



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS
MESTRADO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS

MAJARA RAQUEL DE MELO SILVA

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE PARTÍCULAS
SUBMICROMÉTRICAS DE CaCO_3 COMO SISTEMA CARREADOR PARA O
CARBENDAZIM**

MOSSORÓ/RN

2019

MAJARA RAQUEL DE MELO SILVA

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE PARTÍCULAS
SUBMICROMÉTRICAS DE CaCO_3 COMO SISTEMA CARREADOR PARA O
CARBENDAZIM**

Dissertação apresentada ao Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.

Linha de Pesquisa: Síntese de Nanopartículas, biopolímeros e materiais nanoestruturados.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Franciné Maia Júnior.

Co-orientador: Prof. Dr. Rui Sales Júnior.

MOSSORÓ/RN

2019

©Todos os direitos estão reservados à Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996, e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata, exceto as pesquisas que estejam vinculadas ao processo de patenteamento. Esta investigação será base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) seja devidamente citado e mencionado os seus créditos bibliográficos.

S586s Silva, Majara Raquel de Melo .
SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE
PARTÍCULAS SUBMICROMÉTRICAS DE CaCO₃ COMO SISTEMA
CARREADOR PARA O CARBENDAZIM / Majara Raquel de
Melo Silva. - 2019.
75 f. : il.

Orientador: Francisco Franciné Maia Júnior.
Coorientador: Rui Sales Júnior.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ciência e Engenharia de Materiais, 2019.

1. Pesticidas. 2. Carbendazim. 3. Partículas.
4. Carbonato de Cálcio. 5. Liberação Controlada.
I. Júnior, Francisco Franciné Maia, orient. II.
Júnior, Rui Sales , co-orient. III. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

MAJARA RAQUEL DE MELO SILVA

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE PARTÍCULAS
SUBMICROMÉTICAS DE CaCO_3 COMO SISTEMA CARREADOR PARA O
CARBENDAZIM**

Dissertação apresentada ao Mestrado em
Ciência e Engenharia de Materiais do Programa
de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de
Materiais da Universidade Federal Rural do
Semi-Árido como requisito para obtenção do
título de Mestre em Ciência e Engenharia de
Materiais.

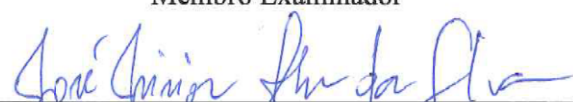
Linha de Pesquisa: Síntese de Nanopartículas,
biopolímeros e materiais nanoestruturados.

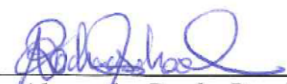
Defendida em: 28 / 02 / 19 .

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Francisco Franciné Maia Júnior (UFERSA)
Presidente


Prof. Dr. José Alzamir Pereira da Costa (UERN)
Membro Examinador


Prof. Dr. José Júnior Alves da Silva (UFERSA)
Membro Examinador


Prof. Dr. Alexandre Rocha Paschoal (UFC)
Membro Examinador

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, sem o qual eu nada conseguiria. Ele não me deixa esmorecer e perder a fé, derramando da sua misericórdia todos os dias. Me dá força para prosseguir na difícil caminhada da vida de maneira que meus objetivos sejam alcançados.

À minha mãe, Maria, que é a principal responsável pela pessoa que sou hoje, me ajudou em todos os momentos e me ensinou que apenas com esforço e dedicação, mas sem perder o caráter e a humildade, conseguiremos uma vida melhor.

À minha irmã, Mágila, a pessoa mais generosa que eu conheço, por estar sempre ao meu lado, me apoiando e me ouvindo, me fazendo acreditar que ainda existe bondade na humanidade. É minha irmã, minha amiga, meu exemplo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Francisco Franciné Maia Júnior pela orientação, pela oportunidade e pelos ensinamentos.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Rui Sales Júnior pelo apoio e pela disposição em atender as necessidades para realização do trabalho.

À UFERSA, bem como ao programa de Pós- Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, pela contribuição na minha formação acadêmica e profissional.

À UFC e ao professor Alexandre Rocha Paschoal, pela realização das medidas de MEV, Espectroscopia no infravermelho e Espalhamento Raman.

À minha família, Pâmela Gisely, Maria das Graças, Madson Cabral, Paulo Gondim, Hilma Gondim, Priscila Geilka e Paulo Gideoni por torcerem por mim e sempre me apoiarem.

À técnica Naama, sempre solícita.

Aos professores Ricardo Henrique de Lima Leite, Marta Lígia Pereira da Silva e Patrícia Ligia Dantas de Moraes, por disponibilizarem os laboratórios pelos quais são responsáveis, imprescindíveis para a síntese das partículas.

À minha grande amiga Honorina, que sempre me apoiou e acreditou em mim.

À minha colega de mestrado Isabely Keyva, que me incentivou.

Agradeço a Banca Examinadora por se dispor e pelas contribuições para o meu trabalho.

Assim diz o Senhor: marchar é com você, abrir o mar é comigo. Então, não esmoreça sua fé, continue caminhando.

(Autor desconhecido)

RESUMO

A produção agrícola brasileira e mundial tem aumentado significativamente ao longo dos anos, o que tem aumentado o uso de agrotóxicos na mesma escala. Os mesmos têm sido usados em concentrações alarmantes e tem causado a poluição do solo, da água e do ar, além de apresentar um risco à saúde humana. O presente trabalho apresenta uma alternativa para reduzir os malefícios causados pelos pesticidas, bem como aumentar sua eficácia biológica, a partir do carregamento do ingrediente ativo carbendazim em uma partícula inorgânica de carbonato de cálcio. Esse sistema carreador apresentou alta eficiência de encapsulação, de aproximadamente 99%. As partículas de carbonato de cálcio puras apresentaram tamanho variando entre 490 nm e 1000 nm, enquanto que as partículas carregadas com carbendazim apresentaram tamanho entre 148 nm e 290 nm. A liberação do carbendazim em 72 horas foi de 93%. A partir desses resultados pode-se afirmar que esse sistema permite a liberação controlada do fungicida carbendazim, sendo uma alternativa eficaz ao uso convencional de pesticidas.

Palavras-chave: Pesticidas. Carbendazim. Partículas. Carbonato de cálcio. Liberação controlada.

ABSTRACT

The Brazilian and global agricultural production has increased significantly over the years, which has increased the use of pesticides on the same scale. They have been used in alarming concentrations and have caused soil, water and air pollution, in addition to presenting a risk to human health. The present work presents an alternative to reduce the damages caused by pesticides, as well as increase their biological effectiveness, from the loading of the active ingredient carbendazim into an inorganic particle of calcium carbonate. This carrier system presented high encapsulation efficiency, of approximately 99%. The pure calcium carbonate particles showed size ranging from 490 nm to 1000 nm, while the particles loaded with carbendazim showed size between 148 nm and 290 nm. The release of carbendazim in 72 hours was 93%. From these results, it can be affirmed that this system allows the controlled release of the fungicide carbendazim, being an effective alternative to the conventional use of pesticides.

Keywords: Pesticides. Carbendazim. Particles. Calcium carbonate. Controlled release.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Causas das perdas e degradação dos pesticidas	17
Figura 2 - Estrutura química do carbendazim	21
Figura 3 - <i>Macrophomina pseudophaseolina</i> : A. Picnídios. B. Esclerócios. C. Macroconídios	23
Figura 4 - Polimorfos do CaCO_3	26
Figura 5 - Parâmetros da equação de Beer-Lambert	28
Figura 6 - Precipitação química.....	29
Figura 7 - Método HPG.....	29
Figura 8 - Principais tipos de emulsões: (a) água em óleo e (b) óleo em água.	32
Figura 9 - Microemulsão W/O.....	33
Figura 10 - Diagrama esquemático de um MEV	34
Figura 11 - Diferentes possibilidades do espalhamento da luz	36
Figura 12 - Modos vibracionais das moléculas. Os sinais + e - indicam saindo do plano e entrando no plano, respectivamente	38
Figura 13 - Espectro de absorção do carbendazim	41
Figura 14 - Curva de calibração do carbendazim	41
Figura 15 - Esquema de síntese das partículas de CaCO_3	43
Figura 16 – Tamanho e morfologia: (a) partículas de CaCO_3 e (b) partículas de CaCO_3 + Carbendazim.....	48
Figura 17 - Espectros Raman: (a) Carbendazim, (b) Partículas de CaCO_3 e (c) partículas de CaCO_3 + Carbendazim. Linhas vermelhas são relativas aos picos do carbendazim e as linhas azuis são relativas aos picos do CaCO_3	51

Figura 18 - Espectros IR: (a) Carbendazim, (b) Partículas de CaCO_3 e (c) partículas de CaCO_3 + Carbendazim. Linhas vermelhas são relativas aos picos do carbendazim e as linhas azuis são relativas aos picos do CaCO_3	55
Figura 19 - Perfil de liberação do carbendazim.....	58
Figura 20 - Eficácia antifúngica da formulação e do carbendazim contra <i>Macrophomina pseudophaseolina</i>	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades do Carbendazim.....	20
Tabela 2 - Atribuição dos modos vibracionais Raman do carbendazim	52
Tabela 3 – Atribuição dos modos vibracionais Raman do carbonato de cálcio	52
Tabela 4 – Bandas no Raman do MBC, do CaCO_3 e do $\text{CaCO}_3 + \text{MBC}$	53
Tabela 5 – Bandas no IR do MBC, do CaCO_3 e do $\text{CaCO}_3 + \text{MBC}$	56
Tabela 6 - Porcentagem de inibição da <i>Macrophomina pseudophaseolina</i>	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOT	di-2-etilhexil sulfosuccinato de sódio
BDA	Ágar batata dextrose
BOD	Demanda biológica de oxigênio
CaCO ₃	Carbonato de cálcio
CTAB	Brometo de hexadeciltrimetil amônio
DIC	Delineamento inteiramente casualizado
Dr	Doutor
EE	Eficiência de encapsulação
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPA	Environmental Protection Agency
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
HPG	High Pressure Homogenization
IDA	Dose diária admissível
IR	Infravermelho
MBC	Carbendazim
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NM	Nanômetro
O/W	Oil-in-water
PIC	Porcentagem de inibição do crescimento
PSMA	Poliestireno-anidrido maleico
RN	Rio Grande do Norte
RPM	Rotações por minuto
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
W/O	Water-in-oil
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivos Gerais	19
2.2	Objetivos Específicos	19
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
3.1.	Fungicidas: o papel do carbendazim.....	20
3.2.	Fungo <i>Macrophomina pseudophaseolina</i>	22
3.3.	Liberação controlada.....	24
3.4.	Carbonato de cálcio	25
3.5.	Espectrofotometria UV/Vis	27
3.6.	Métodos de preparação de partículas de CaCO ₃	28
3.6.1	Microemulsão água em óleo.....	32
3.7.	Microscopia eletrônica de varredura.....	33
3.8.	Espectroscopia vibracional	35
3.8.1	Espalhamento Raman	35
3.8.2	Infravermelho	36
4	METODOLOGIA	40
4.1	Materiais	40
4.2.	Construção da curva de calibração do carbendazim	40
4.3	Método de preparação das partículas de CaCO ₃	42
4.4.	Eficiência de encapsulação	43
4.5.	Liberação <i>in vitro</i>	44

4.6	Preparação do inóculo.....	45
4.7	Avaliação da eficácia antifúngica das formulações	45
4.8	Análise estatística	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	47
5.1	Morfologia	47
5.2	Espalhamento Raman	50
5.3	Infravermelho.....	54
5.4	Eficiência de encapsulação	56
5.5	Liberação <i>in vitro</i>	57
5.6	Eficácia antifúngica das partículas	59
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
7.	REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

A população mundial cresce a cada dia, com estimativa que atinja quase 10 bilhões de pessoas até 2050 (ALEXANDRATOS; BRUINSMA, 2012). Associado a isso tem-se a necessidade do aumento na produção de alimentos, cuja demanda continuará aumentando pelos próximos 40 anos. Por outro lado, as plantas sofrem de doenças infecciosas causadas por fitopatógenos, que podem reduzir a qualidade das culturas ou torná-las inapropriadas para consumo (WANG et al., 2017). O controle sobre as pragas agrícolas é feito, em maior parte, pelo uso de pesticidas, também conhecidos por agrotóxicos, defensivos agrícolas ou agroquímicos. Pesticidas são substâncias usadas para matar, repelir ou controlar qualquer praga ou doença; e idealmente, manteriam um nível de ativo adequado apresentando resíduos mínimos (MARGNI et al., 2002).

Os pesticidas são classificados de acordo com o tipo de praga que controlam: se subdividem em inseticidas, acaricidas, nematicidas, rodenticidas, fungicidas e herbicidas (MOGUL et al., 1996). Os herbicidas, por exemplo, são usados para matar ou inibir o crescimento de plantas indesejadas. Os inseticidas são responsáveis pelo controle de insetos, e os fungicidas pelo controle de fungos. Os rodenticidas são usados para matar roedores como ratos e toupeiras, que podem transmitir doenças aos humanos e prejudicar culturas. Os pesticidas são formulações cujos componentes principais, chamados de ingredientes ativos, são responsáveis pelo controle da praga alvo. Esses, são misturados a ingredientes inertes como solventes, surfactantes e estabilizadores, que ajudam a manter a solubilidade, estabilidade e melhorar a efetividade do pesticida. Os pesticidas sintéticos são produtos artificialmente desenvolvidos a base de compostos como organoclorados, organofosforados e carbamatos (YUSOFF; KAMARI; ALJAFREE, 2016).

As formulações convencionais podem ser divididas em cinco grupos com as seguintes características, segundo DE et al., (2014):

- Granulado (GR): a concentração de ativo varia entre 1 e 40%, com tamanho médio de grânulo entre 250 e 1000 μm . Os grânulos devem ser desintegrados no solo para transmissão direta no campo;
- Solução concentrada (SL): são soluções aquosas do ativo, o que limita o número de pesticidas, pois requer solubilidade em água. Em geral, são formulações muito estáveis;

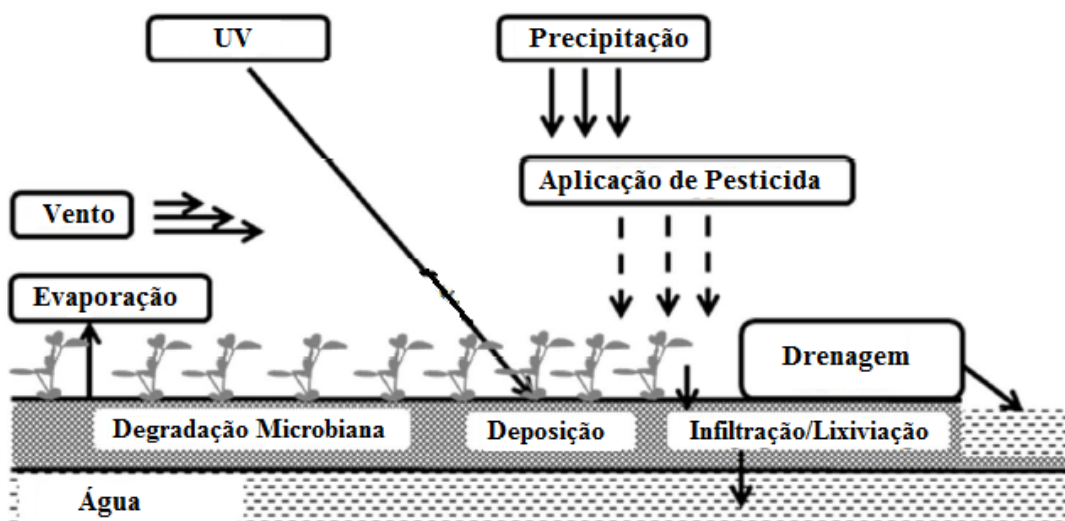
- Concentrado emulsionável (EC): é feito a partir de ativos oleosos ou com baixo ponto de fusão. São adicionados emulsificantes (5-10%) para assegurar boas propriedades de emulsão no tanque de pulverização. Quando misturado a água, produz gotas de 0,1 a 5 μm ;
- Pó molhável (WP): é feito a partir de ativos (geralmente mais de 50%) sólidos com altos pontos de fusão. Geralmente contêm surfactantes secos como agentes de dispersão;
- Suspensão concentrada (SC): geralmente é feita dispersando o ativo (em pó) em uma solução aquosa de um agente molhante/dispersante. São produzidas partículas entre 1 e 10 μm .

O consumo mundial de pesticidas é de cerca de 2 milhões de toneladas por ano (DE et al., 2014). O Brasil lidera esse ranking desde 2009, e mais da metade dos pesticidas usados foram banidos nos Estados Unidos e em países da união Europeia (FAOSTAT, 2017). Um dos fatores responsáveis pelo elevado emprego dos pesticidas é que mais de 90% desses são perdidos no meio ambiente ou não controlam efetivamente as pragas. As perdas são devidas, principalmente, ao vento, a umidade e a temperatura. Muitos pesticidas são sensíveis à radiação ultravioleta, sofrendo fotodegradação. E há ainda perdas devido a evaporação, lixiviação e atividade microbiana (Figura 1). Portanto, para obter a resposta biológica desejada em termos de controle de pragas dentro de um certo período, há uma aplicação repetida e descontrolada dos pesticidas, resultando em quantidades que ultrapassam a concentração máxima segura (NURUZZAMAN et al., 2016; MOGUL et al., 1996). Em decorrência disso, tem-se problemas ambientais como: redução da biodiversidade do solo e da fixação do nitrogênio; poluição da água e do ar, podendo se acumular em plantas e animais; perigos para saúde pública; aumento da resistência de pragas e patógenos e aumento do custo do tratamento (SANDHYA et al., 2017).

Em 2016 no Brasil foram registrados 4.208 casos de intoxicação por exposição a pesticidas, aproximadamente onze por dia, que culminaram na morte de 355 pessoas. O estado com os níveis mais altos de envenenamento é o Tocantins, de acordo com dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Entre 2013 e 2015 foram coletadas 9.680 amostras de alimentos como arroz, maçãs e pimentões, e cerca de 20% delas continham resíduos de pesticidas que excediam os níveis permitidos ou que continham pesticidas não aprovados. No final de julho de 2018, a Human Rights Watch divulgou um relatório intitulado “Você não

quer mais respirar pesticidas”, de 52 páginas, que documentava casos de intoxicação aguda causada por pesticidas dispersados pelo vento em áreas rurais do Brasil (MONGABAY, 2018).

Figura 1 - Causas das perdas e degradação dos pesticidas



Fonte: adaptado de NURUZZAMAN et al., (2016)

Todos os problemas citados anteriormente têm encorajado os pesquisadores a estudar novas maneiras de inibir o crescimento microbiano, pois apesar dos efeitos colaterais, o uso de pesticidas é imprescindível para proteger as culturas e maximizar a produtividade agrícola. Novas formulações que minimizam seu uso têm sido desenvolvidas: uma das tecnologias em ascensão usada nesse sentido, é através da encapsulação ou adsorção de pesticidas em micro ou nanopartículas à base de polímeros, lipídios, materiais inorgânicos porosos, dentre outros. Essas novas formulações apresentam vantagens como: maior solubilidade, liberação mais lenta e sem degradação prematura dos componentes (NURUZZAMAN et al., 2016; ROY et al., 2014; CAMPOS; DE OLIVEIRA; FRACETO, 2014; MOGUL et al., 1996; (DUHAN et al., 2017).

O Rio Grande do Norte (RN) apresenta duas situações distintas de produção agrícola: a fruticultura, que gera milhares de empregos direta e indiretamente; e a agricultura de sequeiros, uma atividade quase que exclusivamente destinada a subsistência e que depende unicamente das condições climáticas. Os principais produtos de sequeiros cultivados no estado são algodão, arroz, feijão, milho e sorgo (TRIBUNA DO NORTE, 2017). O estado do RN é o maior produtor de melão do Brasil, segundo maior produtor de castanha de caju, quarto maior produtor de mamão, quinto maior produtor de maracujá, sexto maior produtor de manga, oitavo maior produtor de coco-da-baía e nono maior produtor de banana do Brasil. Além desses, os produtos

que agregam maior valor na produção agrícola do RN são a cana-de-açúcar, a melancia, o abacaxi e a batata doce. Juntos, o melão, a banana e a cana-de-açúcar são responsáveis por aproximadamente 60% de toda a produção agrícola do estado (TRIBUNA DO NORTE, 2018). Nesse contexto, a fruticultura é de fundamental importância para a mesorregião do Oeste Potiguar do estado, em particular a produção de melão e mamão. Logo, a utilização de pesticidas para esse arranjo produtivo local é um fato importante, especialmente, o uso de fungicidas para a proteção dos frutos após a colheita, sendo o carbendazim um dos mais utilizados.

Essa dissertação terá como foco a síntese de partículas de CaCO_3 carreadoras de carbendazim obtidas pela técnica de microemulsão água em óleo, e caracterização das mesmas pelas técnicas de microscopia eletrônica de varredura, Espalhamento Raman e Infravermelho. Além disso, foram realizados estudos sobre a eficiência de encapsulação do pesticida, sua liberação e sobre a eficácia antifúngica das partículas. No capítulo seguinte são apresentados os objetivos; no capítulo 3 a fundamentação teórica, no capítulo 4 a metodologia, na sequência os resultados e discussões; e por fim, as conclusões.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

O presente trabalho tem como objetivo a síntese e caracterização de partículas inorgânicas de CaCO_3 para o carregamento do fungicida carbendazim, de modo a fornecer uma alternativa para a aplicação desse fungicida na agricultura, aumentando sua eficácia e reduzindo os danos ao meio ambiente e os riscos à saúde humana.

2.2 Objetivos Específicos

Entre os objetivos específicos tem-se:

- Sintetizar partículas de carbonato de cálcio contendo o fungicida carbendazim;
- Caracterizar as partículas por microscopia eletrônica, espalhamento Raman e espectroscopia na região do Infravermelho;
- Determinar a eficiência de encapsulação do carbendazim nas partículas;
- Avaliar o perfil de liberação *in vitro* do carbendazim associado a partícula;
- Avaliar o efeito das formulações sobre o crescimento fúngico da *Macrophomina pseudophaseolina*.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Nesse capítulo são apresentados os diversos conceitos abordados nesse trabalho, bem como as técnicas e ensaios realizados.

3.1. Fungicidas: o papel do carbendazim

Os fungicidas são agentes usados para prevenir ou erradicar infecções fúngicas de plantas ou sementes. São classificados de acordo com sua estrutura química ou pelo modo de ação. Desde a década de 60, uma grande variedade de fungicidas sintéticos têm sido usados na agricultura para reduzir as perdas na colheita. Nessa década foram introduzidos os fungicidas da classe dos benzimidazóis: fungicidas sistêmicos (absorvidos e transferidos para todas as partes das plantas), e de amplo espectro de ação. O fungicida carbendazim (MBC) (Tabela 1) é um sólido cristalino branco pertencente a classe dos benzimidazóis com ação protetiva e curativa (KOLI et al., 2015).

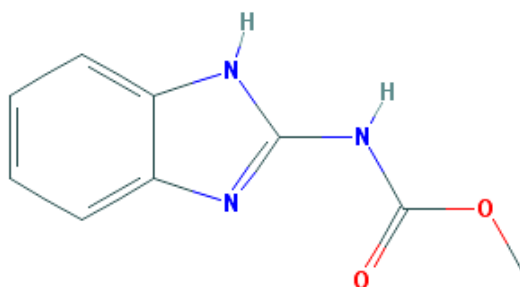
Tabela 1 - Propriedades do Carbendazim

Nome Comum	Carbendazim, MBC
Nome IUPAC	Metil-2-benzimidazol-carbamato
Fórmula Química	$C_9H_9N_3O_2$
Peso Molecular	191,19 g/mol
Solubilidade em água a 24°C	29 mg/L (pH 4) 8 mg/L (pH 7)
Densidade	270 kg/m ³

Fonte: PubChem (2017)

O carbendazim (Figura 2) é obtido como produto primário da degradação do Benomil e do Tiofanato metílico, sendo a substância ativa desses dois compostos. O MBC se funde a aproximadamente 250 °C. É estável sob condições ácidas e neutras, pH entre 5 e 7. Se decompõe a 2-aminobenzimidazol apenas em condições básicas (pH = 9,0). Possui baixa solubilidade em água, sendo aumentada em condições ácidas (pH em torno de 4). O modo de ação do carbendazim é pela inibição da mitose, afetando a divisão celular e nuclear; resultando na morte das células. O MBC se degrada no solo devido a hidrólise química, sob condições alcalinas, e a atividade microbiana (ROBERTS; HUTSON, 1999).

Figura 2 - Estrutura química do carbendazim



Fonte: PubChem (2017)

A exposição primária ao carbendazim para a população se dá através de resíduos alimentares. A dose diária admissível (IDA) recomendada para o carbendazim é de 0,01 mg/kg de peso corporal, porém estima-se que a ingestão média seja de um décimo da dose admissível. O carbendazim é bem absorvido (80-85%) após a exposição oral, mas muito menos pela exposição dérmica, de maneira que é pouco provável que cause efeitos de toxicidade sistêmica em humanos. Estas conclusões são baseadas em ensaios *in vivo* e *in vitro* em animais. Os dados sobre os efeitos do carbendazim à saúde humana são limitados, mas são feitas extrapolações baseadas no modo de ação do fungicida (WHO, 1993).

Devido a sua toxicidade, o carbendazim tem sido proibido em países como Austrália e em vários países da União Europeia (SINGH et al., 2016). Todos os pesticidas vendidos ou distribuídos nos Estados Unidos devem ser registrados pela Environmental Protection Agency (EPA) e fiscalizados pela FDA (Food and Drug Administration). Segundo os critérios da EPA, o carbendazim é um fungicida de classe toxicológica III para toxicidade dérmica aguda e irritação primária dos olhos, categoria IV para toxicidade aguda oral e por inalação, e também para irritação primária da pele. O fígado, a tireoide e os testículos são órgãos-alvo do

carbendazim. É classificado como um possível carcinogênico humano baseado em tumores hepatocelulares em camundongos fêmeas e também foi associado com efeitos reprodutivos adversos em ratos. Porém, o risco de câncer associado à ingestão de alimentos com resíduos de carbendazim, está abaixo do nível de preocupação da EPA (USEPA, 2005). Segundo a classificação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o carbendazim é um fungicida de classe toxicológica III, considerado de toxicidade média (ANVISA, 2007).

O carbendazim é aplicado contra fungos que afetam frutas, vegetais e cereais como feijão, soja e trigo; além de plantas ornamentais e ervas medicinais. É persistente no meio ambiente: o composto pode ser detectado por até 3 anos, o que o torna um composto quimicamente estável (FANG et al., 2010; WHO, 1993; GE et al., 2012).

3.2. Fungo *Macrophomina pseudophaseolina*

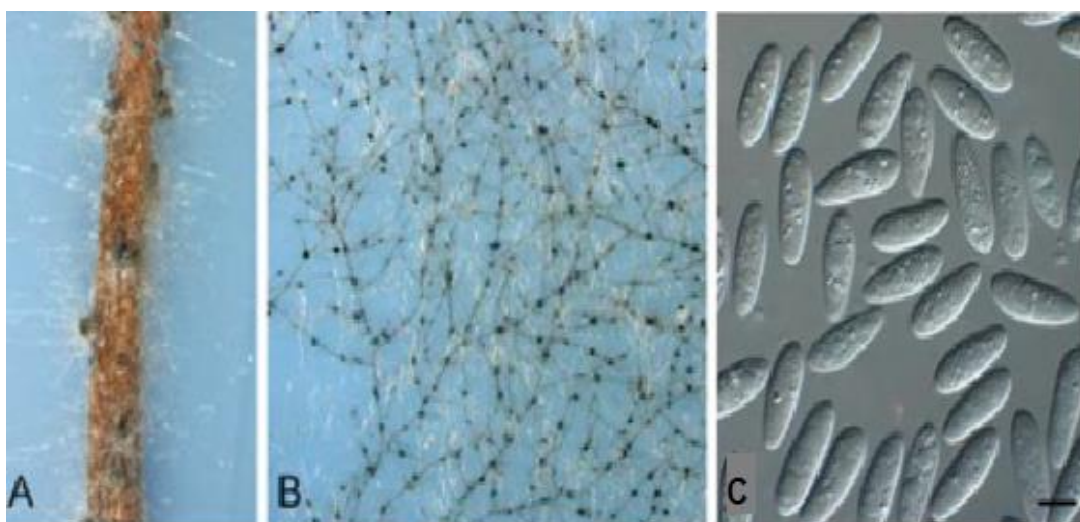
Pertencente ao filo Ascomycota, família Botryosphaeriaceae, a *Macrophomina phaseolina* é o principal representante do gênero *Macrophomina* (MYCOBANK, 2013). A *Macrophomina* é um agente patogênico que pode infectar mais de 500 espécies vegetais tais como milho, soja, amendoim, algodão, feijão-comum, feijão-caupi e girassol. A ocorrência desse patógeno no Brasil foi relatada pela primeira vez em 1935, em raízes de feijão-comum. Durante o processo de infecção podem ser observados lesões escuras, porém não profundas; murcha, queima das folhas, entre outros (GUPTA et al., 2012; ALMEIDA et al., 2014).

É o agente causador da podridão do carvão ou podridão cinzenta do caule, que acomete não somente o caule, como folhas, raízes, hastes e sementes. Os sintomas variam de acordo com a idade da planta quando esta é infectada. Alguns fatores facilitam o desenvolvimento do fungo: altas temperaturas (acima de 30 °C), que causam déficit hídrico; e compactação do solo, onde as raízes não podem se aprofundar (GUPTA et al., 2012). Por isso, embora o fungo tenha uma distribuição mundial, é considerado como economicamente mais importante em regiões subtropicais e países tropicais com climas semiáridos (SARR et al., 2014).

Recentemente, no ano de 2014, pesquisadores avaliaram a variação genética de isolados de *Macrophomina phaseolina*: foram utilizados isolados de 23 hospedeiros, retirados de 30 amostras de solo que foram recolhidas de 15 países. Baseado em análises de DNA, descreveram

uma nova espécie: a *Macrophomina pseudophaseolina*, a segunda espécie do gênero. Ambas espécies são muito semelhantes no que se refere a morfologia, distribuição e hospedeiros. A *Macrophomina* produz microesclerócios e picnídios (Figura 3). Os picnídios da *M. pseudophaseolina* têm cor castanho escuro ou preta e medem até 300 µm de diâmetro. Os picnídios são estruturas assexuadas onde são produzidos os conídios, o modo mais comum de reprodução assexuada. Seus conídios medem de 19-27 µm x 7,5-9,0 µm, sendo elipsoides ou ovoides. Seus microesclerócios são pretos e medem de 100-400 µm de diâmetro. Microesclerócios são uma estrutura multicelular produzida a partir do micélio, resistente a condições adversas (SARR et al., 2014).

Figura 3 - *Macrophomina pseudophaseolina*: A. Picnídios. B. Esclerócios. C. Macroconídios



Fonte: SARR et al., (2014)

Uma característica essencial e distintiva da *M. phaseolina* é a sua ampla capacidade de adaptação a ambientes estressantes. O crescimento do fungo no solo é alimentado por nutrientes armazenados nos microesclerócios. Dessa maneira, mesmo quando os níveis de nutrientes são insuficientes, o crescimento continua. No que se refere a práticas culturais, para reduzir a infecção é necessário realizar a rotação com culturas não hospedeiras, promover irrigação, aplicar micronutrientes, fazer uso de adubos orgânicos, etc. Para realizar o controle químico, que diminui a viabilidade do microesclerócio no solo, são usados pesticidas como o benomil, tiofanato metílico, thiram, tiabendazol e carbendazim. Controlar esse patógeno é bastante difícil, pois este apresenta considerável variabilidade morfológica, patogênica e genética, fazendo com que se adapte e ataque hospedeiros suscetíveis. Além desses fatores, os microesclerócios agem como principal fonte do inóculo e podem sobreviver no solo ou em

restos de cultura por até 15 anos (GUPTA et al., 2012; MARTÍNEZ-VILLARREAL et al., 2016).

3.3. Liberação controlada

Nas últimas décadas tem-se voltado a atenção para liberação de fármacos através de micro ou nanopartículas usadas para: modificar propriedades dos medicamentos (JEONG et al., 2008; PREGO et al., 2006), aumentar a biodisponibilidade e a biodistribuição do fármaco (CALVO; VILA-JATO; ALONSO, 1997) e aumentar efeitos terapêuticos (PREGO et al., 2006; SCHAFFAZICK et al., 2008). A droga é dissolvida, presa, encapsulada ou ligada às partículas. O material encapsulado é comumente referido como fase interna e o material de encapsulação é conhecido como fase externa, revestimento ou membrana. Esse sistema promove uma entrega direcionada, com menor toxicidade e menos efeitos colaterais (JAHANGIRI et al., 2014). As partículas são produzidas a partir de uma substância biocompatível, seja ela orgânica ou inorgânica, polímeros, lipídios, argilas ou uma combinação destes (JAHANGIRI et al., 2014). A seleção do tipo de material depende do tamanho desejado das partículas e de propriedades como: solubilidade, estabilidade, permeabilidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, toxicidade e perfil de liberação da substância ativa (MOHANRAJ; CHEN, 2006).

As aplicações dessa tecnologia de encapsulamento em cenários agrícolas incluem tratamento de sementes, germinação, crescimento e desenvolvimento de plantas, controle de pragas, entrega de pesticidas, de fertilizantes, detecção de agroquímicos tóxicos e patógenos (NURUZZAMAN et al., 2016). A entrega controlada de pesticidas está em crescente ascensão: síntese de micropartículas para liberação controlada de tebuconazol (ASRAR et al., 2004); síntese de nanopolímeros para liberação controlada de azadiractina-A (KUMAR et al., 2010); uso de copolímeros para liberação controlada de carbofuran (SHAKIL et al., 2010); síntese de nanopartículas de carbonato de cálcio para liberação controlada de valinomicina (QIAN et al., 2011); uso de polímeros para liberação controlada de imidacloprid (ADAK et al., 2012); desenvolvimento de nanoformulações de β -ciflutrina contra *Callosobruchus maculatus* (LOHA et al., 2012); uso de polímeros para liberação controlada de thiram (KAUSHIK et al., 2013); síntese de nanopartículas de alginato de sódio carregadas com pesticida (KUMAR et al., 2014); uso de polímeros para liberação controlada de nanopartículas de carbendazim (KOLI et al.,

2015); síntese de nanopartículas de quitosana e pectina para liberação controlada do carbendazim (SANDHYA et al., 2017).

Nas formulações convencionais os ingredientes ativos são imediatamente liberados após a aplicação, sendo necessário repeti-las para manter o período de disponibilidade ideal preciso para o controle efetivo das pragas (NURUZZAMAN et al., 2016). Na liberação controlada apenas parte do ativo está imediatamente disponível, a maior fração está encapsulada ou adsorvida em uma matriz inerte, sendo a liberação lenta e prolongada (CAMPOS et al., 2015). Essa formulação proporciona vantagens como uso de doses menores de agente ativo, menor número de aplicações, menores perdas por evaporação e degradação, maior estabilidade e solubilidade do pesticida, concentração dos agentes terapêuticos nos locais alvo, menor toxicidade e menor contaminação ambiental (KOLI et al., 2015). Na aplicação convencional a dosagem inicial parte de uma elevada concentração que rapidamente diminui a um nível abaixo do efetivo, enquanto que na aplicação controlada mantém uma concentração praticamente constante de ativo por um longo período de tempo (ROY et al., 2014). Porém, são necessários mais estudos para produzir uma partícula de pesticida estável e ter o controle na distribuição de tamanho dessas partículas (QIAN et al., 2011). Dentre os diversos materiais, o carbonato de cálcio tem-se mostrado um candidato relevante.

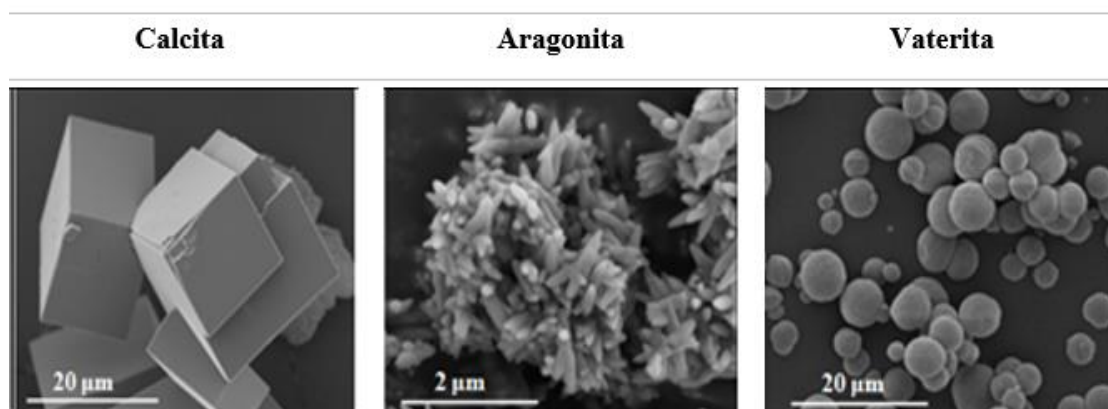
3.4. Carbonato de cálcio

O carbonato de cálcio é um dos biominerais inorgânicos mais conhecidos e abundantes (GHADAM, 2013). Tem inúmeras aplicações como em: tintas, plásticos, borracha, fabricação de aço e papel (YU et al., 2007; TAI; CHEN, 2008). Possui baixo custo, biocompatibilidade e baixa toxicidade, por isso é muito empregado em produtos farmacêuticos (DONATAN et al., 2016; PARAKHONSKIY et al., 2015).

Há três polimorfos cristalinos de carbonato de cálcio: calcita, aragonita e vaterita. Calcita é a forma mais estável termodinamicamente, e por isso a mais usada em aplicações industriais. As demais fases são metaestáveis. A calcita é o principal constituinte das rochas calcárias sedimentares e tem uma estrutura cristalina romboédrica. A vaterita possui grande porosidade e área superficial. Tem a forma hexagonal e é encontrada em fontes minerais e tecidos orgânicos (DIZAJ et al., 2015). Em meio aquoso, por algumas horas, a vaterita se

dissolve e recristaliza na forma de calcita (KIRBOGA; ONER, 2013). A aragonita tem forma ortorrômbica e é encontrada nas partes esqueléticas de organismos calcários e nos subprodutos de algumas bactérias desnitrificantes (SALOMÃO; COSTA; OLYVEIRA, 2017). A Figura abaixo ilustra as diferentes formas do CaCO_3 :

Figura 4 - Polimorfos do CaCO_3



Fonte: adaptado de SALOMÃO; COSTA; OLYVEIRA, (2017)

A literatura aponta diferentes técnicas para a síntese de partículas de carbonato de cálcio como: precipitação (RITIKA GUPTA, 2004), emulsão (GEORGIEVA et al., 2011), sínteses mecanoquímicas e sonoquímicas (HASSAN et al., 2010), e homogeneização de alta pressão (SHAFIU KAMBA et al., 2013). No caso dos métodos de precipitação há duas rotas conhecidas: processo de carbonatação, onde se borbulha dióxido de carbono em uma suspensão aquosa de hidróxido de cálcio; e a dupla decomposição, que envolve sais contendo íons (BABOU-KAMMOE et al., 2012). Os sais precursores na síntese de partículas de CaCO_3 contendo íons cálcio e carbonato são obtidos nas reações entre CaCl_2 e Na_2CO_3 , CaCl_2 e NH_4CO_3 ou $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e Na_2CO_3 (KAMBA et al., 2013). Dentre os parâmetros que controlam a morfologia, a cristalinidade, a porosidade e a eficiência de encapsulação de partículas de carbonato de cálcio destacam-se as concentrações dos reagentes, a solubilidade dos sais, a velocidade de agitação e o tempo de reação.

Partículas obtidas a partir desse carbonato retém medicamentos e pesticidas por mais tempo devido a lenta degradação de suas matrizes e sua porosidade, garantindo maior efetividade na encapsulação (POELVOORDE, 2017). O carreamento de benzonidazol em nanopartículas de carbonato de cálcio promove menor toxicidade e maior seletividade ao *Trypanosoma cruzi* utilizando até vinte e cinco vezes menos fármaco (TESSAROLO et al.,

2018; BEZERRA; 2014). Já foi usado como carreador de insulina (Haruta et al. 2003), valinomicina (QIAN et al., 2011) e cloridrato de ciprofloxacina (DIZAJ et al., 2017). Mesmo em meio aquoso, não há mudanças na porosidade desse material. (DIZAJ et al., 2015).

3.5. Espectrofotometria UV/Vis

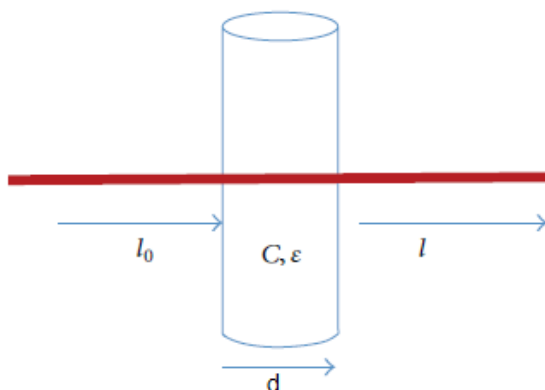
A espectroscopia é o estudo da absorção e da emissão de radiações pela matéria, em função do comprimento de onda da radiação. Absorção é definida como o processo pelo qual a intensidade de um feixe de luz é diminuída porque as moléculas na amostra passam por uma transição do estado fundamental para um estado excitado (MÄNTELE; DENIZ, 2017).

A espectrofotometria UV/Vis é uma poderosa ferramenta de caracterização não destrutiva que analisa soluções que absorvem radiação na região do ultravioleta (entre 200 e 400 nm no espectro eletromagnético), e na região do visível (entre 400 e 700 nm). O espectro de absorção registra dados da absorbância em função do comprimento de onda. Cada espectro de um dado composto tem picos com alturas características que formarão a base de uma caracterização quantitativa dos compostos constituintes. A quantidade de radiação absorvida por uma solução é uma função da concentração da solução e da distância pela qual a radiação passa. Na prática, o que é medido é a quantidade de radiação transmitida, que é expressa como a transmitância (NJUGUNA; VANLI; LIANG, 2015). A lei fundamental que rege a análise espectrofotométrica quantitativa é a lei de Beer-Lambert:

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (1)$$

onde A é a absorbância, T é a transmitância, I_0 é a intensidade da radiação incidente, I é a intensidade da radiação transmitida, ε é o coeficiente de absorção molar (em $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$), c é a concentração (em mol/L) e d (em cm) é o comprimento do percurso da radiação na amostra. A Figura 5 mostra os parâmetros da equação

Figura 5 - Parâmetros da equação de Beer-Lambert



Fonte: NJUGUNA; VANLI; LIANG (2015)

Existem condições fundamentais para que a aplicação da lei de Beer-Lambert seja válida: feixe de luz estritamente monocromático, distribuição homogênea das moléculas na amostra, passagem completa do feixe de luz pela amostra, ausência de dispersão de luz e de reações fotoquímicas na amostra, sem reemissão da luz absorvida por fluorescência e valores máximos de absorbância de até 1,5 (MÄNTELE; DENIZ, 2017). Em soluções muito concentradas, devido à proximidade entre as moléculas de soluto, umas influenciam as outras, o que pode variar o valor do coeficiente de absorção.

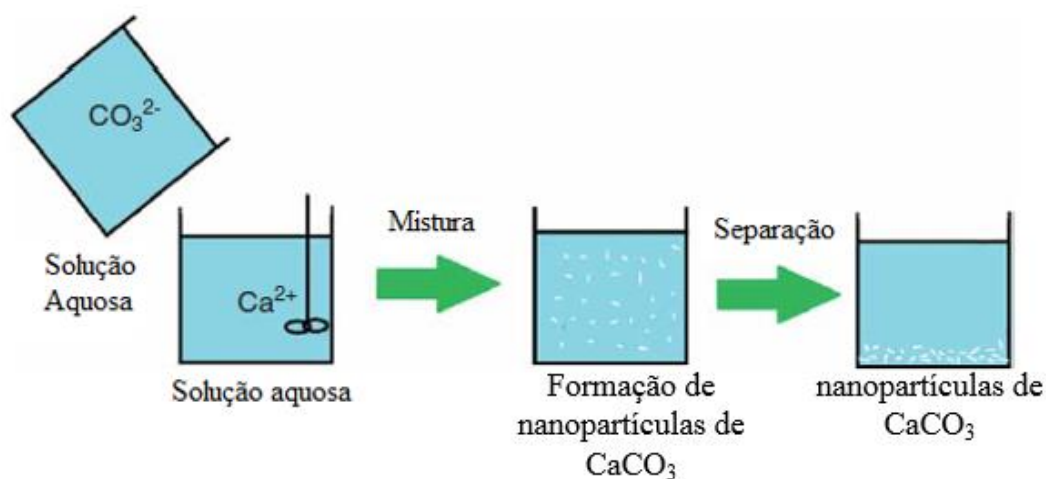
Para se obter informações quantitativas sobre um composto é necessário inicialmente calibrar o instrumento utilizando soluções com concentrações conhecidas do composto em questão com o mesmo solvente que a amostra desconhecida. Para fazer uma curva de calibração, o ideal é que seja usado no mínimo cinco concentrações do composto. As soluções de calibração devem ser feitas com a maior precisão possível. Soluções que absorvem na região do ultravioleta devem ser dispostas em cubetas de quartzo. Na região do visível podem ser usadas cubetas de vidro (GANDHIMATHI; VIJAYARAJ; JYOTHIRMAIE, 2012).

3.6. Métodos de preparação de partículas de CaCO_3

Nessa seção são descritas as principais técnicas de preparação de partículas de carbonato de cálcio. A literatura destaca métodos de precipitação química, homogeneização de alta pressão e técnicas de emulsão.

A precipitação química é a maneira mais fácil de preparar partículas de CaCO_3 . Nesse método as partículas são formadas pela reação entre íons cálcio e íons carbonato presentes em soluções aquosas (Figura 6). Posteriormente, é feita a separação das partículas presentes na solução usando uma centrífuga, por exemplo (DIZAJ et al., 2015).

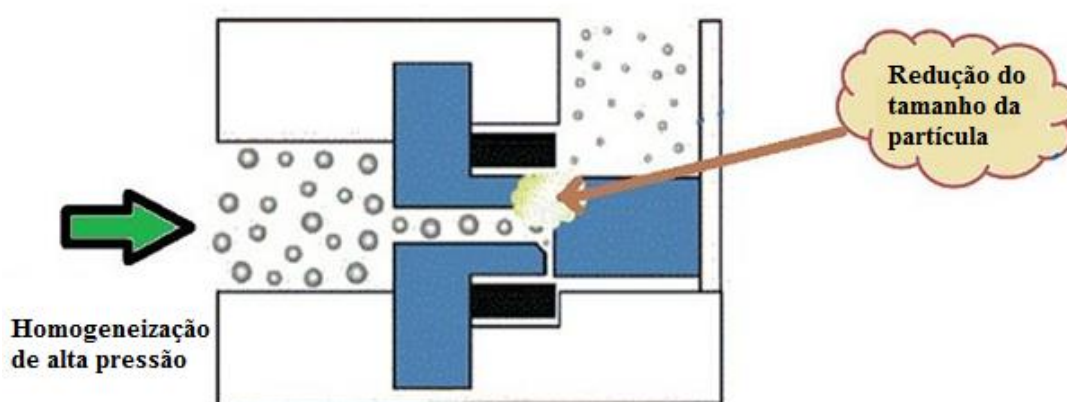
Figura 6 - Precipitação química



Fonte: adaptado de DIZAJ et al., (2015)

Na técnica de homogeneização de alta pressão o tamanho das partículas é reduzido por cavitações e colisões provocadas por um homogeneizador de alta pressão (HPG), como ilustrado pela Figura 7.

Figura 7 - Método HPG



Fonte: adaptado de DIZAJ et al., (2015)

Adicionalmente, as técnicas de emulsão têm destaque desde sua descoberta, tanto no campo da pesquisa, como em diferentes campos industriais. São métodos de preparação versáteis que permitem controlar várias propriedades das partículas como tamanho, morfologia e homogeneidade (MALIK; WANI; HASHIM, 2012).

Emulsões são dispersões coloidais compostas por dois líquidos imiscíveis, água e óleo, e um surfactante (MCCLEMENTS, 2012). Surfactante ou tensoativo é uma molécula que apresenta uma parte com característica apolar (cauda) ligada a uma outra parte com característica polar (cabeça). O surfactante diminui a tensão interfacial entre as duas fases imiscíveis, óleo e água, e adsorve na interface para estabilizar as emulsões (VAIDYA; GANGULI, 2018). Os dois tipos mais comuns de dispersão coloidal que podem ser criados a partir de água, óleo e surfactante, são *microemulsões* e *nanoemulsões*. Além da terminologia em si, esses dois sistemas são basicamente diferentes em termos de estabilidade termodinâmica (MCCLEMENTS, 2012).

Nanoemulsões, também chamadas miniemulsões, são sistemas heterofásicos compostos por partículas com diâmetro de aproximadamente 100 nm. Por não serem termodinamicamente estáveis, se separam nas fases constituintes. Uma maneira de controlar esse tamanho é a partir da quantidade de surfactante introduzido no sistema. As nanoemulsões são preparadas a partir de métodos que envolvem alta energia como microfluidizadores ou homogeneização de alta pressão, o que dificulta a ampliação para produção comercial (MUÑOZ-ESPÍ; WEISS; LANDFESTER, 2012). As nanoemulsões são frequentemente transparentes, mas utilizando uma quantidade muito limitada de água geram-se nanoemulsões opacas e leitosas (ANTON; VANDAMME, 2011; GUPTA et al., 2016).

O termo microemulsão foi proposto por SCHULMAN et al (1959). Em seu experimento, foi preparada uma solução de água, benzeno, hexanol e oleato de potássio; homogênea e ligeiramente opalescente. Ao adicionar um álcool de cadeia curta, tornou-se clara. Entre 1943 e 1965 Schulman e seus colaboradores descreveram como preparar esse sistema, que em sua maioria tinha quatro componentes: hidrocarbonetos (geralmente a fase oleosa), surfactantes, co-surfactantes (geralmente um álcool contendo de 4 a 8 átomos de carbono) e uma fase aquosa. Quando os surfactantes eram usados corretamente, o resultado poderia ser um sistema com baixa viscosidade, transparente e muito estável. Esses sistemas eram chamados de dispersões transparentes de água e óleo, hidromicelos ou oleomicelos. Apenas em 1959 Schulman propôs chamá-los de microemulsões (MALIK; WANI; HASHIM, 2012).

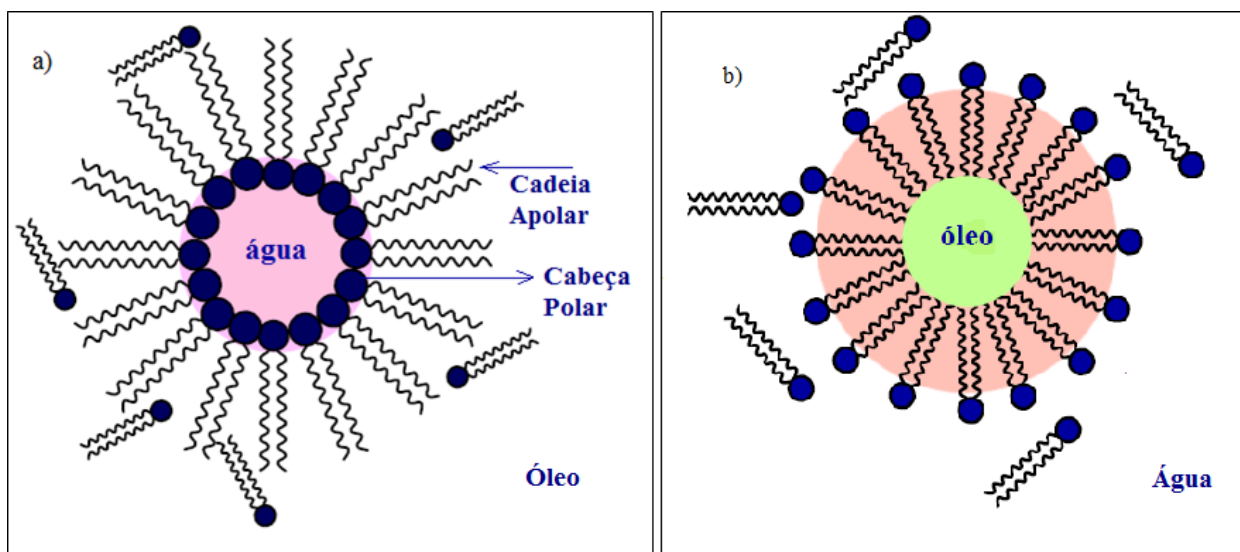
Microemulsões são termodinamicamente estáveis, opticamente transparentes, dispersões de dois líquidos imiscíveis, estabilizadas por moléculas de surfactante (CHO et al., 2008; SONG; KIM, 2000). Uma microemulsão por ser termodinamicamente estável, deve formar-se espontaneamente quando os componentes são misturados. Porém, na prática, uma microemulsão pode não se formar espontaneamente devido à presença de barreiras de energia cinética e/ou processos lentos de transporte de massa. Dessa maneira, pode ser necessário agitar mecanicamente ou aquecer o sistema (MCCLEMENTS, 2012). As microemulsões contém uma concentração de surfactante de cerca de 20%, em oposição às nanoemulsões, onde esse teor varia de 5-10% (KAH et al., 2013).

Uma das razões para a confusão entre os dois tipos de emulsão é devido aos prefixos usados para denotá-las: “micro” geralmente significa uma ordem de grandeza de 10^{-6} , enquanto que o termo “nano” geralmente significa uma ordem de 10^{-9} , o que implicaria que nanoemulsões são formadas por partículas menores do que as microemulsões. Porém, geralmente acontece o oposto. Isso porque o termo “microemulsão” tornou-se bem estabelecido entre pesquisadores bem antes do termo “nanoemulsão” ser introduzido. O primeiro artigo publicado que usou o termo “microemulsão” surgiu em 1961, enquanto o primeiro artigo usando o termo “nanoemulsão” apareceu em 1996. O termo “nanoemulsão” só se tornou popular nos últimos anos, o que em parte se deve ao crescente interesse no campo da nanotecnologia. Há muita discordância sobre o tamanho das partículas que distinguiria os tipos de emulsão (MCCLEMENTS, 2012).

Dependendo dos líquidos e surfactantes usados as emulsões podem ser de dois tipos:

- Emulsões água em óleo (W/O): também chamadas emulsões reversas, compostas por gotas de água dispersas em uma fase oleosa de hidrocarbonetos (Fig. 8a);
- Emulsões óleo em água (O/W): também chamadas emulsões diretas, compostas por gotas de óleo dispersas em uma fase aquosa (Fig. 8b).

Figura 8 - Principais tipos de emulsões: (a) água em óleo e (b) óleo em água.

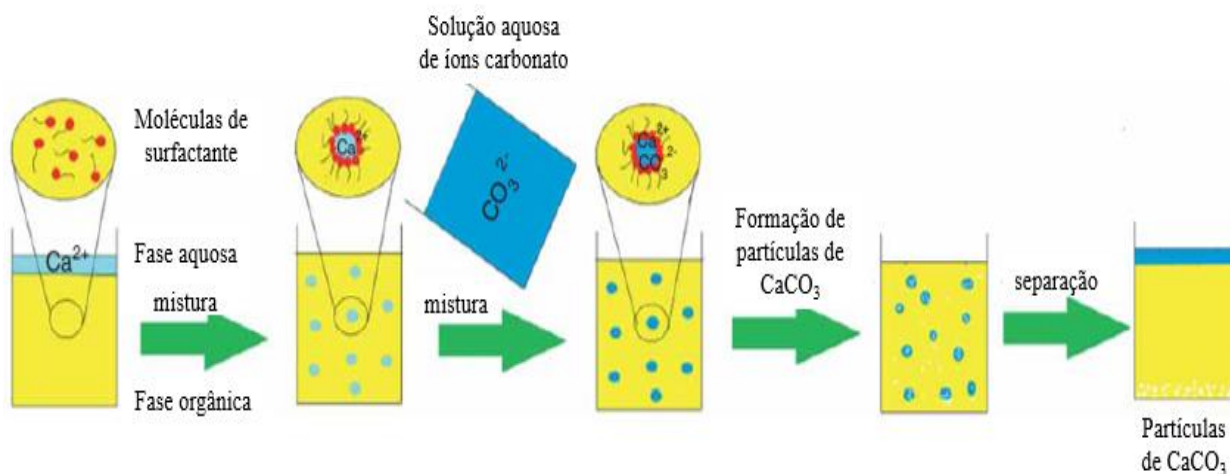


Fonte: adaptado de MALIK; WANI; HASHIM, (2012)

3.6.1 Microemulsão água em óleo

É um tipo controlado de reação de precipitação. Inicialmente há uma fase aquosa contendo íons cálcio que é misturada a uma fase orgânica para produzir a microemulsão. Em seguida, sob agitação, é adicionada uma solução aquosa contendo íons carbonato para formação das partículas de CaCO_3 , que serão posteriormente separadas do meio aquoso com o uso de uma centrífuga (DIZAJ et al., 2015). A Figura abaixo ilustra esse processo:

Figura 9 - Microemulsão W/O



Fonte: adaptado de DIZAJ et al., (2015)

3.7. Microscopia eletrônica de varredura

Uma das técnicas de caracterização mais utilizadas nas ciências e engenharia de materiais é a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Tem sido uma ferramenta poderosa e relativamente rápida para caracterização morfológica de partículas. O MEV é aplicado em uma ampla gama de ciências físicas e biológicas, engenharia, tecnologia e investigações forenses (NEWBURY; RITCHIE, 2013).

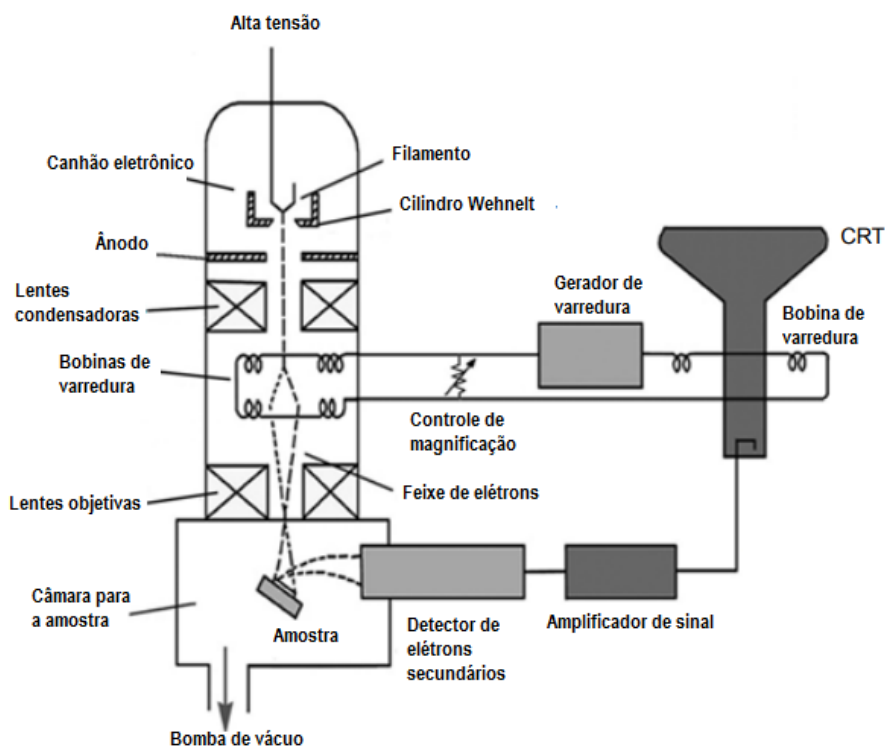
Na microscopia eletrônica de varredura, um feixe de elétrons com energias tipicamente acima de 40 keV, é focado em um espécime e faz sua varredura ao longo de linhas paralelas. Como resultado do impacto dos elétrons incidentes, vários sinais são gerados e coletados para formar uma imagem ampliada e com aparência tridimensional (devido a elevada profundidade de campo), ou para analisar a superfície de uma amostra (BOGNER et al., 2007; KOGURE, 2013). Há emissão de sinais sob a forma de elétrons, como elétrons secundários e elétrons retroespalhados; e de fótons, como os raios-x característicos. Após o impacto do feixe incidente com os átomos, ocorrem dois eventos: espalhamento elástico, uma mudança na direção do elétron sem perda de energia perceptível; e espalhamento inelástico, uma perda de energia sem mudança perceptível na direção (SCIMECA et al., 2018).

Os elétrons secundários são elétrons de baixa energia (< 50 eV), resultado de uma colisão inelástica entre os elétrons primários e os elétrons da amostra. São responsáveis pela obtenção de

imagens de alta resolução e fornecem as informações sobre a morfologia. Os elétrons retroespalhados são oriundos de colisões elásticas e fornecem uma imagem característica de variação de composição. A área de elementos químicos com números atômicos mais elevados parece ser mais clara, pois esses elementos produzem um maior número de elétrons retroespalhados; o que recebe o nome de contraste de fase (ERIC, 2017).

Um microscópio é constituído por um canhão eletrônico, uma coluna, um detector de elétrons secundários, um detector de elétrons retroespalhados e uma câmara para a amostra (Figura 10). O canhão eletrônico atua como uma fonte de elétrons a partir de um emissor de elétrons termiônico: geralmente filamentos de tungstênio ou de hexaboreto de lantânio. O termo emissor termiônico indica que a emissão de elétrons começa pelo aquecimento. Há também um cilindro de Wehnelt (cátodo) que direciona e controla o número de elétrons emitidos. Os elétrons direcionados movem-se para o ânodo e alcançam a coluna. A coluna contém um sistema de lentes, condensadoras e objetivas, que reduz a projeção inicial do feixe de elétrons. Acima das lentes objetivas, há bobinas de varredura que varrem o feixe para frente e para trás na amostra, linha por linha. Na coluna é necessário que haja vácuo para que os elétrons emitidos não reajam com partículas de ar (ERIC, 2017).

Figura 10 - Diagrama esquemático de um MEV



Fonte: adaptado de KOGURE (2013)

3.8. Espectroscopia vibracional

A espectroscopia vibracional está relacionada com as transições devido à absorção ou emissão de radiação eletromagnética. Engloba a espectroscopia de absorção no Infravermelho e a espectroscopia de espalhamento Raman. Ambos os métodos permitem extrair informações sobre a natureza química de um material.

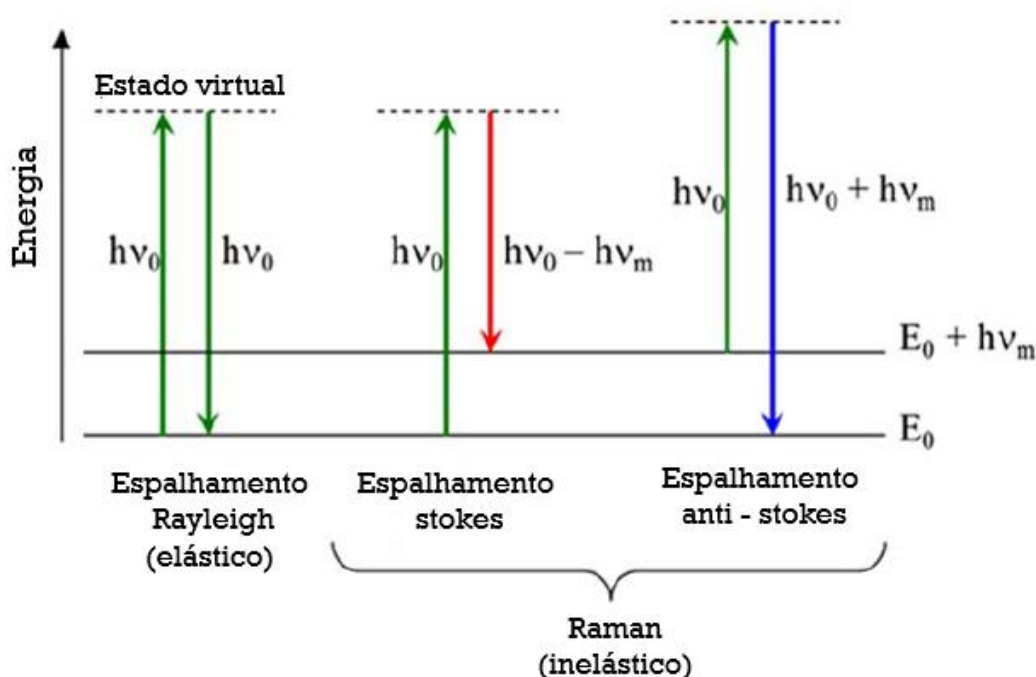
3.8.1 Espalhamento Raman

O espalhamento Raman é um ramo da espectroscopia vibracional que fornece informações moleculares, estruturais e eletrônicas, permitindo a identificação de componentes orgânicos e inorgânicos (CARDELL; GUERRA, 2016).

O espalhamento Raman foi descoberto em 1928 por C.V. Raman e seu aluno Krishnan. Mais tarde foi percebido que as mudanças de frequência correspondiam precisamente às diferenças nos níveis de energia vibracional. A espectroscopia Raman fornece as impressões digitais de cada molécula com base em suas características vibracionais únicas, pois diferentes grupos funcionais possuem diferentes energias vibracionais. Assim, cada molécula teria seu perfil espectral Raman (PANG; YANG; HE, 2016). A espectroscopia Raman é uma técnica baseada no espalhamento inelástico da radiação na região do visível ou próxima do infravermelho da amostra. As moléculas da amostra são excitadas para modos vibracionais mais altos pelos fótons incidentes do feixe de laser. A maioria desses fótons incidentes é espalhada elasticamente – espalhamento Rayleigh. Apenas uma pequena fração dos fótons incidentes, da ordem de 1 em 10 milhões, é espalhada inelasticamente - espalhamento Raman (GARCÍA-BETANCOURT; RAHIER; VAN ASSCHE, 2018).

No espalhamento Raman, os fótons incidentes do feixe de laser excitam uma molécula do estado fundamental para um estado de energia virtual. Devido às diferenças de energia entre o estado original e o novo, o comprimento de onda do fóton emitido sofre um desvio, provocando a dispersão da luz (GALA; CHAUHAN, 2015). O espalhamento inelástico de luz pode resultar tanto em um fóton de menor energia que o original – região de Stokes, quanto em um fóton de maior energia – região anti-Stokes (Figura 11) (ROSTRON et al., 2016).

Figura 11 - Diferentes possibilidades do espalhamento da luz



Fonte: adaptado de GARCÍA-BETANCOURT; RAHIER; VAN ASSCHE (2018)

Na espectroscopia Raman não é necessário preparar a amostra, por isso comparado a técnicas que exigem dissolução de sólidos, peletização, compressão e assim por diante, é mais fácil de ser usada. Além disso, é uma técnica não destrutiva, o que é muito útil ao analisar materiais caros. Um espectro Raman representa a intensidade da luz (unidade arbitrária) versus a mudança de frequência da luz (números de onda). Alguns grupos fornecem fortes sinais Raman, como $\nu(\text{C-Cl})$, com um sinal na região de $550 - 800 \text{ cm}^{-1}$, e $\nu(\text{C} = \text{S})$, com um sinal na região de $1000 - 1250 \text{ cm}^{-1}$. Certos grupos polares, como $\nu(\text{O-H})$, fornecem um sinal Raman fraco, mas um sinal infravermelho forte. A largura de um pico no espectro, por exemplo, representa a qualidade dos cristais da amostra. Já a intensidade do pico Raman denota a quantidade de amostra (GALA; CHAUHAN, 2015).

3.8.2 Infravermelho

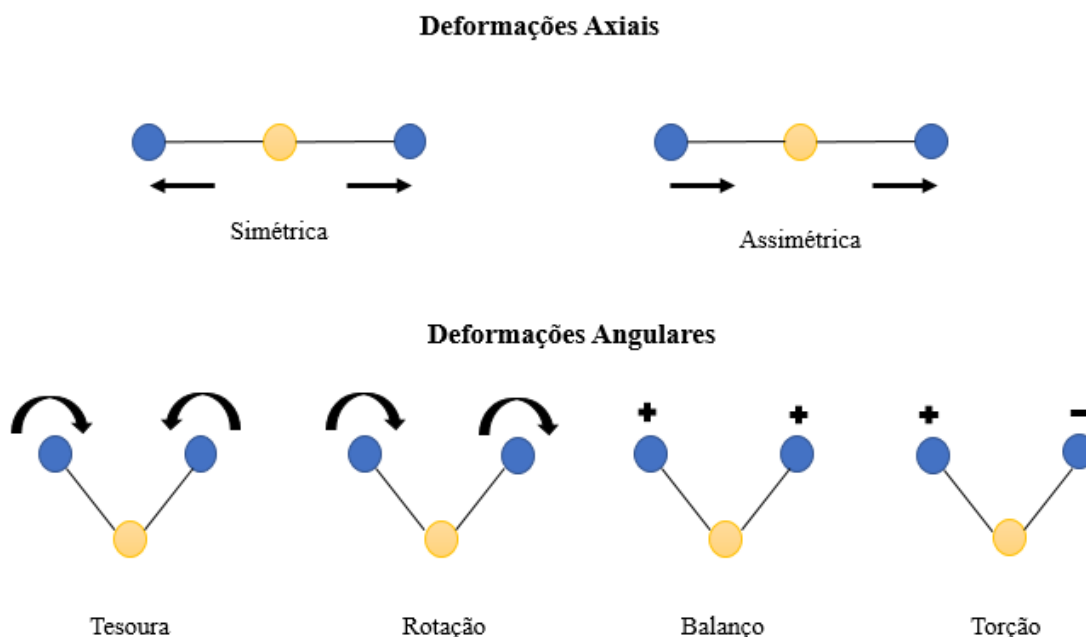
A espectroscopia no infravermelho é uma técnica usada para determinar a presença de grupos funcionais ou ligações ativas no infravermelho em amostras orgânicas ou inorgânicas,

na forma cristalina ou amorfa. É comumente usada para detectar bandas espectrais características que revelam moléculas ligadas à superfície de partículas. A espectroscopia no infravermelho é um fenômeno de absorção/transmissão: quando a radiação passa através de uma amostra, essa absorve a radiação em comprimentos de onda específicos. Assim, permite a identificação da natureza dos tipos de ligações. A preparação da amostra geralmente envolve a moagem da amostra sólida e dispersão em materiais como o NaCl, KBr ou CaF₂ (GARCÍA-BETANCOURT; RAHIER; VAN ASSCHE, 2018; SINGH; MAJIK; TILVI, 2014).

O astrônomo inglês William Herschel descobriu a radiação infravermelha em 1800 como sendo uma região discreta do espectro eletromagnético. Porém, devido a indisponibilidade de detectores de radiação IR (infravermelho) adequados e ao elevado valor dos elementos ópticos, o campo da espectroscopia IR permaneceu pouco explorado por muitas décadas. Abney e Festing, em 1882, obtiveram os espectros de absorção de cerca de cinquenta compostos e identificaram que as bandas de absorção são características de certos grupos funcionais orgânicos. Em 1905, Coblentz publicou um trabalho que continha centenas de espectros de substâncias orgânicas e inorgânicas, servindo de base para a espectroscopia de absorção analítica de IR. Com a construção do primeiro espectrômetro de IR em 1930, houve um rápido desenvolvimento no campo da espectroscopia analítica. Em 1947, Wright e Hersher, desenvolveram um espectrômetro dispersivo de feixe duplo estável. O desenvolvimento de espectrômetros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) revolucionou o campo da espectroscopia no IR: utilizando um interferômetro de Michelson (inventado por Albert Abraham Michelson) e um procedimento matemático desenvolvido por Joseph Fourier para converter um interferograma em um espectro (GAUTAM et al., 2015).

Uma ligação química em uma molécula pode vibrar de várias maneiras, e cada vibração é chamada de modo vibracional. Existem dois tipos de vibrações moleculares: estiramento (ou deformação axial) e deformação angular. Uma vibração de estiramento é caracterizada pelo movimento ao longo do eixo de ligação com o aumento ou diminuição das distâncias interatômicas. Já uma deformação angular consiste de uma mudança nos ângulos de ligação em relação ao restante da molécula (SINGH; MAJIK; TILVI, 2014). As ligações podem vibrar em diversos modos normais, sendo seis modos principais: estiramento simétrico e estiramento assimétrico; deformação angular simétrica no plano (tipo tesoura), deformação angular assimétrica no plano (tipo rotação), deformação angular simétrica fora do plano (tipo balanço) e deformação angular assimétrica fora do plano (tipo torção) - (Figura 12).

Figura 12 - Modos vibracionais das moléculas. Os sinais + e - indicam saindo do plano e entrando no plano, respectivamente



Fonte: autoria própria

O espectro de IR é comumente dividido em três regiões com base na absorção por diferentes átomos ou grupos. A região entre 4000 e 1300 cm^{-1} é chamada de região do grupo funcional: geralmente vibração de estiramento entre hidrogênio e átomos com massa menor ou igual a 19. A região entre 1300 e 910 cm^{-1} é chamada de impressão digital (fingerprint), geralmente única para cada composto. A região entre 910 e 650 cm^{-1} é chamada de aromática: as bandas de IR nesta região não vêm necessariamente dos compostos aromáticos, mas a ausência de forte absorção nessa faixa geralmente indica a falta de aromáticos (SINGH; MAJIK; TILVI, 2014).

A espectroscopia Raman e a espectroscopia de IR são técnicas complementares que podem ser usadas para analisar diferentes aspectos de uma determinada amostra. Cada uma dessas técnicas baseia-se em diferentes formas de interação com o objeto estudado e os resultados são regidos por diferentes princípios. A espectroscopia no infravermelho mede a luz absorvida, enquanto a espectroscopia Raman mede a luz dispersa. O espalhamento Raman depende da mudança de polarizabilidade da molécula, enquanto que a espectroscopia de IR depende principalmente da mudança de momentos dipolares. Normalmente, se uma banda é forte no IR, pode ser fraca no espalhamento Raman e vice-versa. A espectroscopia Raman pode

identificar diferentes componentes em misturas de amostras mais facilmente do que a espectroscopia no IR devido à largura de banda mais estreita de Raman. Um problema com o infravermelho está relacionado à absorção de água. Já o Raman não é afetado pela presença de ar, água ou vidro (GALA; CHAUHAN, 2015; ROSTRON et al., 2016).

4 METODOLOGIA

4.1 Materiais

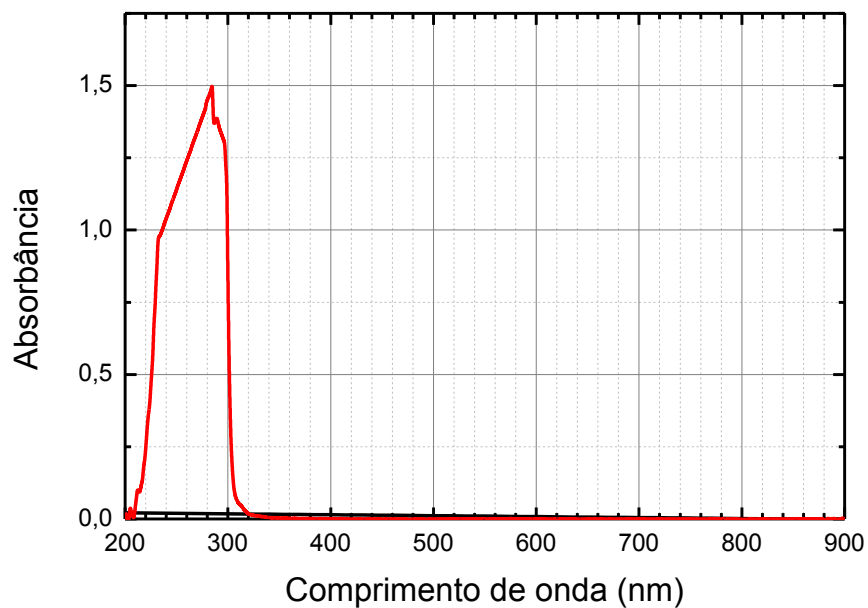
O carbendazim (98% de pureza), o brometo de hexadeciltrimetil amônio (CTAB), o cloreto de cálcio e o carbonato de sódio foram adquiridos na Sigma-Aldrich. O álcool etílico foi adquirido na Alphatec. O ciclohexano foi obtido na Neon Comercial LTDA. O álcool n-butílico foi adquirido na Dinâmica Química Contemporânea LTDA.

4.2. Construção da curva de calibração do carbendazim

Para a construção da curva de calibração do carbendazim foi preparada uma solução modelo, com concentração de 500 mg/L, a partir da dissolução do fungicida em uma solução tampão de fosfato de potássio (pH = 7,0). A utilização da lei de Beer-Lambert requer o estabelecimento do comprimento de onda onde a solução tem absorção máxima. Dessa maneira, é necessário obter o espectro de absorção: gráfico de absorbância (Eixo Y) em função do comprimento de onda (Eixo X), em nm.

Foi feita uma varredura ao longo de uma faixa espectral, de 200 a 900 nm. O comprimento de onda no qual a solução teve maior absorção foi em 285 nm (Figura 13). Conhecendo-se este comprimento de onda, preparam-se soluções com concentrações conhecidas e determina-se a absorbância de cada solução. A partir da solução de 500 mg/L, foram feitas diluições sucessivas para obter concentrações de: 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, e 8,0 mg/L. Fazendo-se um gráfico da absorbância (Eixo Y) em função da concentração (Eixo X), obtém-se uma reta que é chamada de curva padrão, a qual poderá ser utilizada para determinar a concentração de soluções.

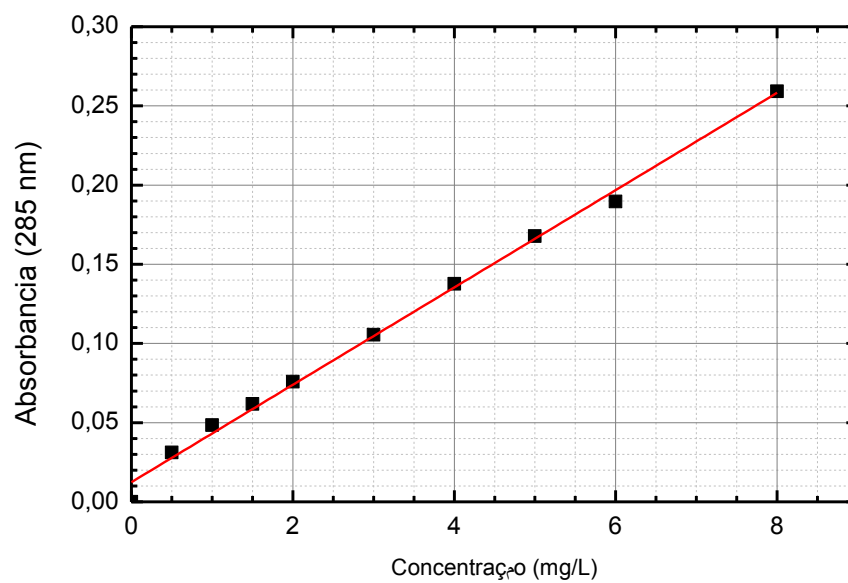
Figura 13 - Espectro de absorção do carbendazim



Fonte: autoria própria

A partir da relação linear entre a absorbância e a concentração das soluções, têm-se a curva de calibração (Figura 14).

Figura 14 - Curva de calibração do carbendazim



Fonte: autoria própria

A equação obtida está indicada abaixo:

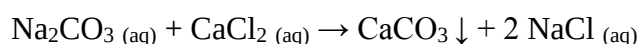
$$Y = 0,03073 X + 0,01244$$

Onde Y é a absorbância e X a concentração de fungicida livre.

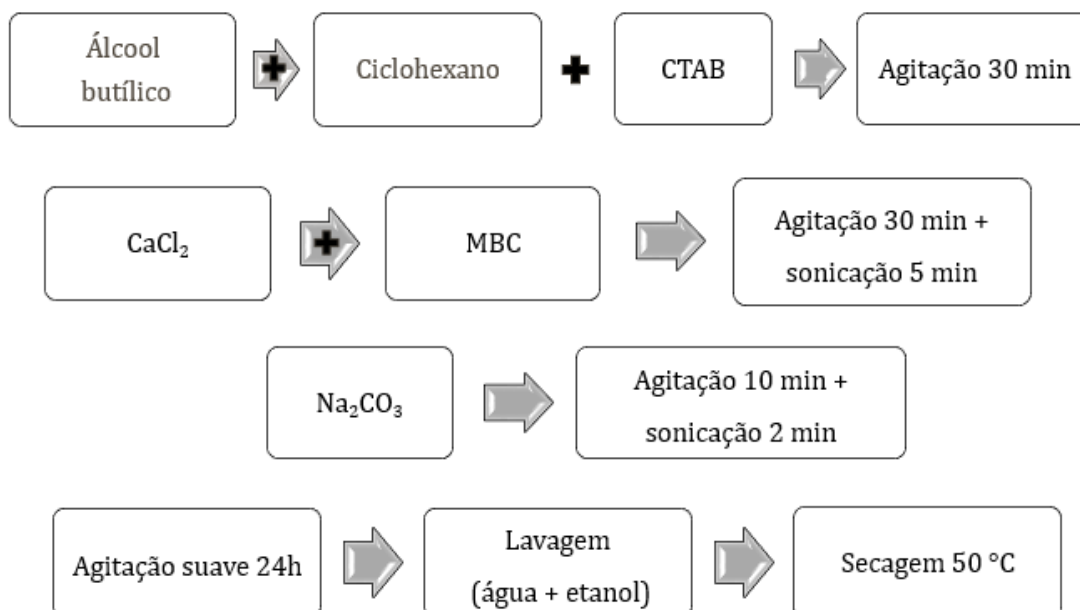
4.3 Método de preparação das partículas de CaCO_3

O método utilizado para preparação das partículas foi o de microemulsão reversa água-em-óleo (QIAN et al. 2011), amplamente utilizado como meio ideal para preparar partículas inorgânicas (DONG et al., 2010).

Para a preparação das partículas, inicialmente misturou-se e agitou-se brevemente 1000 μL de álcool n-butílico e 1800 μL de ciclohexano (Figura 15). Posteriormente, adicionou-se 0,6 g do tensoativo CTAB e essa mistura foi agitada a 1000 rpm por 30 minutos. A microemulsão foi formada pela adição de 100 μL de solução de CaCl_2 (1M) e de 10 mL de solução 1 mg/ml de carbendazim, que foi submetida a agitação durante 30 minutos e posterior sonicação durante 5 minutos. As partículas de carbonato de cálcio foram precipitadas pela adição de 100 μL de Na_2CO_3 (1M) ao sistema de microemulsão, que foi mantido sob agitação magnética durante 10 minutos e submetido novamente ao processo de agitação ultrassônica por 2 minutos. O cloreto de cálcio e o carbonato de sódio são dois reagentes amplamente utilizados como fontes de íons cálcio e carbonato, e em geral a reação entre esses é dada pela equação abaixo:



A solução de microemulsão resultante foi mantida sob agitação suave por 24 horas a temperatura ambiente para purificação. Posteriormente, as partículas foram lavadas com água destilada (2 ml) e etanol (2 ml) duas vezes, respectivamente, no tubo da centrífuga para remover o óleo residual e impurezas indesejadas. Finalmente, as amostras foram secas a 50°C para caracterização.

Figura 15 - Esquema de síntese das partículas de CaCO_3 

Fonte: autoria própria

4.4. Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE) é um dos principais parâmetros que avaliam a usabilidade de pesticidas aprisionados em partículas. A eficiência de encapsulação dá uma ideia sobre a porcentagem de ativo que é aprisionado/adsorvido nas partículas. Este parâmetro foi analisado a partir de um método indireto calculando a diferença entre a quantidade total de pesticida usada para preparar as partículas e a quantidade de pesticida livre presente no sobrenadante das partículas (KAMBA et al., 2013). A suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos para sedimentar as partículas e a quantidade de carbendazim livre presente no sobrenadante da solução foi determinada medindo a absorbância a 285 nm em um espectrofotômetro UV-Vis (Gehaka 340 G) usando a curva padrão preparada previamente.

A eficiência de encapsulação do pesticida foi calculada a partir da seguinte equação:

$$\% EE = \left[\frac{\text{peso total de pesticida} - \text{peso do pesticida não encapsulado}}{\text{peso total de pesticida}} \right] \times 100 \quad (2)$$

4.5. Liberação *in vitro*

O estudo da liberação *in vitro* é uma das ferramentas mais usadas nos processos de desenvolvimento e utilização de liberação controlada, pois permite avaliar a melhor formulação e os possíveis riscos. O perfil de liberação fornece importantes informações sobre a interação do fungicida e do sistema carreador, de maneira que podemos determinar a quantidade de pesticida liberado em determinado tempo.

O perfil de liberação do carbendazim através das partículas foi feito baseado em uma adaptação do método descrito por DIZAJ et al., (2017). Foram diluídas 30 mg de partículas em 300 ml de solução tampão de fosfato de potássio (pH = 7,0). Essa formulação foi mantida sob agitação suave e em temperatura ambiente. Em intervalos pré-determinados (1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h, 8h, 10h, 12h, 22h, 26h, 46h, 52h e 72h) alíquotas do meio foram removidas e esse volume era repostado com solução tampão. O volume era repostado para evitar a saturação do meio com o ativo. As alíquotas eram submetidas a centrifugação a 10.000 rpm para sedimentação das partículas. O sobrenadante foi analisado e quantificado por espectrofotometria a 285 nm, fornecendo a concentração do pesticida liberado.

A concentração do pesticida liberado é calculada a partir do seguinte procedimento:

- 1) Ao retirar a primeira alíquota ΔV , obtêm-se a primeira concentração medida, C_1 .

$$C_1 = \frac{m_1}{V} = C_1^{med}$$

- 2) Repondo o solvente, uma alíquota ΔV de mesmo volume do retirado, temos uma concentração C'_1 .

$$C'_1 = \frac{C_1 \cdot V_1 - C_1 \cdot \Delta V_1}{V_1} = C_1 \left(1 - \frac{\Delta V_1}{V_1}\right)$$

Ou seja, a concentração sofre um decréscimo ΔC_1

$$\Delta C_1 = C'_1 - C_1 = -C_1 \cdot \frac{\Delta V_1}{V_1}$$

- 3) De maneira recorrente, temos:

$$C_1 = C_1^{med}$$

$$C'_1 = C_1 \left(1 - \frac{\Delta V_1}{V_1} \right)$$

$$\Delta C_1 = -C_1 \cdot \frac{\Delta V_1}{V_1}$$

4) Para o i-ésimo ponto

$$C_i = C_i^{med} + \Delta C_{i-1}, \quad \Delta C_{i-1} = C_{i-1} \left(1 - \frac{\Delta V}{V} \right)$$

4.6 Preparação do inóculo

O isolado de *Macrophomina pseudophaseolina* BA₂ 14 foi obtido da coleção do laboratório de Fitopatologia 2 da Universidade Federal Rural do Semi-Árido localizado na cidade de Mossoró-RN.

Um disco de aproximadamente 6 mm de diâmetro foi cortado a partir de um fungo subcultivado anteriormente e inoculado assepticamente no centro de uma placa de Petri. Esse controle foi mantido na incubadora de Demanda Biológica de Oxigênio (BOD) a 25°C até o crescimento fúngico completo, quando o fungo tomou a placa de Petri. O período de incubação da *Macrophomina pseudophaseolina* foi de 4 dias.

4.7 Avaliação da eficácia antifúngica das formulações

O desenvolvimento de novos sistemas antifúngicos é um campo de estudo de grande importância, tanto pelo desafio da resistência dos patógenos, bem como pela procura de alternativas de proteção as doenças que minimizem os riscos para o homem e para o meio ambiente. É preciso desenvolver um sistema que apresente eficácia contra a ação de fitopatógenos. Nesse sentido foi avaliado a eficácia antifúngica das formulações contra a *Macrophomina pseudophaseolina*: foram preparadas soluções estoque na concentração de 100 mg/L (em relação ao ingrediente ativo) de carbendazim puro e da formulação de CaCO₃ com

carbendazim. Posteriormente, 1 ml e 0,5 ml foram adicionados a erlenmeyers contendo o meio de cultura Ágar Batata Dextrose (BDA) de modo a obter um volume final de 100 ml, resultando em concentrações de carbendazim e formulação de 1 mg/L e 0,5 mg/L. Em cada uma das placas de Petri foi adicionado aproximadamente 20 ml do meio, num total de cinco repetições para cada tratamento. Um disco de 6 mm de diâmetro contendo o fungo foi inoculado no centro de cada placa, que foi mantida na incubadora BOD por 4 dias.

Observações e medidas foram feitas quando o tratamento contendo a testemunha (controle sem fungicida) tomou a placa de Petri. A medida do crescimento micelial do fungo foi feita ao longo de duas linhas perpendiculares. A inibição do crescimento, porcentagem de inibição do crescimento (PIC), foi determinada pelo uso da Equação 3:

$$PIC = \left[\frac{\text{Diâmetro Testemunha} - \text{Diâmetro Tratamento}}{\text{Diâmetro Testemunha}} \right] \times 100 \quad (3)$$

4.8 Análise estatística

Toda a análise estatística foi realizada utilizando o software SISVAR. Foi realizado um delineamento inteiramente casualizado (DIC). Cada tratamento teve cinco repetições. Os resultados com $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Morfologia

Para realização das medidas foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura Quanta 450 FEG-FEI, com voltagem de 20 kV e detector de elétrons secundários.

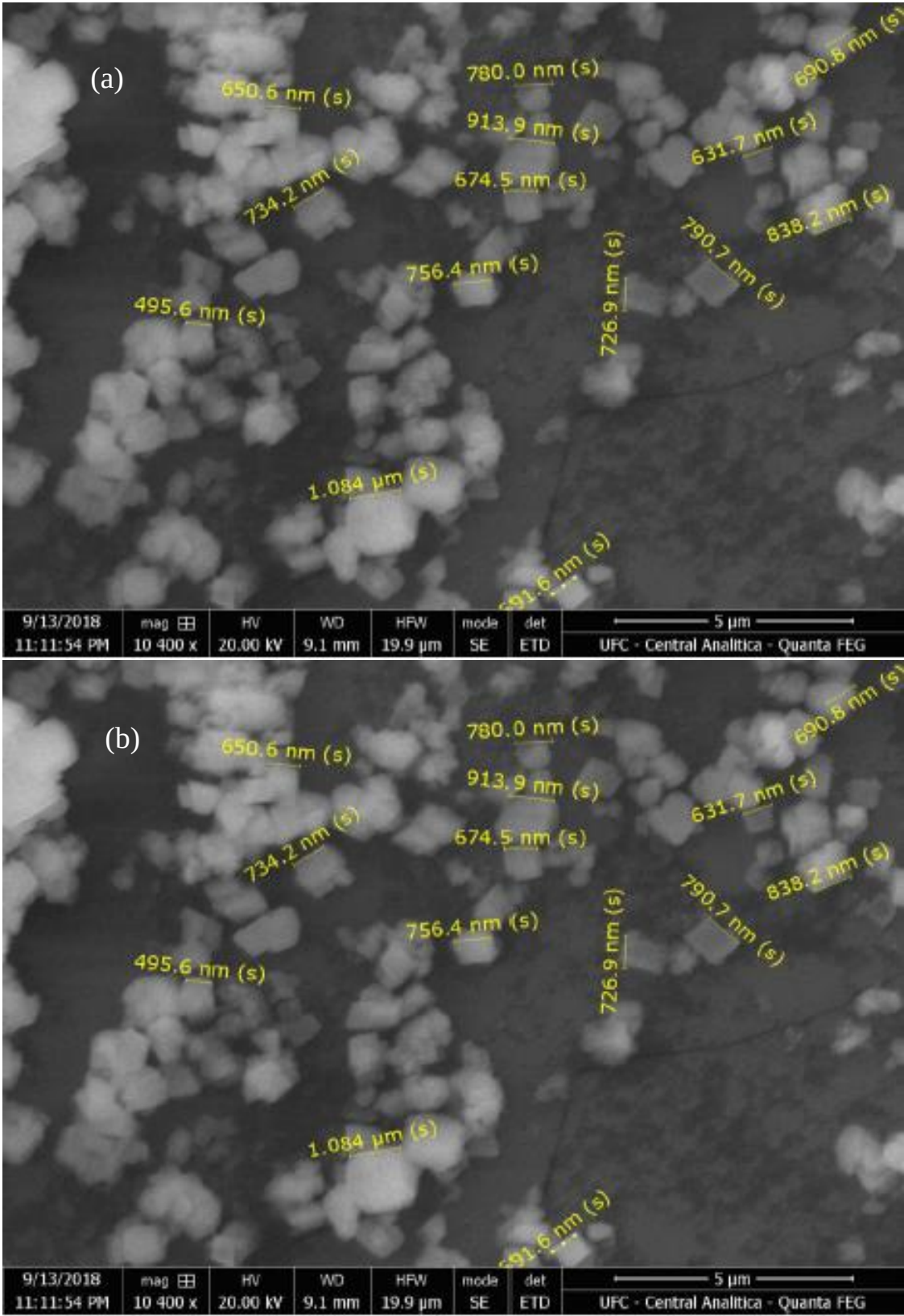
O tamanho das partículas de carbonato de cálcio puras variou entre 490 nm e 1000 nm. As partículas de CaCO_3 carregadas com carbendazim apresentaram tamanho variando de 148 a 440 nm, como pode ser visto na Figura 16. A partir das análises do MEV, da espectroscopia Raman e do Infravermelho, a estrutura cristalina de ambas as partículas era do tipo calcita de morfologia cúbica. A calcita é um polimorfo do carbonato de cálcio que existe nas formas romboédrica, prismática, escalenoédrica, esférica ou aglomerados semelhantes a cadeias (UKRAINCZYK; KONTREC; KRALJ, 2009).

O tamanho é uma das mais importantes características de uma partícula, pois influencia a liberação do ativo e a estabilidade da partícula. Em qualquer método, os fatores associados a determinação do tamanho das partículas são a velocidade de homogeneização, a composição das fases, a razão entre os íons cálcio e carbonato, o surfactante e a concentração da droga ou pesticida (DIZAJ et al., 2015; CHEN; TAI, 2010).

O surfactante pode ter um papel duplo: pode funcionar como um molde que direciona o crescimento dos cristais, e as espécies ativas de sua superfície podem estabilizar os cristais formados. O CTAB é um surfactante catiônico que é escolhido para participar da síntese de partículas de carbonato de cálcio porque espera-se que sua carga positiva interaja com as superfícies aniônicas dos cristais de CaCO_3 - íons carbonato carregados negativamente (LIU; YATES, 2006).

De maneira semelhante a esse trabalho, QIAN et al., (2011) preparou nanopartículas de carbonato de cálcio carregadas com um pesticida usando microemulsão água em óleo e os resultados mostraram que a estrutura cristalina era principalmente do tipo calcita. O tamanho de suas partículas variou entre 57 e 387 nm.

Figura 16 – Tamanho e morfologia: (a) partículas de CaCO_3 e (b) partículas de CaCO_3 + Carbendazim



Fonte: autoria própria

Nesse trabalho foram utilizadas quantidades equimolares dos reagentes cloreto de cálcio e carbonato de sódio. Vários trabalhos assinalam que o polimorfismo e a morfologia do carbonato de cálcio são bastante afetados pela razão molar de cálcio/carbonato. CHEN; TAI, (2010) analisou a influência da razão molar cálcio/carbonato e de diferentes tipos de aditivos sobre a morfologia de partículas de CaCO_3 ; a razão molar igual a um formou calcita para todos os aditivos usados a 25 °C. ROCK et al., (1997) obteve partículas do tipo calcita com morfologias esféricas e romboédricas: as partículas romboédricas foram formadas em uma proporção molar de 1:1 de cálcio/carbonato. Já as partículas esféricas foram formadas em uma proporção molar de 10:1 de cálcio/carbonato. Assim, o autor sugere que a razão molar 1:1 de cálcio/carbonato é um fator determinante na obtenção de partículas romboédricas.

YU et al., (2005) sintetizou cristais de CaCO_3 usando os aditivos PSMA e CTAB: foram obtidos cristais romboédricos de calcita na presença ou ausência do CTAB, sugerindo que esse surfactante não afeta a morfologia e o polimorfismo dos cristais. A literatura aponta ainda cristais de CaCO_3 com diferentes morfologias: por exemplo, a partir de microemulsões, KANG et al., (2005) obteve predominantemente vaterita com morfologia esférica. VIRAVAIIDYA; LI; MANN, (2004) obteve estruturas empilhadas semelhantes a placas, consistindo de cristais do tipo calcita com morfologia pseudo-hexagonal. DIZAJ et al., (2016) sintetizou nanopartículas de carbonato de cálcio carregadas com sulfato de gentamicina cuja estrutura cristalina era do tipo vaterita, enquanto as nanopartículas de CaCO_3 puras eram do tipo calcita de morfologia esférica.

5.2 Espalhamento Raman

Para realização das medidas foi utilizado o espectrômetro Raman modelo WITec alpha 300, sendo o laser utilizado de 532 nm.

O espectro Raman do carbendazim sólido (Figura 17) é formado por sete bandas fortes registradas em 619, 724, 961, 1019, 1261, 1270 e 1474 cm^{-1} e duas bandas muito fortes em números de onda mais baixos (127 e 151 cm^{-1}), que correspondem a vibrações de rede. As bandas remanescentes registradas dentro da região analisada (100-1800 cm^{-1}), mostram uma intensidade menor que as anteriores, sendo média ou fraca. No espectro foram utilizadas linhas vermelhas para indicar as bandas mais intensas do carbendazim.

A banda localizada em 619 cm^{-1} é atribuída a uma deformação angular CC do grupo benzênico (Tabela 2). A banda em 724 cm^{-1} é atribuída à deformação angular CC do grupo benzênico e à deformação angular do COCH_3 . A banda em 961 cm^{-1} é atribuída à deformação angular NCOOCH_3 . A banda em 1019 cm^{-1} é atribuída à deformação angular CN do grupo imidazol, a deformação angular CC do grupo benzênico e ao estiramento COCH_3 . A banda em 1261 cm^{-1} é atribuída à deformação angular NH do grupo amídico e a deformação angular CC do grupo benzênico. A banda em 1270 cm^{-1} é atribuída à deformação angular NH e a deformação angular CH, ambas do grupo imidazol. A banda em 1474 cm^{-1} é atribuída à deformação angular NH do grupo amídico, a deformação angular CN do grupo imidazol e a deformação angular CH do grupo metila (FURINI et al., 2016).

O espectro Raman do carbonato de cálcio (Figura 17) é formado por quatro bandas intensas registradas em 155, 281, 711 e 1082 cm^{-1} . Vibrações com números de onda menor que 500 cm^{-1} são vibrações de rede, que correspondem a translações relativas dos íons cálcio e carbonato. Vibrações superiores a 700 cm^{-1} são vibrações internas dos íons carbonato, geralmente chamados de modos normais internos. No espectro foram utilizadas linhas azuis para indicar as bandas mais intensas do carbonato de cálcio. Os picos obtidos no espectro do carbonato de cálcio são característicos de um espectro de calcita. Na calcita, o estiramento simétrico é ativo no espectro Raman e a deformação angular fora do plano é ativa no infravermelho. Já o estiramento assimétrico e a deformação angular no plano podem ser observadas em ambos os espectros Raman e infravermelho (XU, 2015).

Figura 17 - Espectros Raman: (a) Carbendazim, (b) Partículas de CaCO_3 e (c) partículas de CaCO_3 + Carbendazim. Linhas vermelhas são relativas aos picos do carbendazim e as linhas azuis são relativas aos picos do CaCO_3

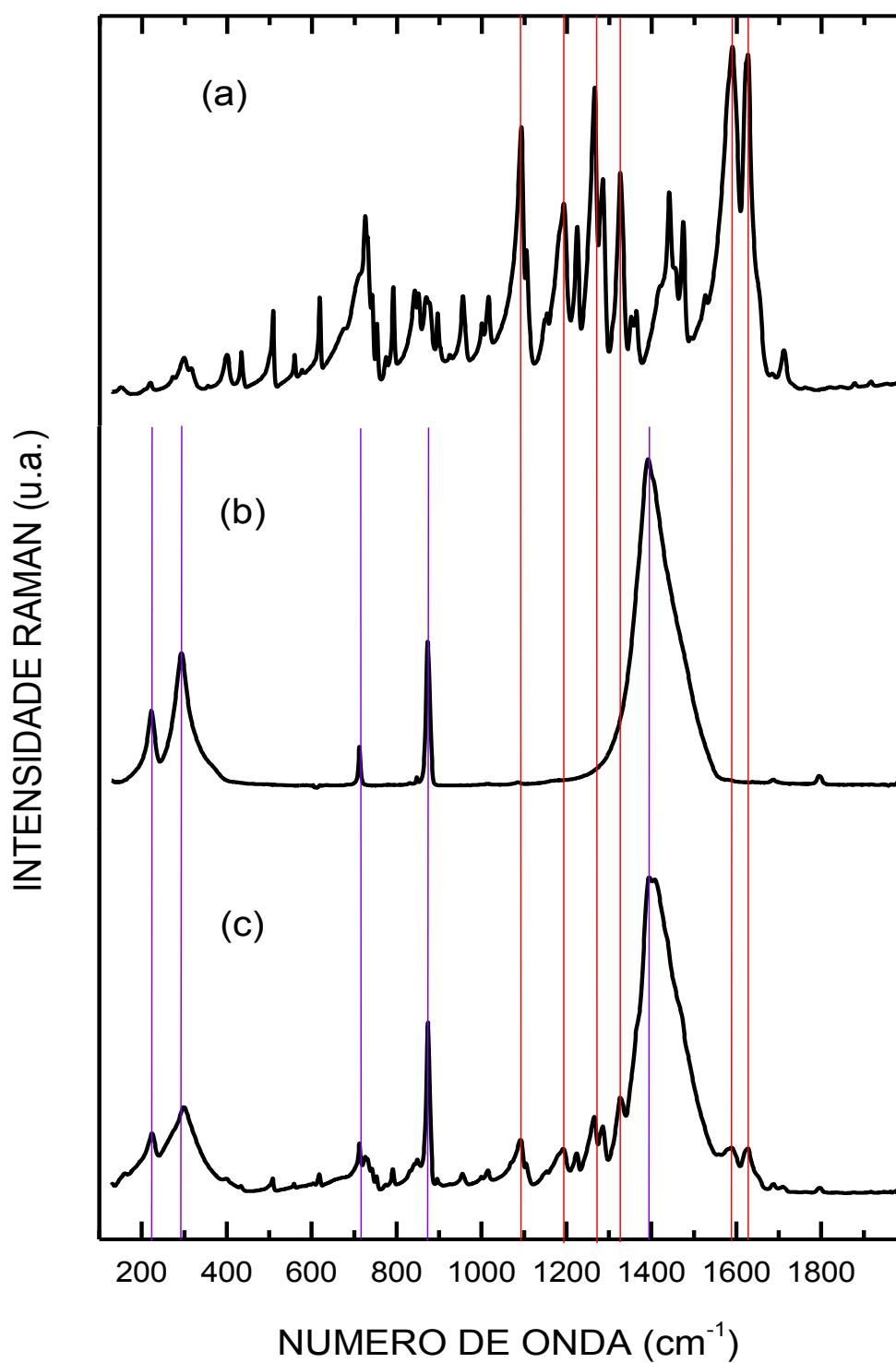


Tabela 2 - Atribuição dos modos vibracionais Raman do carbendazim

Números de onda (cm ⁻¹)	Atribuição *
127 e 151	Vibrações de rede
619	$\delta(\text{CC})_{\text{Bz}}$
724	$\delta(\text{CC})_{\text{Bz}}$; $\delta(\text{COCH}_3)$
961	$\delta(\text{NCOOCH}_3)$
1019	$\delta(\text{CN})_{\text{IZ}}$; $\delta(\text{CC})_{\text{Bz}}$; $\nu(\text{COCH}_3)$
1261	$\delta(\text{NH})_{\text{AM}}$; $\delta(\text{CC})_{\text{Bz}}$
1270	$\delta(\text{NH})_{\text{IZ}}$; $\delta(\text{CH})_{\text{IZ}}$
1474	$\delta(\text{NH})_{\text{AM}}$; $\delta(\text{CN})_{\text{IZ}}$; $\delta(\text{CH})_{\text{Met}}$

*Furini et al.,(2016)

Fonte: autoria própria

As bandas registradas em 155 e 281 cm⁻¹ correspondem a vibrações externas do grupo CO₃ (Tabela 3). A banda em 711 cm⁻¹ é atribuída à deformação angular no plano. A intensa banda em 1082 cm⁻¹ é atribuída ao estiramento simétrico (BUZGAR; APOPEI, 2009; GABRIELLI et al., 2000).

Tabela 3 – Atribuição dos modos vibracionais Raman do carbonato de cálcio

Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
155 e 281	Vibrações de rede
711	δ
1082	ν

Fonte: autoria própria

O espectro Raman do carbonato de cálcio carregado com carbendazim (Figura 17 e Tabela 4) é formado pelos picos apresentados nos espectros Raman do carbonato de cálcio juntamente com os picos apresentados no espectro do carbendazim: 122, 155, 295, 618, 720, 959, 1014, 1087, 1258, 1266 e 1470 cm^{-1} . Dessa maneira, podemos afirmar que o pesticida foi incorporado à partícula de carbonato de cálcio.

Tabela 4 – Bandas no Raman do MBC, do CaCO_3 e do $\text{CaCO}_3 + \text{MBC}$

Números de onda (cm^{-1})		
MBC	CaCO_3	$\text{CaCO}_3 + \text{MBC}$
127		122
	155	155
151		
	281	295
619		618
	711	
724		720
961		959
1019		1014
	1082	1087
1261		1258
1270		1266
1474		1470

Fonte: autoria própria

5.3 Infravermelho

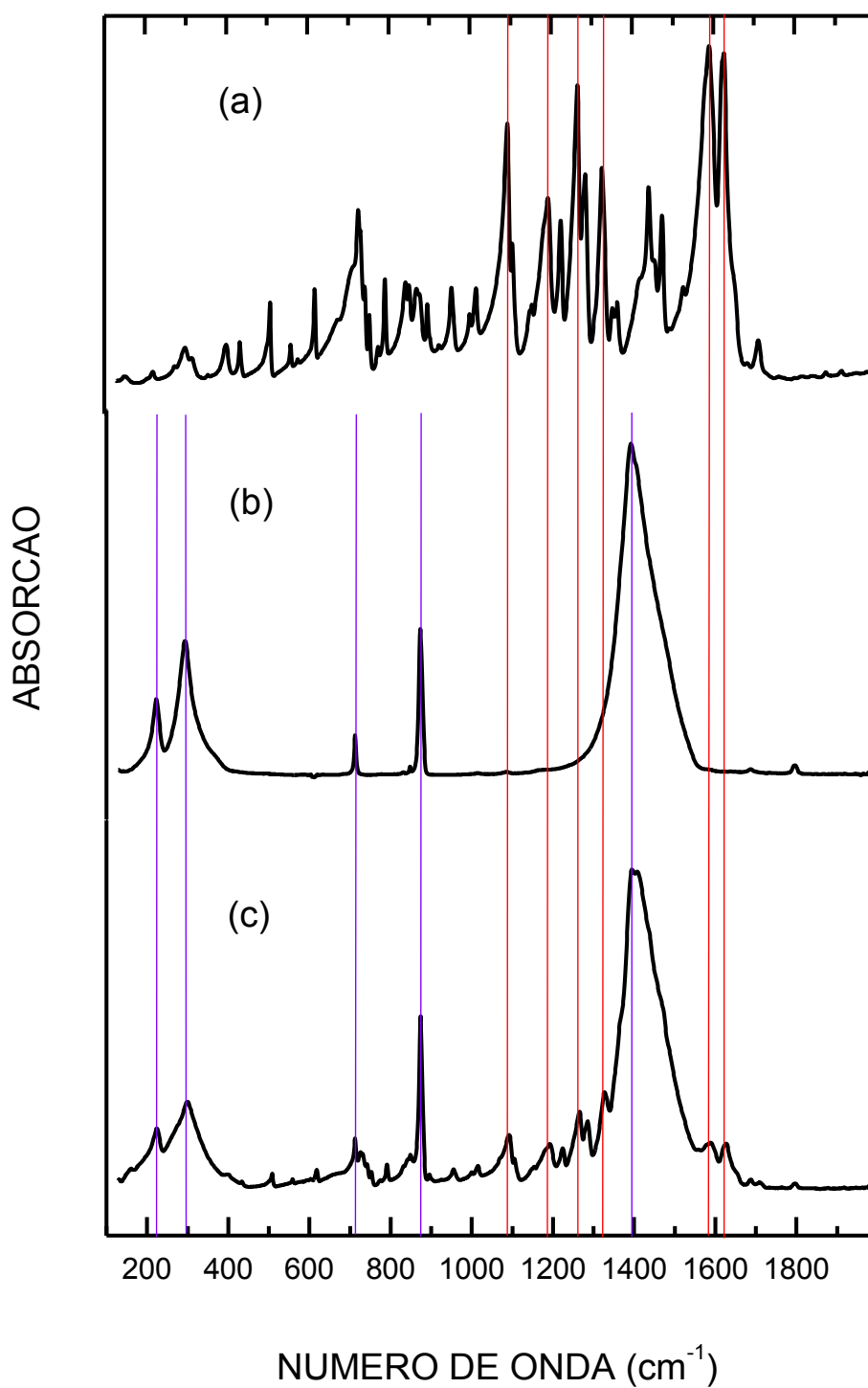
Os espectros no infravermelho foram realizados para confirmar as estruturas químicas das partículas e para avaliar a interação entre o pesticida e o carreador. Foi utilizado o espectrômetro no infravermelho com Transformada de Fourier pelo método do disco de KBr de 4000 – 400 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} .

O espectro no infravermelho do carbendazim sólido (Figura 18) é formado por seis bandas fortes registradas em 1092, 1192, 1265, 1325, 1589 e 1625 cm^{-1} . As bandas abaixo de 1200 cm^{-1} podem ser atribuídas às deformações dos anéis aromáticos e heterocíclicos. A banda em 1589 cm^{-1} é atribuída ao estiramento C=C do anel benzênico (GE et al., 2012). A banda em 1625 cm^{-1} é atribuída ao estiramento C=N. O estiramento C-N tem como característica produzir bandas intensas entre 1200 e 1310 cm^{-1} (NEGI et al., 2014; VIJAYAN et al., 2004). No espectro foram utilizadas linhas vermelhas para indicar as bandas mais intensas do carbendazim.

O espectro no infravermelho do carbonato de cálcio (Figura 18) é formado por cinco bandas fortes registradas em 222, 293, 712, 872 e 1392 cm^{-1} . As bandas em 222 e 293 cm^{-1} são atribuídas à vibração da rede cristalina. A banda em 712 cm^{-1} é atribuída à deformação angular no plano (ν_4) OCO. A banda em 872 cm^{-1} é atribuída à deformação angular fora do plano (ν_2) CO_3 . A banda em 1392 é atribuída ao estiramento assimétrico (ν_3) CO. A frequência de absorção para o estiramento assimétrico é muito ampla e intensa, valores entre aproximadamente 1400 - 1500 cm^{-1} , portanto a atribuição da banda não é precisa (LOY et al., 2016; SHEN et al., 2007; WEIR; LIPPINCOTT, 1961; PLAVSIC et al., 1999). No espectro foram utilizadas linhas azuis para indicar as bandas mais intensas do carbonato de cálcio.

O espectro no infravermelho do carbonato de cálcio carreado com carbendazim (Figura 18 e Tabela 5) é formado por onze bandas fortes registradas em 224, 300, 712, 873, 1091, 1192, 1265, 1325, 1394, 1588 e 1626 cm^{-1} . As bandas registradas correspondem aos picos apresentados nos espectros do carbonato de cálcio e do carbendazim. Esse resultado confirma a presença do carbendazim na formulação. A ausência de alteração significativa na posição dos picos do carbendazim nas partículas carregadas com o pesticida indicou que não houve interação química entre o MBC e a formulação durante o processo de preparação. Resultado semelhante ao obtido por SANDHYA et al., (2017), que sintetizou nanopartículas poliméricas para analisar a liberação controlada do carbendazim e atestou pela análise do infravermelho que o fungicida foi carreado na nanopartícula sem ocorrência de reação química.

Figura 18 - Espectros IR: (a) Carbendazim, (b) Partículas de CaCO_3 e (c) partículas de CaCO_3 + Carbendazim. Linhas vermelhas são relativas aos picos do carbendazim e as linhas azuis são relativas aos picos do CaCO_3



Fonte: autoria própria

Tabela 5 – Bandas no IR do MBC, do CaCO₃ e do CaCO₃ + MBC

Números de onda (cm ⁻¹)		
MBC	CaCO ₃	CaCO ₃ + MBC
	222	224
	293	300
	712	712
	872	873
1092		1091
1192		1192
1265		1265
1325		1325
	1392	1394
1589		1588
1625		1626

Fonte: autoria própria

5.4 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (Equação 2) do carbendazim no presente trabalho foi de aproximadamente 99%, o que indica que houve afinidade do sistema carreador com o fungicida e que praticamente todo o pesticida empregado durante a fase de síntese das partículas é aprisionado na formulação final.

$$\% EE = \left[\frac{\text{peso total de pesticida} - \text{peso do pesticida não encapsulado}}{\text{peso total de pesticida}} \right] \times 100 \quad (2)$$

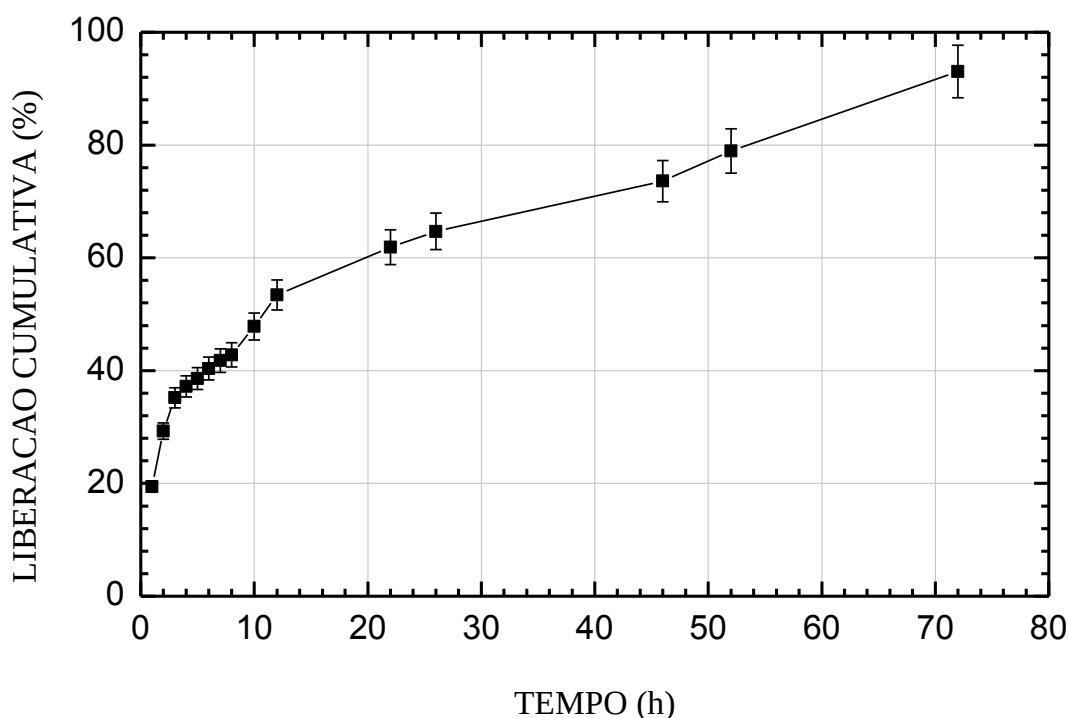
O carbendazim é um composto bastante hidrofóbico, com solubilidade aquosa de 8 mg/L (a 24°C e pH=7,0). Essas características poderiam sugerir que não haveria afinidade com o sistema carreador, uma vez que o mesmo é preparado a partir de soluções aquosas de sais. Porém, partículas de carbonato de cálcio devido à natureza porosa ou aos nanoporos em sua superfície, têm uma forte capacidade de carrear moléculas independentemente da carga superficial ou hidrofilicidade do ativo (KAMBA et al., 2013).

Similarmente a esse trabalho, SANDHYA et al., (2017) preparou nanopartículas de carbendazim usando quitosana e pectina como matrizes poliméricas e a eficiência de encapsulação de sua formulação foi de 99,2%. KOLI et al., (2015) sintetizou nanoformulações de carbendazim empregando polímeros anfifílicos e as eficiências de encapsulação das formulações variaram entre 92,60% e 96,82%. CAMPOS et al., (2015) preparou nanopartículas poliméricas e nanopartículas lipídicas sólidas para o carregamento dos fungicidas carbendazim e tebuconazol. Para o carbendazim os valores de eficiência de encapsulação, em ambas as nanopartículas, foram superiores a 99%. UENO et al., (2005) sintetizou nanopartículas de carbonato de cálcio incorporando fosfato de betametasona, cuja eficiência de encapsulação foi superior a 90%. KAMBA et al., (2013) sintetizou nanocristais de carbonato de cálcio contendo doxorubicina: a eficiência de encapsulação da droga foi de 97%. Com exceção de KOLI et al., (2015), os demais autores citados acima também calcularam a eficiência de encapsulação pelo método indireto.

5.5 Liberação *in vitro*

As partículas foram dissolvidas em solução tampão a fim de oferecer condições para que o ativo fosse liberado e garantir que durante a liberação não haveria variações no pH da solução. A Figura 19 mostra a porcentagem de liberação do carbendazim em função do tempo: a liberação do carbendazim presente nas partículas atingiu 93% em 72 horas.

Figura 19 - Perfil de liberação do carbendazim



Fonte: autoria própria

No caso do fungicida puro, o ingrediente ativo estaria imediatamente disponível e apresentaria liberação total instantaneamente, sendo necessário repetir as aplicações para garantir o controle efetivo das pragas. Nas formulações o ingrediente ativo está protegido pela matriz, seja ela de qualquer natureza, sendo protegido contra ataques de agentes microbianos e ambientais; como luz, oxigênio e hidrólise. Devido a isso, a liberação é otimizada e apresenta maior duração, tendo como consequência direta o uso de doses menores de fungicida, menor número de aplicações, e assim, menor toxicidade e contaminação do meio ambiente (KOLI et al., 2015; SANDHYA et al., 2017).

Similarmente no estudo de DIZAJ et al., (2017) houve liberação sustentada de cloridrato de ciprofloxacina, cuja liberação a partir de nanopartículas de CaCO_3 se prolongou por 12 horas, enquanto que a droga pura (antibiótico na forma de pó) foi liberada quase que imediatamente: nas primeiras duas horas. No trabalho de QIAN et al., (2011) os perfis de liberação do pesticida valinomicina a partir das nanopartículas de carbonato de cálcio tiveram taxas iniciais próximas a 20%, semelhantes a esse trabalho, que em uma hora foi liberado 19% de carbendazim. O autor acima explica que essa rápida liberação inicial, chamada de liberação “explosiva”, pode ser

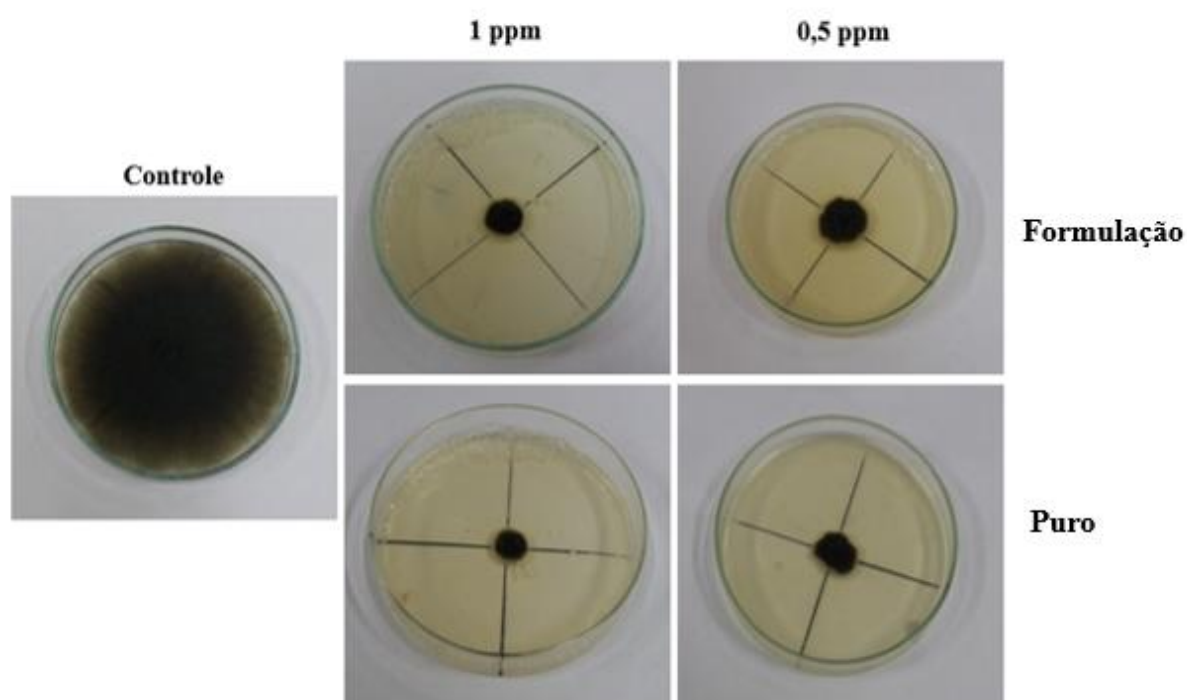
atribuída a moléculas da superfície que não estavam fortemente ligadas às nanopartículas, ou seja, que não estavam encapsuladas no interior, ocorrendo a dessorção do ativo da superfície.

WANG et al., (2017) sintetizou um filme de quitosana e β -Ciclodextrina-Epicloridrina para liberação controlada do carbendazim. Houve uma rápida liberação inicial (liberação “explosiva”) do carbendazim de 3 a 18 horas para os filmes de quitosana, e de 9 a 18 horas para os filmes de quitosana e β -Ciclodextrina-Epicloridrina. Após 48 horas, cerca de 87% e 76% do carbendazim foi liberado dos filmes de quitosana e de quitosana e β -Ciclodextrina-Epicloridrina, respectivamente. Nesse trabalho, após um tempo decorrido semelhante, em 46 horas, foi liberado 73% do carbendazim, taxa similar à obtida pelo autor.

5.6 Eficácia antifúngica das partículas

A formulação e o carbendazim puro foram testados nas mesmas condições para avaliar sua atividade antifúngica contra a *Macrophomina pseudophaseolina*. Os resultados em relação ao carbendazim puro foram semelhantes aos obtidos pela aplicação das partículas, como pode ser visto na Figura 20 e na Tabela 6. Verificou-se que a formulação poderia inibir significativamente o crescimento da *Macrophomina pseudophaseolina*: na concentração de 1 ppm houve inibição de quase 80% do crescimento fúngico. Uma vez que a formulação desenvolvida tem como característica liberação lenta e prolongada, as partículas carregadas com carbendazim podem ter maior duração de eficácia em comparação ao fungicida puro. Dessa maneira, usando a mesma quantidade de pesticida, mantém-se uma concentração efetiva do ingrediente ativo por um período maior, e assim, espera-se um efeito antifúngico mais duradouro no controle de doenças causadas por fitopatógenos.

Figura 20 - Eficácia antifúngica da formulação e do carbendazim contra *Macrophomina pseudophaseolina*



Fonte: autoria própria

Tabela 6 - Porcentagem de inibição da *Macrophomina pseudophaseolina*

Fungicida	<i>Macrophomina pseudophaseolina</i> (porcentagem de inibição) $\pm$ DP, n = 5	
	Concentração	
	1,0 ppm	0,5 ppm
Formulação	78,00 $\pm$ 1,35	75,44 $\pm$ 1,08
Carbendazim puro	79,22 $\pm$ 1,75	78,78 $\pm$ 1,88

Fonte: autoria própria

É importante ressaltar que em associação às partículas, é provável que ocorra diminuição da toxicidade do fungicida, o que é muito benéfico, pois muitos fungicidas podem levar ao desenvolvimento de várias doenças, como o câncer, e levar ao óbito por intoxicação. CAMPOS et al., (2015) realizou ensaios de citotoxicidade para avaliar o efeito de nanopartículas contendo os fungicidas carbendazim e tebuconazol sobre a viabilidade celular de fibroblastos de camundongos. As nanopartículas exerceram um efeito protetor em relação as formulações comerciais, diminuindo a toxicidade dos fungicidas.

É provável também que as partículas reduzam de forma expressiva a concentração de pesticida presente no solo devido a lixiviação (provocada pela irrigação), pois devido à encapsulação, uma quantidade menor de fungicida está disponível para ser lixiviado. Dessa maneira são reduzidas as perdas no meio ambiente, diminuindo o impacto ambiental; e são necessárias menos reaplicações do fungicida. CAMPOS et al., (2015) avaliou a cinética de liberação dos fungicidas carbendazim e tebuconazol no solo. Comparou a formulação comercial com os fungicidas encapsulados em nanopartículas. Após cada irrigação com água destilada, o lixiviado era coletado e filtrado, e era determinada a concentração do fungicida. Nas nanopartículas contendo carbendazim, após nove irrigações, o valor variou entre 3,2% e 4,8%, dependendo se era uma nanopartícula polimérica ou lipídica. Já a partir da formulação comercial, foi liberado 17% de carbendazim.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos anos, muitas empresas têm se interessado em desenvolver sistemas de liberação que reduzam o uso indiscriminado dos pesticidas convencionais e que garantam uma aplicação segura. A aplicação excessiva de agrotóxicos aumenta o potencial impacto no meio ambiente, uma vez que aumenta a probabilidade de escoamento ou lixiviação, e portanto, a poluição do solo e de águas superficiais ou subterrâneas. A tecnologia de encapsulamento de pesticidas tem proporcionado avanços para o ramo agrícola no que se refere ao desenvolvimento de formulações de pesticidas mais eficazes e menos poluidoras. Porém, são necessários estudos mais aprofundados sobre sistemas de liberação modificada, abrangendo uma gama maior de materiais que podem ser usados como matrizes, bem como estudar o carregamento de diversos tipos de fungicidas. É necessário também avaliar a eficácia das formulações desenvolvidas, bem como sua toxicidade.

Os cristais de CaCO_3 sintetizados mostraram ser bons carreadores para o fungicida carbendazim, com eficiência de encapsulação de aproximadamente 99%. O tamanho das partículas de carbonato de cálcio puras variou entre 490 e 1000 nm. Já as partículas de CaCO_3 carregadas com carbendazim apresentaram tamanho variando de 148 a 440 nm. A análise de microscopia eletrônica de varredura permitiu também conhecer a morfologia das partículas, que mostrou ser cúbica. As análises de espectroscopia vibracional apresentaram picos experimentais que estavam de acordo com os picos encontrados na literatura para o carbendazim e para o carbonato de cálcio. A partir da análise desses picos encontrados no espectro Raman e no espectro de Infravermelho foi possível identificar que o carbonato de cálcio se encontrava na forma de calcita.

O perfil de liberação do fungicida ocorreu de maneira sustentada, assinalando que esse sistema apresenta liberação modificada e eficiente. Ao se comparar com o fungicida puro, que é liberado imediatamente, a encapsulação do carbendazim apresenta a vantagem de menos reaplicações, que implicam em menor toxicidade e contaminação ambiental. É fundamental analisar se as partículas se mostram eficientes quando em contato com agentes fúngicos. As partículas de CaCO_3 exibiram excelente atividade antifúngica contra a *Macrophomina pseudophaseolina*, um fungo que atinge culturas como milho, soja e feijão. Dessa maneira, esse sistema não inibiu a ação do pesticida, podendo ser explorado para o controle de pragas.

Destaca-se que nesse trabalho foi sintetizada uma partícula de um material inorgânico, pouco reportada no que se refere a liberação de pesticidas, e não relatada em associação ao carbendazim. Essa dissertação forneceu uma nova visão sobre a aplicação do carbendazim, apresentando uma nova formulação para encapsulação desse fungicida que pode ser explorada no controle de doenças. Promoveu a interconexão entre o ambiente acadêmico e a realidade do semiárido, pois se trata de um fungicida comumente usado nessa região.

Em trabalhos futuros podem ser feitas mais análises, como a Difração de Raios-x, a Espectroscopia de Energia Dispersiva, o Potencial Zeta e uma Análise Termogravimétrica. Podem ser testados outros fungicidas, bem como outras matrizes para as partículas. Seria interessante também variar as condições de síntese, como as concentrações dos reagentes, para avaliar o efeito sobre a partícula: se afetaria o tamanho, a estrutura cristalina e a estabilidade. No que se refere a liberação, poderiam se empregar modelos matemáticos para elucidar os mecanismos envolvidos na liberação do carbendazim. Além do estudo *in vitro*, em trabalhos futuros poderia ser feito uma avaliação no campo: o efeito da formulação sobre o crescimento das plantas. De maneira geral, esse sistema de entrega pode abrir novas perspectivas no combate a fungos que causam prejuízos à agricultura, saúde humana e meio ambiente.

.

7. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. M. R.; SEIXAS, C. D. S.; FARIAS, J. R. B.; OLIVEIRA, M. C. N. de; FRANCHINI, J. C.; DEBIASI, H.; COSTA, J. M. da; GAUDÊNCIO, C. A. **Macrophomina phaseolina em soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2014. 55p.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada - **RDC nº 113**, de 19 de dezembro de 2007. Disponível em: <[http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP\[20903-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP[20903-1-0].PDF)>. Acessado em: 16 set. 2017.

ADAK, T.; KUMAR, J.; SHAKIL, N. A.; WALIA, S. Development of controlled release formulations of imidacloprid employing novel nano-ranged amphiphilic polymers. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 47, n. 3, p. 217–225, 2012.

ALEXANDRATOS, N.; BRUINSMA, J. WORLD AGRICULTURE TOWARDS 2030 / 2050 The 2012 Revision. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, , n. 12, p. 146, 2012.

ANTON, N.; VANDAMME, T. F. Nano-emulsions and micro-emulsions: Clarifications of the critical differences. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 5, p. 978–985, 2011.

ASRAR, J.; DING, Y.; MONICA, R. E. LA; NESS, L. C. Controlled release of tebuconazole from a polymer matrix microparticle: Release kinetics and length of efficacy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 15, p. 4814–4820, 2004.

BABOU-KAMMOE, R.; HAMOUDI, S.; LARACHI, F.; BELKACEMI, K. Synthesis of CaCO₃ nanoparticles by controlled precipitation of saturated carbonate and calcium nitrate aqueous solutions. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 90, n. 1, p. 26–33, 2012.

BEZERRA, E. M. **Quantum & Nano em Ciências Farmacêuticas: Caracterização do Benzonidazol, Nanopartículas Bzn@CaCO₃ e Interação Bzn@TcCYP51**. 2014. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014

BOGNER, A. et al. A history of scanning electron microscopy developments: Towards “wet-STEM” imaging. **Micron**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 390–401, 2007.

BUZGAR, N.; APOPEI, A. I. The Raman study of certain carbonates. **Anal. Șt. Univ. „Al. I.**

Cuza” Iași, , n. 2, p. 97–112, 2009.

CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Evaluation of cationic polymer-coated nanocapsules as ocular drug carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 153, n. 1, p. 41–50, 1997.

CAMPOS, E. V. R.; DE OLIVEIRA, J. L. DE; FRACETO, L. F. Applications of Controlled Release Systems for Fungicides, Herbicides, Acaricides, Nutrients, and Plant Growth Hormones: A Review. **Advanced Science, Engineering and Medicine**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 373–387, 2014. Disponível em: <<http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=21646627&volume=6&issue=4&spage=373>>.

CAMPOS, E. V. R.; DE OLIVEIRA, J. L. DE; SILVA, C. M. G. DA; et al. Polymeric and Solid Lipid Nanoparticles for Sustained Release of Carbendazim and Tebuconazole in Agricultural Applications. **Scientific reports**, v. 5, n. August, p. 13809, 2015. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.nature.com/srep/2015/150908/srep13809/full/srep13809.html>>.

CARDELL, C.; GUERRA, I. An overview of emerging hyphenated SEM-EDX and Raman spectroscopy systems: Applications in life, environmental and materials sciences. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 77, p. 156–166, 2016. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2015.12.001>>.

CHEN, C.; TAI, C. Y. Competing effects of operating variables in the synthesis of CaCO₃ particles using the reverse microemulsion technique. **Chemical Engineering Science**, v. 65, n. 16, p. 4761–4770, 2010. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ces.2010.05.019>>.

DE, A.; BOSE, R.; KUMAR, A.; MOZUMDAR, S. **Targeted Delivery of Pesticides Using Biodegradable Polymeric Nanoparticles**. New Delhi, India: Springer, 2014.

DIZAJ, S. M.; BARZEGAR-JALALI, M.; HOSSEIN ZARRINTAN, M.; ADIBKIA, K.; LOTFIPOUR, F. Calcium carbonate nanoparticles; Potential in bone and tooth disorders. **Pharmaceutical Sciences**, v. 20, n. 4, p. 175–182, 2015.

DIZAJ, S. M.; BARZEGAR-JALALI, M.; ZARRINTAN, M. H.; ADIBKIA, K.; LOTFIPOUR, F. Calcium carbonate nanoparticles as cancer drug delivery system. **Exp Opin Drug Deliv**, v. 12, p. 1649–1660, 2015.

DIZAJ, S. M.; LOTFIPOUR, F.; BARZEGAR-JALALI, M.; ZARRINTAN, M. H.; ADIBKIA, K. Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. **Materials Science & Engineering C**, Elsevier B.V. 2014.

DIZAJ S. M, LOTFIPOUR F, BARZEGAR-JALALI M., ZARRINTAN M-H, ADIBKIA K. Ciprofloxacin HCl-loaded calcium carbonate nanoparticles: preparation, solid state characterization, and evaluation of antimicrobial effect against *Staphylococcus aureus*. **Artif Cells Nanomed Biotechnol**, [s. l.], v. 45, n. 3, p. 535–543, 2017.

DONATAN, S.; YASHCHENOK, A.; KHAN, N.; et al. Loading Capacity versus Enzyme Activity in Anisotropic and Spherical Calcium Carbonate Microparticles. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 8, n. 22, p. 14284–14292, 2016.

DONG, Y.; YING, C.; LI-HONG, D.; YU-JIANG, Z. Controllable Synthesis of CaCO₃ Micro/Nanocrystals with Different Morphologies in Microemulsion. **Chemical Research in Chinese Universities**, v. 26, n. 20573017, p. 678–682, 2010. Disponível em: <<http://www.cqvip.com/qk/86071x/201005/35549480.html%5Cnhttp://www.cjcu.jlu.edu.cn/hxyj/EN/article/downloadArticleFile.do?attachType=PDF&id=13113>>.

DUHAN, Joginder Singh et al. Nanotechnology: The new perspective in precision agriculture. **Biotechnology Reports**, [s. l.], v. 15, n. May, p. 11–23, 2017.

ERIC, S. THE APPLICATION AND LIMITATIONS OF THE SEM-EDS METHOD IN FOOD AND TEXTILE TECHNOLOGIES *. **Advanced Technologies**, v. 6, n. 2, p. 5–10, 2017. Disponível em: <<http://www.tf.ni.ac.rs/casopis-arhiva/sveska6vol2/c1.pdf>>.

FANG, H.; WANG, Y.; GAO, C.; et al. Isolation and characterization of *Pseudomonas* sp. CBW capable of degrading carbendazim. **Biodegradation**, v. 21, n. 6, p. 939–946, 2010.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations (2017). **Pesticide use**. Disponível em :<<http://faostat3.fao.org/download/R/RP/E>>. Acesso em: 01 set. 2017.

FURINI, L. N.; CONSTANTINO, C. J. L.; SANCHEZ-CORTES, S.; OTERO, J. C.; LÓPEZ-TOCÓN, I. Adsorption of carbendazim pesticide on plasmonic nanoparticles studied by surface-enhanced Raman scattering. **JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE**, v. 465, p. 183–189, 2016. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2015.11.045>>.

GABRIELLI, C.; JAOUHARI, R.; JOIRET, S.; MAURIN, G. In situ Raman spectroscopy applied to electrochemical scaling. Determination of the structure of vaterite. **JOURNAL OF RAMAN SPECTROSCOPY**, v. 501, n. 31, p. 497–501, 2000.

GALA, U.; CHAUHAN, H. Principles and applications of Raman spectroscopy in pharmaceutical drug discovery and development. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 10, n. 2, p. 187–206, 2015. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17460441.2015.981522>>.

GANDHIMATHI, R.; VIJAYARAJ, S.; JYOTHIRMAIE, M. P. Analytical process of drugs by ultraviolet (UV). **International Journal of Pharmaceutical Research& Analysis**, v. 2, n. 2, p. 72–78, 2012.

GARCÍA-BETANCOURT, M. L.; RAHIER, H.; ASSCHE, G. VAN. **Chapter 9 – Physicochemical characterization of nanomaterials: polymorph, composition, wettability, and thermal stability**. Elsevier Inc., 2018.

GAUTAM, R.; SAMUEL, A.; SIL, S.; et al. Raman and mid-infrared spectroscopic imaging: applications and advancements. **Current Science**, v. 108, n. 3, p. 341–356, 2015.

GE, X.; HUANG, Z.; TIAN, S.; HUANG, Y.; ZENG, C. Complexation of carbendazim with hydroxypropyl- β -cyclodextrin to improve solubility and fungicidal activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 1, p. 208–212, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.02.072>>.

GEORGIEVA, A.; BOGDANOV, B.; STEFANOV, Z.; KOLEVA, D. Microemulsion water-in-oil (W / O) – microreactor for synthesis of ultrafine carbonate nanostructures. **НАУЧНИ ТРУДОВЕ НА РУСЕНСКИЯ УНИВЕРСИТЕТ**, p. 34–38, 2011.

GHADAM, G. J. Characterization of CaCO₃ Nanoparticles Synthesized by Reverse Microemulsion Technique in Different Concentrations of Surfactants. **Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, v. 32, n. 3, p. 27–35, 2013.

GUPTA, A.; ERAL, H. B.; HATTON, T. A.; DOYLE, P. S. Nanoemulsions: Formation, properties and applications. **Soft Matter**, v. 12, n. 11, p. 2826–2841, 2016. Royal Society of Chemistry.

GUPTA, G. K.; SHARMA, S. K.; RAMTEKE, R. Biology, Epidemiology and Management of

the Pathogenic Fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with Special Reference to Charcoal Rot of Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **Journal of Phytopathology**, v. 160, n. 4, p. 167–180, 2012.

HARUTA S, HANAFUSA T, FUKASE H, MIYAJIMA H, OKI T. 2003. An effective absorption behavior of insulin for diabetic treatment following intra- nasal delivery using porous spherical calcium carbonate in monkeys and healthy human volunteers. **Diabet Technol Therapeut.** 5:1–9

HASSAN, T. A.; RANGARI, V. K.; FALLON, V.; et al. Mechanochemical and Sonochemical Synthesis of Bio-Based Nanoparticles. **NSTI-Nanotech** 2010, v. 3, p. 278–281, 2010. Disponível em: <www.nsti.org>.

JAHANGIRI, A.; DAVARAN, S.; FAYYAZI, B.; et al. Application of electrospraying as a one-step method for the fabrication of triamcinolone acetonide-PLGA nanofibers and nanobeads. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2014. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.09.019>>.

JEONG, Y. IL; NA, H. S.; SEO, D. H.; et al. Ciprofloxacin-encapsulated poly(dl-lactide-co-glycolide) nanoparticles and its antibacterial activity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, n. 1–2, p. 317–323, 2008.

KAH, M.; BEULKE, S.; TIEDE, K.; HOFMANN, T. Nanopesticides: State of knowledge, environmental fate, and exposure modeling. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 43, n. 16, p. 1823–1867, 2013.

KAMBA, S. A.; ISMAIL, M.; HUSSEIN-AL-ALI, S. H.; et al. In Vitro Delivery and Controlled Release of Doxorubicin for Targeting Osteosarcoma Bone Cancer. **Molecules**, v. 18, p. 10580–10598, 2013.

KANG, S. H.; HIRASAWA, IZUMI, W.-S. K.; CHOI, C. K. Morphological control of calcium carbonate crystallized in reverse micelle system with anionic surfactants SDS and AOT. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 288, p. 496–502, 2005.

KAUSHIK, P.; SHAKIL, N. A.; KUMAR, J.; et al. Development of controlled release formulations of thiram employing amphiphilic polymers and their bioefficacy evaluation in seed quality enhancement studies. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 48, n. 8, p. 677–685, 2013.

KIRBOGA, S.; ONER, M. Effect of the experimental parameters on calcium carbonate precipitation. **Chemical Engineering Transactions**, v. 32, p. 2119–2124, 2013.

KOGURE, T. **Electron Microscopy**. 2nd ed. Elsevier Ltd., 2013.

KOLI, P.; SINGH, B. B.; SHAKIL, N. A.; KUMAR, J.; KAMIL, D. Development of controlled release nanoformulations of carbendazim employing amphiphilic polymers and their bioefficacy evaluation against *Rhizoctonia solani*. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 50, n. 9, p. 674–681, 2015.

KUMAR, J.; SHAKIL, N. A.; SINGH, M. K.; et al. Development of controlled release formulations of azadirachtin-A employing poly(ethylene glycol) based amphiphilic copolymers. **Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes**, v. 45, n. 4, p. 310–314, 2010.

KUMAR, S.; BHANJANA, G.; SHARMA, A.; SIDHU, M. C.; DILBAGHI, N. Synthesis, characterization and on field evaluation of pesticide loaded sodium alginate nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, n. 1, p. 1061–1067, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.025>>.

LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced drug delivery reviews**, v. 45, n. 1, p. 89–121, 2000.

LIU, D.; YATES, M. Z. Formation of Rod-Shaped Calcite Crystals by Microemulsion-Based Synthesis. **Langmuir**, v. 22, n. 13, p. 5566–5569, 2006.

LOHA, K. M.; SHAKIL, N. A.; KUMAR, J.; SINGH, M. K.; SRIVASTAVA, C. Bio-efficacy evaluation of nanoformulations of β -cyfluthrin against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 47, n. 7, p. 687–691, 2012.

LOY, Chee Wah et al. Effects of Calcination on the Crystallography and Nonbiogenic Aragonite Formation of Ark Clam Shell under Ambient Condition. **Advances in Materials Science and Engineering**, [s. l.], v. 2016, p. 8, 2016.

MALIK, M. A.; WANI, M. Y.; HASHIM, M. A. Microemulsion method: A novel route to synthesize organic and inorganic nanomaterials. 1st Nano Update. **Arabian Journal of**

Chemistry, v. 5, n. 4, p. 397–417, 2012. King Saud University. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.09.027>>.

MAME P. SARR, M'BAYE NDIAYE, JOHANNES Z. GROENEWALD, P. W. C. Genetic diversity in *Macrophomina phaseolina*, the causal agent of charcoal rot. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 53, n. 2, p. 250–268, 2014.

MÄNTELE, W.; DENIZ, E. UV–VIS absorption spectroscopy: Lambert-Beer reloaded. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 173, p. 965–968, 2017. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2016.09.037>>.

MARGNI, M.; ROSSIER, D.; CRETTEZ, P.; JOLLIET, O. Life cycle impact assessment of pesticides on human health and ecosystems. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 93, n. 1, p. 379–392, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016788090100336X>>.

MARTÍNEZ-VILLARREAL, R.; GARZA-ROMERO, T. S.; MORENO-MEDINA, V. R.; HERNÁNDEZ-DELGADO, S.; MAYEK-PÉREZ, N. Bases bioquímicas de la tolerancia al estrés osmótico en hongos fitopatógenos: el caso de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 48, n. 4, p. 347–357, 2016. Elsevier España, S.L.U. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2016.05.004>>.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: Terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, v. 8, n. 6, p. 1719–1729, 2012.

MD NURUZZAMAN, MOHAMMAD MAHMUDUR RAHMAN, YANJU LIU, R. N. Nanoencapsulation , Nano-Guard for Pesticides : A New Window for Safe Application. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, 2016.

MOGUL, M. G.; AKIN, H.; HASIRCI, N.; et al. Controlled release of biologically active agents for purposes of agricultural crop management. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 16, n. 1–4, p. 289–320, 1996.

MOHANRAJ, V.; CHEN, Y. Nanoparticles – A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research Trop J Pharm Res**, v. 5, n. June, p. 561–573, 2006. Disponível em: <<http://www.tjpr.freehosting.net>>.

MONGABAY. **O problema do envenenamento por pesticidas no Brasil representa um dilema global, dizem os críticos**. 2018. Disponível em: <<https://pt.mongabay.com/2018/08/o-problema-do-envenenamento-por-pesticidas-no-brasil-representa-um-dilema-global-dizem-os-criticos/>>. Acesso em: fev. 2019.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p. 113–142, 2010.

MUÑOZ-ESPÍ, R.; WEISS, C. K.; LANDFESTER, K. Inorganic nanoparticles prepared in miniemulsion. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, n. 4, p. 212–224, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359029412000544>>.

MYCOBANK. **Macrophomina phaseolina**. Disponível em: <http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&MycoBankNr_=274190>. Acesso em: 01 ago. 2017.

NEGI, G., PANKAJ; SRIVASTAVA, A.; SHARMA, A. In situ Biodegradation of Endosulfan, Imidacloprid, and Carbendazim Using Indigenous Bacterial Cultures of Agriculture Fields of Uttarakhand, India. **International Journal of Biological, Veterinary, Agricultural and Food Engineering**, [s. l.], v. 8, n. 9, p. 973–981, 2014.

NEWBURY, D. E.; RITCHIE, N. W. M. Is scanning electron microscopy/energy dispersive X-ray spectrometry (SEM/EDS) quantitative? **Scanning**, v. 35, n. 3, p. 141–168, 2013.

NJUGUNA, J.; VANLI, O. A.; LIANG, R. A Review of Spectral Methods for Dispersion Characterization of Carbon Nanotubes in Aqueous Suspensions. **Journal of Spectroscopy**, v. 2015, 2015.

PANG, S.; YANG, T.; HE, L. Review of surface enhanced Raman spectroscopic (SERS) detection of synthetic chemical pesticides. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 85, p. 73–82, 2016. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2016.06.017>>.

PARAKHONSKIY, B.; ZYUZIN, M. V; YASHCHENOK, A.; et al. The influence of the size and aspect ratio of anisotropic, porous CaCO₃ particles on their uptake by cells. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 13, n. 1, p. 53, 2015. BioMed Central. Disponível em: <<http://www.jnanobiotechnology.com/content/13/1/53>>.

PLAVSIC, B.; KOBE, S.; OREL, B. IDENTIFICATION OF CRYSTALLIZATION FORMS OF CaCO_3 WITH FTIR SPECTROSCOPY. **Kovine zlitine tehnologije**, v. 33, n. 6, p. 517–521, 1999.

POELVOORDE, L. VAN. **CALCIUM CARBONATE-BASED PARTICLES AND CAPSULES FOR THERAPEUTIC ENZYMES**, 2017. Universiteit Gent. Disponível em: <https://lib.ugent.be/fulltxt/RUG01/002/352/129/RUG01-002352129_2017_0001_AC.pdf>. .

PREGO, C.; FABRE, M.; TORRES, D.; ALONSO, M. J. Efficacy and mechanism of action of chitosan nanocapsules for oral peptide delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 3, p. 549–556, 2006.

PUBCHEM COMPOUND DATABASE. National Center for Biotechnology Information. **Carbendazim**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/25429#section=Top>>. Acesso em: 03 jun. 2017.

QIAN, K.; SHI, T.; TANG, T.; ZHANG, S. Preparation and characterization of nano-sized calcium carbonate as controlled release pesticide carrier for validamycin against *Rhizoctonia solani*. **Microchim Acta**, , n. 2, p. 51–57, 2011.

RITIKA GUPTA. **Synthesis of Precipitated Calcium Carbonate Nanoparticles Using Modified Emulsion Membranes** Master of Science in Paper Science Engineering, 2004. Disponível em: <<http://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.pdf>>.

ROBERTS, T. R.; HUTSON, D. H. **Metabolic Pathways of Agrochemicals. Part 2: Insecticides and Fungicides**. 1999.

ROCK, M. L.; TRANCHITELLA, L. J.; PILATO, R. S. Control of calcium carbonate particle size and shape by precipitation from CTAB / alcohol / hexadecane mixtures. **Colloid Polym Sci**, v. 896, n. 275, p. 893–896, 1997.

ROSTRON, P.; GABER, S.; GABER, D. Raman Spectroscopy, a review Raman Spectroscopy, Review. **International Journal of Engineering and Technical Research**, v. 0869, n. November, p. 50–64, 2016.

ROY, A.; SINGH, S. K.; BAJPAI, J.; BAJPAI, A. K. Controlled pesticide release from biodegradable polymers. **Central European Journal of Chemistry**, v. 12, n. 4, p. 453–469, 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.2478/s11532-013-0405-2>>.

SALOMÃO, R.; COSTA, L. M. M.; OLYVEIRA, G. M. De. Precipitated Calcium Carbonate Nano-Microparticles: Applications in Drug Delivery. **Advances in Tissue Engineering & Regenerative Medicine: Open Access**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 336–340, 2017. Disponível em: <http://medcraveonline.com/ATROA/ATROA-03-00059.php>.

SANDHYA; KUMAR, S.; KUMAR, D.; DILBAGHI, N. Preparation, characterization, and bio-efficacy evaluation of controlled release carbendazim-loaded polymeric nanoparticles. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 1, p. 926–937, 2017. Environmental Science and Pollution Research. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11356-016-7774-y>>.

SCHAFFAZICK, S. R.; SIQUEIRA, I. R.; BADEJO, A. S.; et al. Incorporation in polymeric nanocapsules improves the antioxidant effect of melatonin against lipid peroxidation in mice brain and liver. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 64–71, 2008.

SCHULMAN, JACK H., STOECKENIUS, WALTER AND PRINCE, L. M. By Electron Mechanism of Formation and Structure of Micro Emulsions. **Structure of Micro Emulsions by Electron Microscopy**, v. 654, n. 9, p. 1677, 1959.

SCIMECA, M.; BISCHETTI, S.; LAMSIRA, H. K.; BONFIGLIO, R.; BONANNO, E. Energy Dispersive X-ray (EDX) microanalysis: A powerful tool in biomedical research and diagnosis. **European Journal of Histochemistry**, v. 62, n. 1, 2018. Disponível em: <<http://www.ejh.it/index.php/ejh/article/view/2841>>.

SHAFIU KAMBA, A.; ISMAIL, M.; TENGKU IBRAHIM, T. A.; ZAKARIA, Z. A. B. Synthesis and characterisation of calcium carbonate aragonite nanocrystals from cockle shell powder (*Anadara granosa*). **Journal of Nanomaterials**, v. 2013, 2013.

SHAKIL, N. A.; SINGH, M. K.; PANDEY, A.; et al. Development of poly(ethylene glycol) based amphiphilic copolymers for controlled release delivery of carbofuran. **Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry**, v. 47, n. 3, p. 241–247, 2010.

SHEN, Yuhua et al. Controlled synthesis of calcium carbonate nanocrystals with multi-morphologies in different bicontinuous microemulsions. **Materials Science and Engineering A**, [s. l.], v. 443, n. 1–2, p. 95–100, 2007.

SINGH, K. S.; MAJIK, M. S.; TILVI, S. **Vibrational Spectroscopy for Structural Characterization of Bioactive Compounds**. Elsevier B.V., 2014.

SINGH, S.; SINGH, N.; KUMAR, V.; et al. Toxicity, monitoring and biodegradation of the fungicide carbendazim. **Environmental Chemistry Letters**, v. 14, n. 3, p. 317–329, 2016. Springer International Publishing.

SONG, K. C.; KIM, J. H. Synthesis of high surface area tin oxide powders via water-in-oil microemulsions. **Powder Technology**, v. 107, p. 268–272, 2000.

TAI, C. Y.; CHEN, C. Particle morphology, habit, and size control of CaCO₃ using reverse microemulsion technique. **Chemical Engineering Science**, v. 63, p. 3632–3642, 2008.

TESSAROLO, Louise Donadello et al. Nanoencapsulation of benznidazole in calcium carbonate increases its selectivity to Trypanosoma cruzi. **Parasitology**, [s. l.], v. 145, n. 9, p. 1191–1198, 2018.

TRIBUNA DO NORTE. **Conab prevê crescimento na safra de grão no RN**. Natal, 2017. Disponível em: <<http://www.tribunadonorte.com.br/noticia/conab-preva-crescimento-na-safra-de-gra-os-no-rn/387702>>. Acesso em: fev. 2019.

TRIBUNA DO NORTE. **IBGE: produção agrícola do RN aumentou 11,5% em 2017 em relação a 2016**. Natal, 2018. Disponível em: <<http://www.tribunadonorte.com.br/noticia/ibge-produca-a-o-agra-cola-do-rn-aumentou-11-5-em-2017-em-relaa-a-o-a-2016/424071>>. Acesso em: fev. 2019.

UENO, Y.; FUTAGAWA, H.; TAKAGI, Y.; UENO, A.; MIZUSHIMA, Y. Drug-incorporating calcium carbonate nanoparticles for a new delivery system. **Journal of Controlled Release**, v. 103, p. 93–98, 2005.

UKRAINCZYK, M.; KONTREC, J.; KRALJ, D. Precipitation of different calcite crystal morphologies in the presence of sodium stearate. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 329, n. 1, p. 89–96, 2009. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2008.09.045>>.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. **Reregistration Eligibility Decision Database for thiophanate-methyl**. Outubro de 2005. Disponível em: <

https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/red_PC-102001_1-Nov-04.pdf>. Acesso em 22 jul. 2018.

VIJAYAN, N. et al. Growth and characterization of benzimidazole single crystals: A nonlinear optical material. **Journal of Crystal Growth**, [s. l.], v. 262, n. 1–4, p. 490–498, 2004.

VIRAVADYA, C.; LI, M.; MANN, S. Microemulsion-based synthesis of stacked calcium carbonate (calcite) superstructures. **The Royal Society of Chemistry**, p. 2182–2183, 2004.

WANG, D.; JIA, M.; WANG, L.; et al. Chitosan and β -cyclodextrin-epichlorohydrin polymer composite film as a plant healthcare material for carbendazim-controlled release to protect rape against sclerotinia sclerotiorum (lib.) de bary. **Materials**, v. 10, n. 4, 2017

WEIR, C. E.; LIPPINCOTT, E. R. Infrared Studies of Aragonite , Calcite , and Vaterite Type Structures in the Borates , Carbonates , and Nitrates. **JOURNAL OF RESEARCH of the National Bureau of Standards-A. Physics and Chemistry**, v. 65, n. 3, p. 173–183, 1961.

WHO. World Health Organization. INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. **ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA n° 149 – carbendazim**, 1993. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc149.htm>. Acesso em 22 jul. 2018.

XU, B. **Assessing different types of disorder in carbonate minerals with vibrational spectroscopy**, 2015. School of Graduate Studies - Memorial University of Newfoundland.

Y. H. CHO, S. KIM, E. K. BAE, C. K. MOK, A. J. P. Formulation of a Cosurfactant-Free O / W Microemulsion Using Nonionic. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 3, p. 115–121, 2008.

YU, J.; ZHAO, X.; CHENG, B.; ZHANG, Q. Controlled synthesis of calcium carbonate in a mixed aqueous solution of PSMA and CTAB. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 178, p. 861–867, 2005.

YU, T.; BIYING, D. U.; LINGANG, L. I.; JUN, Y.; YUANMING, Z. Effects of Tx-100-SDS on crystal growth of calcium carbonate in reverse microemulsion solution. **Chinese Science Bulletin**, v. 52, n. 39213, p. 1–6, 2007.

YUSOFF, S. N. M.; KAMARI, A.; ALJAFREE, N. F. A. A review of materials used as carrier agents in pesticide formulations. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 13, n. 12, p. 2977–2994, 2016. Springer Berlin Heidelberg.