalyptus essential oil on *Lactuca sativa*. **Allelopathy Journal**, 2015. 259-272.

BARACHO, R. V. et al. Obtenção e caracterização de material híbrido entre sílica e ciclodextrinas. **Química Nova**, 2015. 1063-1067.

BAUR, J. R. Release characteristics of starch xanthide herbicide formulations. **Journal of Environmental Quality**, 9, 1980. 379-382.

BINELLO, A. et al. Synthesis of chitosan-cyclodextrin adducts and evaluation of their bitter-masking properties. **Flavour and Fragrance Journal**, 2004. 394-400.

BOLLE, P. et al. Clastogenicity of atrazine assessed with the *Allium cepa* test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 2004. 137-141

BRASIL, Presidência da República Federativa. Decreto N° 4074/2002 - "Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm>. Acesso em: 04 fev. 2016L

BRECKENRIDGE, C. B.; WERNER, C.; STEVENS, J. T.; SUMNER, D. D. Hazard assessment for selected symmetrical and asymmetrical triazine herbicides. In: LEBARON, H. M.; MCFARLAND, J. E.; BURNSIDE, O. C. **The triazine herbicides-50 years revolutionizing agriculture**. 1ª edição. ed. Amsterdã: Elsevier, 2008. p. 601.

CAMPOS, E. V. R. et al. Polymeric and solid lipid nanoparticles for sustained release of carbendazim and tebuconazole in agricultural applications. **www.nature.com/scientificreports**, 2015. 1-14.

CARLSON, GERALD A. The use of economic benefit models in estimating the value of triazine herbicides. In: LEBARON, H. M.; MCFARLAND, J. E.; BURNSIDE, O. C. **The triazine herbicides-50**

years revolutionizing agriculture. 1ª Edição. ed. Amsterdã: Elsevier, 2008. p. 601.

CARVALHO, L. B.; PINTO, L. M. A. Formation of inclusion complexes and controlled release of atrazine using free or silica-anchored β -cyclodextrin.. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, 2012. 375-381.

CAVAS, T. *In vivo* genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine-based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the comety assay. **Food and chemical toxicology**, 2011. 1431-1435

CEREJEIRA, M. J. et al. Pesticides in portuguese surface and ground waters. **Water Research**, 37, 2003. 1055-1063.

CHAVES, I. S. et al. Alternativas para o tratamento da esquistossomose: caracterização físico-química do complexo de inclusão entre praziquantel e hidroxipropil- β -ciclodextrina. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 7, p. 1067-74, 2010.

CHEYNS, K. et al. Monod kinetics rather than a first-order degradation model explains atrazine fate in soil mini-columns: Implications for pesticide fate modelling. **Environmental Pollution**, 2009. 1405-1411

CORREIA, F. V.; LANGENBACH, T. Dinâmica da distribuição e degradação de Atrazina em argilossolo vermelho-amarelo sob condições de clima tropical úmido. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, 2005.

CORRIU, R. J. P. et al. Hybrid sílica gels containing 1,3-butadiyne bridging units. Thermal and chemical reactivity of the organic fragment. **Chemical Materials**, 1996. 100-106.

COSTA, A. et al. Synthesis and fungicide, phytotoxic and cytotoxic activity of novel glycerol-derived 1,2,3-triazoles. **Pest Management Science**, no prelo

COX, L. et al. Natural soil colloids to retard simazine and 2,4-D leaching in soil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48, 2000. 93-99.

CRINI, G. Review: A history of cyclodextrins. **Chemical Reviews**, 23 september 2014. 10940–10975.

DAVIS, M. E.; BREWSTER, M. E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. **Nature Reviews Drug Discovery**, 3, n. 12, 2004. 1023-1035.

DE JESUS, M. B. **Preparação, Caracterização e Avaliação da Formulação Anti-helmíntica de Praziquantel em Beta-ciclodextrina**. Unicamp. Campinas. 2006.

DODZIUK, H. **Cyclodextrins and their complexes: Chemistry, Analytical Methods, Applications**. [S.l.]: Wiley - VCH, 2006.

DURI, S.; TRAN, C. D. Supramolecular composite materials form cellulose, chitosan and cyclodextrin: Facile preparation and their selective inclusion complex formation with endocrine disruptors. **Langmuir**, 2013. 5037-5049

ECOBICHON, D. J. Pesticide in developing countries. **Toxicology**, 160, 2001. 27-33.

FAWCETT, R. S. Environmental Benefits of Triazine Use in Conservation Tillage. In: LEBARON, H.; MCFARLAND, J. E.; BURNSIDE, O. C. **The triazine herbicides-50 years revolutionizing agriculture**. 1ª Edição. ed. Amsterdã: Elsevier, 2008. p. 601.

GARCIA, J. et al. Evolutive follow-up of the photocatalytic degradation of real textile effluents in TiO₂ and TiO₂/H₂O₂ systems and their toxic effects on *Lactuca sativa* seedlings. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2009. 1589-1597.

GILLAND, B. World population and food supply can food production keep pace with population growth in the next half-century? **Food Policy**, 27, 2002. 47-63.

GRANT, W. F. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals.. **Mutation Research**, 1999. 107-112.

GRAYMORE, M.; STAGNITTI, F.; ALLINSON, G. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. **Environment International**, 26, 2001. 483-495.

GRILLO, R. et al. Controlled release system for ametryn using polymer microspheres: preparation, characterization and release kinetics in water. **Journal of Hazardous Materials**, 2011. 1645-1651.

GRILLO, R. et al. Characterization of atrazine-loaded biodegradable poly(9-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) microspheres. **Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics**, 2009. 26-32

HAYES, T. et al. Herbicides: feminization of male frogs in the wild. **Nature**, 419, 31 October 2002. 895-896.

HIGUCHI, T. K.; CONNORS, A. Phase-solubility techniques. **Advanced in Chemical Instrumentation**, 1965. 212-217

HUSSAIN, R. et al. Cellular and biochemical effects induced by atrazine on blood of male Japanese quail (*Coturnix japonica*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 2012. 38-42

JABLONOWSKI, N. D. et al. Persistence of ¹⁴C-labeled atrazine and its residues in a field lysimeter soil after 22 years. **Environmental Pollution**, 157(7), 157, July 2009. 2126-2131.

JINYAN, Z. et al. Synthesis of atrazine-HPCD inclusion and its bioactivity. **Tianjin University and Springer-Verlag Berlin Heidelberg**, 05 March 2014. 350-357.

KAMIYA, M.; NAKAMURA, K.; SASAKI, C. Inclusion effects of cyclodextrins on the photodegradation rates of parathion and paraoxon in aquatic medium. **Chemosphere**, 28, 1994. 1961-1966.

KAWAGUCHI, Y. et al. Chemically bonded cyclodextrin stationary phases for liquid chromatographic separation of aromatic compounds. **Analytical Chemistry**, 1983. 1852-1857.

KOSKINEN, W. C.; BANKS, P. A. Soil movement and persistence of triazine herbicides. In: LEBARON, H. M.; MCFARLAND, J. E.;

BURNSIDE, O. C. **The triazine herbicides-50 years revolutionizing agriculture**. 1ª Edição. ed. Amsterdã: Elsevier, 2008. p. 601.

LEBARON, H. M.; MCFARLAND, J. E.; BURNSIDE, O. C. The Triazine herbicides: A milestone in the development of weed control technology. In: LEBARON, H. M.; MCFARLAND, J. E.; BURNSIDE, O. C. **The triazine herbicides-50 years revolutionizing agriculture**. [S.l.]: Elsevier, 2008. p. 601.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 1996. 1017-1025.

LOFTSSON, T.; DUCHÊNE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **Journal Pharmaceutical**, 329, 2007. 1-11.

LYRA, M. A. et al. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 2010. 117-124

MAHLAMBI, M. M. et al. β - Cyclodextrin-ionic liquid polyurethanes for the removal of organic pollutants and heavy metals from water: synthesis and characterization. **Journal Polymers Resources**, 2010. 589-600.

MARKOVIC, M. et al. Assessment of heavy metal and pesticide levels in soil and plant products from agricultural area of Belgrade, Serbia. **Archives Environmental Contam Toxicol**, 2010. 341-351.

MATIOLI, G. **Ciclodextrinas e suas aplicações em:** alimentos, fármacos, cosméticos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais. Maringá: Eduem, 2000.

MORAES, C. M. et al. Preparação e caracterização físico-química de complexos de inclusão entre anestésicos locais e hidroxipropil- β -ciclodextrina. **Química Nova**, 30, n. 4, 2007. 777-784.

MULLIN, C. A. et al. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. **Plos One**, Paris, v. 5, n. 3, p. 1-19, 19 March 2010. ISSN DOI: 10.1371.

MURA, P. et al. Differential scanning calorimetry as an analytical tool in the study of drug- cyclodextrin interactions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, 2003. 635-646.

NOVAK, I.; KOVAC, B. Electronic structure of herbicides: Atrazine and bromoxynil. **Chemical Physics Letters**, 2011. 57-59.

PALMIERI, M. J. et al. Cytotoxic and phytotoxic effects of the main chemical components of spent pot-liner: A comparative approach. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 2014. 30-35.

PEREIRA, A. E. S. et al. Application of poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles containing atrazine herbicide as an alternative technique to control weeds and reduce damage to the environment. **Journal of Hazardous Materials**, 2014. 207-215.

PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. **Advances in Agronomy**, 75, 2002. 57-134.

POSPISIL, L. et al. Inclusion complexes of atrazine with α - β - and γ -cyclodextrins. Evidence by polarographic kinetic currents. **Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry**, 31, 1998. 57-70.

PRADO, A. G. S.; FARIA, E. A.; PADILHA, P. M. Aplicação e modificação química da sílica gel obtida de areia. **Química Nova**, 2005. 544-547.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A LANGUAGE AND ENVIRONMENT FOR STATISTICAL COMPUTING. VIENNA: R FOUNDATION FOR STATISTICAL COMPUTING, 2., 2015.

RAJKOVIC, V. et al. Atrazine-induced changes in the myocardial structure of peripubertal rats. **Toxicology and Industrial Health**, 2014. 250-258.

RODRIGUES, S. G. et al. Computational analysis and physico-chemical characterization of an inclusion compound between praziquantel and methyl- β -cyclodextrin for use as an alternative in the treatment of

schistosomiasis. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, 2011. 19-28.

SENE, L. et al. New aspects on atrazine biodegradation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 53, 2010. 487-496.

SHAO, D. et al. Removal of polychlorinated biphenyls from aqueous solutions using β -cyclodextrin grafted multiwalled carbon nanotubes. **Chemosphere**, 2010. 679-685.

SILVERSTEIN, R. M. et al. **Spectrometric identification of organic compounds**. 8ª Edição. John Wiley & Sons, 2014

SRIVASTAVA, K.; MISHRA, K. K. Cytogenetic effects of commercially formulated atrazine on the somatic cells of *Allium cepa* and *Vicia faba*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 2009. 8-12

STENERSEN, J. **Chemical pesticides: mode of action and toxicology**. [S.l.]: CRC Press, 2004. 277 p.

TRIGO, C. et al. Bioavailability of organoclay formulations of atrazine in soil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2010. 11857-11863.

UNECE, E.; FAO, O. **The Wye Group Handbook: rural households's livelihood and well-being statistics on rural development and agriculture household income**. [S.l.]: [s.n.], 2007.

VALERIO, M. E.; GARCIA, J. F.; PEINADO, F. M. Determination of phytotoxicity of soluble elements in soils, based on a bioassay with lettuce (*Lactuca sativa*). **Science Technique Environmental**, 2007. 63-66

VENTURINI, C. G. et al. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**, 31, n. 2, 2008.

VILLAVARDE, J. Time-dependent sorption of norflurazon in four diferente soils: use of β -cyclodextrin solutions for remediation of pesticide-contaminated soils. **Journal of Hazardous Materials**, 142, 2007. 184-190.

VILLAVARDE, J. et al. Preparation and characterization of inclusion complex of norflurazon and β -cyclodextrin to improve herbicide formulations. **Journal of Agricultural and Chemistry**, 52, 2004. 864-869.

VILLAVARDE, J. et al. Inclusion complexes of α - and β -cyclodextrins and the herbicide norflurazon: I. Preparation and characterization. II. Enhanced solubilisation and removal from soils. **Chemosphere**, 60, 2005. 656-664.

WANG, L. et al. Spherical β -cyclodextrin-silica hybrid materials for multifunctional chiral stationary phases. **Journal of Chromatography A**, 2015. 70-78

WÖßNER, M.; BALLSCHMITER, K. New stationary phase based on β -cyclodextrin for normal-phase HPLC group-separation of organic nitrates. **Fresenius Journal Analytical Chemical**, 2000. 346-350.

XU, X. et al. β -Cyclodextrin functionalized mesoporous silica for electrochemical selective sensor: Simultaneous determination of nitrophenol isomers. **Electrochimica Acta**, 2011. 142-149.

ZHANG, J.; MA, P. X. Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: Recent progress and future perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2013. 1215–1233.

ZHAO, J. et al. Preparation and application of rifamycin-capped (3-(2-O- β -cyclodextrin)-2-hydroxypropoxy)-propylsilyl-appended silica particles as chiral stationary phase for high-performance liquid chromatography. **Talanta**, 2010. 286-290.