UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

NANOTECNOLOGIA APLICADA À ELABORAÇÃO DE CARRAPATICIDAS SINTÉTICOS ASSOCIADOS A COMPOSTOS VEGETAIS PARA O CONTROLE DE *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*

Amanda Figueiredo

Médica Veterinária

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

NANOTECNOLOGIA APLICADA À ELABORAÇÃO DE CARRAPATICIDAS SINTÉTICOS ASSOCIADOS A COMPOSTOS VEGETAIS PARA O CONTROLE DE *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*

Amanda Figueiredo

Orientadora: Profa. Dra. Ana Carolina de Souza Chagas

Coorientador: Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (área de Medicina Veterinária Preventiva).

2020

F475n

Figueiredo, Amanda

Nanotecnologia aplicada à elaboração de carrapaticidas sintéticos associados a compostos vegetais para o controle de Rhipicephalus (Boophilus) microplus / Amanda Figueiredo. -- Jaboticabal, 2020

125 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Ana Carolina de Souza Chagas

Coorientadora: Leonardo Fernandes Fraceto

1. Carrapato. 2. Resistência à drogas. 3. Compostos bioativos. 4. Nanopartículas. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: NANOTECNOLOGIA APLICADA À ELABORAÇÃO DE CARRAPATICIDAS SINTÉTICOS ASSOCIADOS A COMPOSTOS VEGETAIS PARA O CONTROLE DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

AUTORA: AMANDA FIGUEIREDO
ORIENTADORA: ANA CAROLINA DE SOUZA CHAGAS
COORIENTADOR: LEONARDO FERNANDES FRACETO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Medicina Veterinária Preventiva pela Comissão Examinadora:

Ana Carolina Chagas

Pesquisadora Dra. ANA CAROLINA DE SOUZA CHAGAS (Participação Virtual)
EMBRAPA / São Carlos/SP

Ana Carolina Chagas P/

Dr. JHONES LUIZ DE OLIVEIRA (Participação Virtual)
Unesp - ICT Sorocaba

Ana Carolina Chagas P/

Profa. Dra. DARCI MORAES BARROS-BATTESTI (Participação Virtual)
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV-UNESP / Câmpus de Jaboticabal

Ana Carolina Chagas P/

Dr. WILLIAN GIQUELIN MACIEL (Participação Virtual)
CPPAR / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Ana Carolina Chagas P/

Pesquisador Dr. ALESSANDRO PELEGRINE MINHO (Participação Virtual)
Departamento Sanidade Animal/Embrapa Pecuária Sudeste-CPPSE / São Carlos/SP

Jaboticabal, 03 de dezembro de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

AMANDA FIGUEIREDO – nascida em 09 de abril de 1989 em Londrina-PR. Médica Veterinária graduada pela Universidade Estadual do Norte do Paraná – UENP, Campus Luiz Meneghel, Bandeirantes-PR, em julho de 2014. Durante a graduação, foi aluna de Iniciação Científica pelo Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (modalidades PIBIC e PIBIC voluntário), sob a orientação da Profa. Dra. Erika Cosendey Toledo de Mello Peixoto, com a monografia intitulada: "Aplicação de *Cymbopogon winterianus* Jowitt e *Azadirachta indica* A. Juss no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*". A titulação de Mestre foi obtida pelo Programa de Pós-Graduação (PPG) em Medicina Veterinária (área de Medicina Veterinária Preventiva) da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, Jaboticabal-SP, em fevereiro de 2017, sob a orientação da Profa. Dra. Ana Carolina de Souza Chagas, mediante a dissertação: "Avaliação dos efeitos de princípios fitoterápicos e homeopáticos no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e comparação de técnicas para estimativa de eclosão de larvas *in vitro*". Durante o mestrado foi bolsista CNPq e a partir dos estudos desenvolvidos, três artigos foram publicados: "*In vivo* study of a homeopathic medicine against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in dairy cow", "First report of the effect of *Ocotea elegans* essential oil on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*"; e "Comparative study of hatching estimation methods of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs". Em março de 2017 ingressou no curso Doutorado pelo mesmo PPG e sob a mesma orientação, recebeu auxílio da empresa Ipanema Ltda., posteriormente do CNPq, até a aprovação da bolsa FAPESP. A pesquisa desenvolvida durante esse período gerou a tese de doutorado aqui apresentada, a qual segue as linhas de pesquisa da graduação e do mestrado, buscando alternativas para o controle do carrapato *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* em bovinos.

EPÍGRAFE

Há na vida momentos privilegiados nos quais parece que o Universo se ilumina, que a nossa vida nos revela sua significação, que nós queremos o destino mesmo que nos coube como se nós próprios o tivéssemos escolhido. Depois o Universo volta a fechar-se, tornamo-nos novamente solitários e miseráveis, já não caminhamos senão tateando por um caminho obscuro onde tudo se torna obstáculo a nossos passos. A sabedoria consiste em conservar a lembrança desses momentos fugitivos, em saber fazê-los reviver e fazer deles a trama da nossa existência cotidiana e, por assim dizer, a morada habitual do nosso espírito.

Louis Lavelle

DEDICATÓRIA

Ao Pai Celestial
e aos *meus pais*,
pelo eterno amor por mim,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Pai Celestial, por me proporcionar força e coragem para ir à luta de cada dia, iluminar a minha inteligência e vontade de vencer. Sou grata por ter me permitido chegar até aqui. À Nossa Mãe Santíssima, por me conceder infinitas graças. À Sta. Teresinha do Menino Jesus e à Sto. Padre Pio que, além de serem minhas maiores fontes de inspiração de vida, já me deram sinais concretos de que intercedem por mim.

Aos meus pais, Sidnei Figueiredo e Maria do Carmo Figueiredo, que sempre estiveram ao meu lado proporcionando crescimento, suporte espiritual e incentivo. Sou grata por todos os esforços, principalmente nesse último ano do doutorado. Aos meus irmãos (Lucas Figueiredo e Francisco Figueiredo Netto) e cunhadas (Evelin Paiva Figueiredo e Gisele Durigon Figueiredo), pelo carinho, torcida e apoio para a finalização desse curso; E aos meus sobrinhos (Vicente Durigon Figueiredo e Mário Durigon Figueiredo) que, a cada sorriso, trazem mais alegria para as nossas vidas.

A todos os meus familiares, em especial à minha avó materna Maria Correia dos Santos que, aos seus 93 anos de idade, reza o terço todos os dias e sempre me inclui em suas orações. Às minhas tias Belinha dos Santos, Clarice dos Santos e Olga Watanabe (do coração) a quem devo gratidão, pelo carinho e por sempre terem me ajudado muito, e à minha prima Mirian dos Santos Calmezini, pelo companheirismo.

Às minhas queridas amigas Kacieli Villa e Tauana Fernandes Francisco, pelo imenso carinho, pelas vibrações positivas e por terem compreendido os motivos da minha ausência nesses últimos anos de estudo. À minha querida amiga Nayara Ferraro Correa (*in memoriam*), que partiu há poucos dias, por ter me proporcionado momentos tão doces na infância, e a quem fiquei devendo uma visita. Espero reencontrá-la um dia com a mesma alegria de sempre.

Aos meus queridos amigos Lucas Alves da Silva, Ana Cristina Santos Lopes, Caroline Barbosa Lima, Elka Machado Ferreira, com os quais sempre pude contar com palavras de apoio, orações, incentivo, conselhos e presença constante em minha vida, apesar da distância.

Aos meus amigos Claudiney Victor Bastos e sua esposa Sandra, pelo carinho, acolhida e, sobretudo, orações.

Aos meus queridos amigos de faculdade Barbara Cristina Boelman Verburg, Tainá Rodrigues dos Santos e Angélica Laís Sarmento, pelo carinho, compreensão da minha distância e torcida pela conclusão desse curso. Em especial, ao Fausto de Almeida Marinho Neto que me acolheu e ajudou muito durante o período em que morei em Jaboticabal para a realização de etapas desse curso na Universidade.

Às queridas amigas que conheci em Jaboticabal, Karina Kamachi Kobashigawa (que sempre me acolheu com muito carinho, pela disposição em me ajudar e fazer tudo o que estava ao seu alcance para me ver bem) e à Paloma do Espírito Santo Silva (que, apesar da distância, sempre me acolheu com o mesmo carinho, me ajudou muito e, inclusive, permitiu que eu adotasse a sua mãe).

À Maria Teresa Moretti (mãe da Paloma), que se tornou uma grande amiga com quem sempre pude contar em São Carlos. Sou grata pelo carinho, pela disposição em me ajudar, por ter me proporcionado ótimos momentos em sua companhia e conversas construtivas, além de ter me incentivado muito na conclusão desse curso.

Ao meu querido professor Mauro Pacífico, por sempre ter me motivado, principalmente quando eu mais precisei. Ao meu querido amigo Gilberto Teixeira Matado, com quem sempre pude contar em tudo. Sou muito grata.

À minha orientadora da graduação e amiga Erika Cosendey Toledo de Mello Peixoto, por todo incentivo e apoio oferecido sempre. Sem ela eu não teria iniciado esta jornada.

Ao meu querido professor e amigo Gilson Pereira de Oliveira, pelo carinho, disposição e prontidão em me ajudar em tudo.

Ao meu querido amigo Tiago Maretti Gonçalves, com quem sempre pude contar, o qual esteve ao meu lado quando eu mais precisei, me motivando, me dando suporte, aconselhando, muitas vezes me fazendo acreditar em mim mesma e tornando minha vida mais leve com a sua alegria contagiante.

Aos meus colegas e companheiros da Embrapa Rodrigo Giglioti, Isabella Barbosa dos Santos, Yousmel Alemán Gainza, Marei Borsch von Haehling, Naiana Barbosa Dinato, Louyse Gabrielli Lopes, Luciana Aparecida Giraldelo, João Henrique Barbosa Toscano, Alessandra da Silva Nucci, Leonardo Aparecido Lima dos Santos,

Gustavo Avelar Sousa, Luís Adriano Anholeto e Rafaela Regina Fantatto, que muito me ajudaram no decorrer desse curso.

À todos os servidores da Embrapa Pecuária Sudeste – CPPSE, em especial ao Gilberto César Agostinho, Verônica Schinaider do Amaral, Dra. Teresa Cristina Alves, Eduardo Luiz de Oliveira, Leni Rosendo Pinto, Benedito Aparecido da Silva, José Cosme Machado, Jose Carlos Didoné, Márcio Dias Rabelo, Ane Lisye Fiala Garcia Silvestre, Dra. Cíntia Hiromi Okino, Dr. Waldomiro Barioni Júnior, Natal Sylvestre, Dra. Márcia Cristina de Sena Oliveira, Silvia Helena Piccirillo Sanchez, Dr. Alexandre Berndt, Rafael Rosendo, Valdemir Rosendo, Dr. João Oiano Neto, Dr. Gilberto Batista de Souza, Juliana Gonçalves Costa, Dra. Flavia Aline Bressani Donatoni, Dr. Sérgio Novita Esteves, Dr. Wilson Malagó Júnior, Dr. Alessandro Pelegrine Minho, pela colaboração, disposição em me ajudar e por toda atenção à mim dispensada.

Ao Diego Faria Cola e à Patrícia Luiza de Freitas Proença, pela parceria, colaboração, e por estarem sempre dispostos a me ensinar e ajudar.

Em especial, à Dra. Ana Carolina de Souza Chagas, pela oportunidade concedida, por ter acreditado no meu potencial para a realização desse curso, pela orientação, conhecimento transmitido, pela consideração, carinho, paciência e, principalmente, por ter me proporcionado crescimento pessoal. Sem ela eu definitivamente não teria chegado até aqui.

Ao Dr. Leonardo Fernandes Fraceto, pela coorientação e colaboração no projeto desenvolvido. Cabe aqui ressaltar que, diante da indisponibilidade de bolsas de estudo pela Universidade, o Dr. Leonardo e a Dra. Ana Carolina buscaram uma alternativa junto à Empresa Ipanema Ltda. que financiou parte desses estudos. Sou muito grata.

À Embrapa Pecuária Sul – CPPSul e à Dra. Cláudia Cristina Gulias Gomes, pela gentileza em ceder larvas de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* para parte da realização deste trabalho.

À Embrapa Gado de Leite e, em especial, à Dra. Marcia Cristina de Azevedo Prata, pela gentileza de realizar Testes de Sensibilidade de Carrapatos a Carrapaticidas, colaborando com esse estudo.

À Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Campus de Jaboticabal e Campus de Sorocaba, pela infraestrutura disponibilizada para a

realização das diversas etapas desse curso de doutorado, bem como aos seus servidores, pelo atendimento e serviços prestados.

À Embrapa Pecuária Sudeste – CPPSE, por ter disponibilizado toda a infraestrutura necessária para a realização da parte experimental deste estudo.

À Empresa Ipanema Ltda., pela concessão de dez meses de bolsa de estudos, o que foi um grande suporte até serem disponibilizadas por um órgão de fomento.

Ao Conselho de Desenvolvimento Nacional Científico – CNPq, pela concessão de seis meses de bolsa de estudos (Processo n°: 169777/2017-0).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão de trinta e dois meses de bolsa de estudos (Processo n°: 2017/13249-8), além dos recursos da reserva técnica, o que viabilizou parte considerável dos experimentos e a minha ida aos Estados Unidos para a apresentação de um trabalho referente a estes estudos.

Aos membros da banca, Dra. Darci Moraes Barros-Battesti, Dr. Willian Giquelin Maciel, Dr. Jhones Luiz de Oliveira e Dr. Alessandro Pelegrine Minho, que prontamente aceitaram o convite e se dispuseram a colaborar e contribuir para o resultado final desta tese de doutorado.

Por último, mas não menos importante, agradeço a todos os brasileiros que pagam seus impostos, permitindo, dessa forma, o investimento em estudos como este.

Muito obrigada!

Sumário

Certificado do Comitê de Ética iv
RESUMO v
Palavras-chave vi
ABSTRACT vii
Keywords viii
Lista de Abreviaturas ix
Lista de Tabelas xi
Lista de Figuras xii
CAPÍTULO 1 - Considerações gerais 1
1. Introdução 1
2. Revisão de literatura 2
2.1 *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* e consequências de seu parasitismo 2
2.2 Controle do carrapato *Rhipicephalus microplus* 7
2.2.1 Cipermetrina 7
2.2.2 Clorpirifós 9
2.2.3 Compostos vegetais (citral, mentol e limoneno) 10
2.3 Período de carência 12
2.4 Resíduos carrapaticidas 14
2.5 Resistência de *Rhipicephalus microplus* frente aos carrapaticidas 14
2.6 Associação de princípios ativos 15
2.7 Nanotecnologia e nanocarreadores 17
2.7.1 Nanocarreadores lipídicos 19
2.7.2 Nanopartículas de zeína 23
REFERÊNCIAS 25
CAPÍTULO 2 - Uso de nanocarreadores lipídicos no desenvolvimento de nanoformulações para controle de larvas de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* 41
Resumo 41
Palavras-chave 42
1. Introdução 42
2. Material e Métodos 44
2.1 Local e condições experimentais 44
2.2 Reagentes 44
2.3 Preparo de Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) e de Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN) 44
2.4 Quantificação dos princípios ativos e Determinação da Eficiência de

encapsulação 46
2.5 Caracterização das nanopartículas 47
2.5.1 Medidas de Diâmetro, Polidispersão e Potencial Zeta por 47
2.5.2 Medidas de Distribuição de Tamanho e Concentração das partículas por 47
2.5.3 Estabilidade lipídica (pH) 48
2.6 Diluições para o teste *in vitro* sobre *Rhipicephalus microplus* 48
2.6.1 Nanoformulações 48
2.6.2 Controle positivo 48
2.7 Teste de Pacote de larvas (TPL) 49
2.8 Análises estatísticas 50
3. Resultados 50
3.1 Caracterização e estabilidade das formulações de nanopartículas lipídicas ... 50
3.2 Teste de Pacote de Larvas (TPL) 57
4. Discussão 58
Conclusões 63
Agradecimentos 64
Referências 64
CAPÍTULO 3 - Nanopartículas de zeína em formulações carrapaticidas para controle de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* 72
Resumo 72
Palavras-chave 73
1. Introdução 73
2. Material e Métodos 74
2.1 Local e condições experimentais 74
2.2 Reagentes 74
2.3 Preparo das Nanopartículas de Zeína (NZ) 75
2.4 Quantificação dos princípios ativos e Determinação da Eficiência de encapsulação 76
2.5 Caracterização das nanopartículas 77
2.5.1 Medidas de Diâmetro, Polidispersão e Potencial Zeta por 77
2.5.2 Medidas de Distribuição de Tamanho e Concentração das partículas por 77
S 77
2.5.3 Estabilidade lipídica (pH) 78
2.6 Diluições para os testes *in vitro* sobre *Rhipicephalus microplus* 78
2.6.1 Nanoformulações de zeína 78
2.6.2 Controle positivo 78

2.7 Testes *in vitro* com as nanoformulações sobre *Rhipicephalus microplus* 79
2.7.1 Teste de Pacote de Larvas (TPL) 79
2.7.2 Atividade residual verificada por TPL.....79
2.7.3 Teste de Imersão de Adultos (TIA) 80
2.8 Análises estatísticas.....80
3. Resultados 81
3.1 Caracterização e estabilidade das formulações de nanopartículas de zeína...81
3.2 Teste de Pacote de Larvas (TPL) 85
3.3 Atividade residual verificada por Teste de Pacote de Larvas (TPL).....87
3.4 Teste de Imersão de Adultos (TIA) 88
4. Discussão 89
Conclusões 93
Agradecimentos 93
Referências.....93
CAPÍTULO 4 - Considerações finais 100

Certificado do Comitê de Ética

Embrapa

Pecuária Sudeste

CERTIFICADO

PRT N° 01/2019

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado: **Desenvolvimento de métodos alternativos para controle de ectoparasitos de interesse veterinário**, registrado com o nº 01/2019 sob a responsabilidade do pesquisador científico Alessandro Pelegrine Minho, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA EMBRAPA PECUÁRIA SUDESTE.

São Carlos, 18 de junho de 2019

Dra. Márcia Cristina de Sena Oliveira
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Embrapa Pecuária Sudeste

Reunião de 18/06/2019

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/07/2019 a 31/03/2022
Espécie/linhagem/raça	*Bos taurus raça Holandesa*
Nº de animais	34
Peso/Idade	200-300 kg
Sexo	Machos
Origem	Embrapa Pecuária Sudeste

NANOTECNOLOGIA APLICADA À ELABORAÇÃO DE CARRAPATICIDAS SINTÉTICOS ASSOCIADOS A COMPOSTOS VEGETAIS PARA O CONTROLE DE *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*

RESUMO – *Rhipicephalus microplus* causa quedas na produção e consequentes prejuízos econômicos à pecuária. A resistência aos acaricidas e o risco da presença de resíduos nos alimentos de origem animal têm impulsionado a busca por novas alternativas de controle. Vários compostos vegetais possuem potencial acaricida/repelente, porém, possuem limitações em sua aplicação. Nanocarreadores podem proteger esses compostos, aumentar sua solubilidade aquosa e biodisponibilidade, além de reduzir possíveis efeitos tóxicos. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi desenvolver formulações carrapaticidas a partir de Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS), Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN) e Nanopartículas de Zeína (NZ), associados à cipermetrina, clorpirifós e um composto vegetal (citral, mentol ou limoneno), caracterizar esses sistemas nanocarreadores e verificar sua atuação contra larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Nove formulações foram desenvolvidas e caracterizadas por Dynamic Light Scattering (DLS) e Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). As formulações 1 (NLS+cip+clo+citral), 2 (NLS+cip+clo+mentol), 3 (NLS+cip+clo+limoneno), 4 (CLN+cip+clo+citral), 5 (CLN+cip+clo+mentol) e 6 (CLN+cip+clo+limoneno) obtiveram médias de diâmetro de 286 a 304 nm; polidispersão de 0,16 a 0,18; potencial zeta de -15,8 a -20 mV, concentração de 3,37 ± 0,24 x 10^{13} a 5,44 ± 0,18 x 10^{13} partículas/mL; e Eficiência de Encapsulação (EE) > 98,01% para todos os princípios ativos, enquanto, para os mesmos parâmetros, as formulações de zeína NZ-1 (NZ+cip+clo+citral), NZ-2 (NZ+cip+clo+mentol) e NZ-3 (NZ+cip+clo+limoneno) obtiveram, respectivamente, valores médios de: 282,18 a 290,64 nm; 0,24 a 0,25; -3,35 a -6,10 mV; e concentração de 2,73 ± 2,67 x 10^{13} a 3,20 ± 3,03 x 10^{13} partículas/mL e EE > 96%. Todas as formulações foram avaliadas quanto ao seu potencial acaricida e comparadas com controles positivo (Colosso®) e negativos (água destilada; e nanopartículas sem princípio ativo). Na avaliação das formulações de nanocarreadores lipídicos, pelo Teste de Pacote de Larvas (TPL), os controles negativos não ocasionaram mortalidade das larvas, enquanto o controle positivo, avaliado na concentração de 0,512 mg.mL^{-1}, causou 100% de mortalidade. As formulações de NLS 1, 2, 3 e de CLN 4, 5 e 6 foram avaliadas de 0,004 a 0,466 mg.mL^{-1}. Na concentração de 0,007 mg.mL^{-1} atingiram 90,4, 75,9, 93,8, 100, 95,1, 72,7 % de mortalidade. Com excessão da 4, para a qual não foi possível determinar concentrações letais (CL), as formulações 1, 2, 3, 5 e 6 resultaram em CL_{50} e CL_{90} de: 0,0033 e 0,0072; 0,0054 e 0,0092; 0,0040 e 0,0081; 0,0023 e 0,0054; 0,0055 e 0,0094 mg.mL^{-1}, respectivamente. Em relação às nanoformulações de zeína avaliadas pelo TPL, os controles negativos também não ocasionaram mortalidade das larvas, entretanto, o controle positivo (avaliado de 0,004 a 0,512 mg.mL^{-1}), resultou em mortalidade de larvas > 71,9% na concentração de 0,064 mg.mL^{-1}, enquanto as formulações de zeína (avaliadas de 0,004 a 0,466 mg.mL^{-1}) ocasionaram mortalidade > 80 % na concentração de 0,029 mg.mL^{-1}. Essas formulações NZ-1 (NZ+cip+clo+citral), NZ-2 (NZ+cip+clo+mentol) e NZ-3 (NZ+cip+clo+limoneno) ainda resultaram em altas taxas de mortalidade de larvas em menores concentrações, com CL_{50} e CL_{90} de: 0,0136 e 0,0352; 0,0115 e 0,0386; 0,0117 e 0,0301 mg.mL^{-1}, respectivamente, e 0,0319 e 0,1028 mg.mL^{-1},

respectivamente, para o controle positivo). As formulações de zeína foram também avaliadas pelo Teste de Imersão de Adultos (TIA) e as formulações NZ-1, NZ-2 e NZ-3 obtiveram, respectivamente: 50,2, 40,5 e 60,1% de eficácia sobre fêmeas ingurgitadas na concentração de 0,466 $mg.mL^{-1}$, enquanto o controle positivo resultou em 39,4% de eficácia a 0,512 $mg.mL^{-1}$. As formulações de zeína ainda apresentaram uma alta atividade residual, embora menor do que a do controle positivo. Esse estudo demonstrou que foi possível encapsular os princípios ativos priorizados e caracterizar os sistemas carreadores. Todas as nanoformulações foram capazes de proteger os princípios ativos contra a degradação em solução, o que é uma característica de estabilidade visada para produtos carrapaticidas comerciais. Dessa forma, nanoformulações podem ser uma alternativa para o desenvolvimento de novos biocarrapaticidas com menor quantidade de princípios ativos, visando-se promover um controle parasitário mais seguro, com menor risco de presença de resíduos nos alimentos de origem animal e no ambiente.

Palavras-chave: carrapato bovino, resistência, cipermetrina, clorpirifós, fitoterapia, sistemas nanocarreadores, segurança alimentar

NANOTECHNOLOGY APPLIED TO DEVELOPMENT OF SYNTHETIC ACARICIDES ASSOCIATED WITH PLANTS COMPOUNDS FOR THE *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* CONTROL

ABSTRACT – *Rhipicephalus microplus* causes declines in cattle production and consequent damage to livestock. The resistance of ticks and the risk of the presence of residues in food of animal origin have driven the search for new control alternatives. Several plant compounds have an acaricidal/repellent potential, however, they have limitations in their application. Nanocarriers can protect these compounds, increase their aqueous solubility and bioavailability, and reduce possible toxic effects. Thus, the objective of this study was to develop acaricide formulations from Solid Lipid Nanoparticles (NLS), Nanostructured Lipid Carriers (CLN) and Zein Nanoparticles (NZ), associated with cypermethrin (cip), chlorpyrifos (clo) and a plant compound (citral, menthol or limonene), characterize these nanocarrier systems and verify their performance against larvae and engorged females of *R. microplus*. Nine formulations were developed and characterized by Dynamic Light Scattering (DLS) and Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). The formulations 1 (NLS+cip+clo+citral), 2 (NLS+cip+clo+menthol), 3 (NLS+cip+clo+limonene), 4 (CLN+cip+clo+citral), 5 (CLN+cip+clo+menthol) and 6 (CLN+cip+clo+limonene) obtained mean diameters from 286 to 304 nm; polydispersion from 0.16 to 0.18; zeta potential from -15.8 to -20 mV, concentration from 3.37 ± 0.24 x 10^{13} to 5.44 ± 0.18 x 10^{13} particles/mL; and Encapsulation Efficiency (EE) > 98.01% for all active ingredients, while, for the same parameters, zein formulations NZ-1 (NZ+cip+clo+citral), NZ-2 (NZ+cip+clo+menthol) and NZ-3 (NZ+cip+clo+limonene) obtained, respectively, mean values of: 282.18 to 290.64 nm; 0.24 to 0.25; -3.35 to -6.10 mV; concentration of 2.73 ± 2.67 x 10^{13} to 3.20 ± 3.03 x 10^{13} particles/mL and EE> 96%. All formulations were evaluated for their acaricidal potential and compared with positive (Colosso®) and negative (distilled water; and nanoparticles without active ingredient) controls. In the evaluation of lipid nanocarrier formulations, by the Larval Pack Test (TPL), the negative controls did not cause mortality of the larvae, while the positive control, evaluated at the concentration of 0.512 mg.mL^{-1}, caused 100% mortality. The formulations of NLS 1, 2, 3 and CLN 4, 5 and 6 were evaluated from 0.004 to 0.466 mg.mL^{-1}. At the concentration of 0.007 mg.mL^{-1} they reached 90.4, 75.9, 93.8, 100, 95.1, 72.7% of mortality. With the exception of 4, for which it was not possible to determine lethal concentrations (CL), formulations 1, 2, 3, 5 and 6 resulted in CL_{50} and CL_{90} of: 0.0033 and 0.0072; 0.0054 and 0.0092; 0.0040 and 0.0081; 0.0023 and 0.0054; 0.0055 and 0.0094 mg.mL^{-1}, respectively. Regarding the zein nanoformulations evaluated by the TPL, the negative controls also did not cause mortality of the larvae, however, the positive control (evaluated from 0.004 to 0.512 mg.mL^{-1}), resulted in larval mortality > 71.9% in the concentration 0.064 mg.mL^{-1}, while zein formulations (evaluated from 0.004 to 0.466 mg.mL-1) caused mortality> 80% in the concentration of 0.029 mg.mL^{-1}. These formulations NZ-1 (NZ + cip + clo + citral), NZ-2 (NZ + cip + clo + menthol) and NZ-3 (NZ + cip + clo + limonene) still resulted in high larval mortality rates in lower concentrations, with LC_{50} and LC_{90} of: 0.0136 and 0.0352; 0.0115 and 0.0386; 0.0117 and 0.0301 mg.mL^{-1}, respectively, and 0.0319 and 0.1028 mg.mL^{-1}, respectively, for the positive control). The zein formulations were also evaluated by the Adult Immersion

Test (TIA) and the formulations NZ-1, NZ-2 and NZ-3 obtained, respectively: 50.2, 40.5 and 60.1% efficacy on engorged females at a concentration of 0.466 mg.mL^{-1}, while the positive control resulted in 39.4% efficacy at 0.512 mg. mL^{-1}. The zein formulations still showed a high residual activity, although less than that of the positive control. This study demonstrated that it was possible to encapsulate the prioritized active ingredients and characterize the carrier systems. All nanoformulations were able to protect the active ingredients against degradation in solution, which is a characteristic of stability aimed at commercial tick products. Thus, nanoformulations can be an alternative for the development of new biocarpathicides with less active ingredients, aiming to promote safer parasitic control, with less risk of the presence of residues in food of animal origin and in the environment.
Keywords: bovine tick, resistance, cypermethrin, chlorpyrifos, phytotherapy, nanocarrier systems, food security

Lista de Abreviaturas

AChE: Acetilcolinesterase
ACh: Acetilcolina
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATPase: Adenosinatrifosfatases
BHC: Benzeno hexaclorado
CEPEA: Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada-Esalq/Usp
CEUA: Comitê de Ética no Uso dos Animais
Cip: Cipermetrina
CL: Concentração Letal
CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência
CLN: Carreadores Lipídicos Nanoestruturados
Clo: Clorpirifós
CNA: Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil
CPPSE: Centro de Pesquisa Pecuária Sudeste
CT: concentração
DDT: Dicloro difenil tricloroetano
DL: Dose letal
DLS: Dynamic Light Scattering (Espectroscopia de correlação de fótons)
E: eclosão
EE: Eficiência de encapsulação
FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura)
FDA: Food and Drug Administration
Form.: formulação
FS: Fator de sinergismo
GABA: Ácido gama-aminobutírico
IPD: índice de polidispersão
LD: Limite de Detecção
LMR: Limite Máximo de Resíduos
Log P: logaritmo P (coeficiente de partição)

LQ: Limite de Quantificação

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MD: médias de diâmetro

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão

NLS: Nanopartículas Lipídicas Sólidas

NTA: Nanoparticle Tracking Analysis (Análise de Rastreamento de Nanopartículas)

NZ: Nanopartícula de Zeína

OCDE: Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development

P: partição

PF: peso das fêmeas ingurgitadas

PIB: Produto Interno Bruto

PO: peso dos ovos

PVA: Poli álcool vinílico

PZ: potencial zeta

(r): Coeficiente de correlação de Pearson

R. microplus: *Rhipicephalus microplus*

Ref: Referência

sCMOS: Scientific Complementary metal - oxide - semiconductor

spp: Espécies

TIA: Teste de imersão de adultos

TPL: Teste de Pacote de Larvas

UR: umidade relativa

UV-vis: ultravioleta visível

Lista de Tabelas

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Exemplos de carrapaticidas comerciais do tipo pulverização, sua composição e período de carência para leite, de uso comum sobre vacas em lactação no Brasil. 13

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Composição e concentração dos princípios ativos nas formulações de Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) e de Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN) ao final do preparo (para caracterização e avaliação de estabilidade), em comparação com o produto comercial. 45
Tabela 2. Condições analíticas utilizadas para quantificação dos princípios ativos por meio da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). 46
Tabela 3. Composição e concentração dos princípios ativos nas formulações de Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) e de Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN) após a diluição para o teste sobre larvas de Rhipicephalus microplus, em comparação com o produto comercial. 49
Tabela 4. Médias de eficácia das formulações de Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) e de Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN) em relação à mortalidade (%) das larvas de *Rhipicephalus microplus* pelo Teste de Pacote de Larvas (TPL). 57

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Composição e concentração dos princípios ativos nas formulações de Nanopartículas de Zeína (NZ) ao final do preparo (para caracterização e avaliação de estabilidade), em comparação com o produto comercial. 75
Tabela 2. Condições analíticas utilizadas para quantificação dos princípios ativos por meio da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). 76
Tabela 3. Composição e concentração dos princípios ativos nas formulações de Nanopartículas de Zeína (NZ) após a diluição para os testes sobre *Rhipicephalus microplus*, em comparação com o produto comercial. 79
Tabela 4. Médias de eficácia das formulações de Nanopartículas de Zeína (NZ) e do controle positivo em relação às mortalidades de larvas de *Rhipicephalus microplus* em 24 horas pelo Teste de Pacote de Larvas (TPL). 86
Tabela 5. Médias de peso das fêmeas ingurgitadas (PF), peso dos ovos (PO), % de eclosão das larvas de *Rhipicephalus microplus*, Índice de Eficiência Reprodutiva (IER) e Eficácia das formulações de Nanopartículas de Zeína (NZ) e do controle positivo pelo Teste de Imersão de Adultos (TIA). 88

Lista de Figuras

CAPÍTULO 1

Figura 1. *Rhipicephalus microplus* parasitando região caudal (membros posteriores e inserção posterior do úbere) de um bovino, espécie pela qual tem predileção. Fonte: Autor. 3
Figura 2. Fêmea e macho adultos (vista dorsal) de *Rhipicephalus microplus*. Fonte: Autor. 4
Figura 3. Representação do ciclo de vida do carrapato *Rhipicephalus microplus*. Fonte: Autor. 4
Figura 4. Fêmea de *Rhipicephalus microplus* realizando ovipostura. Nesse período, apresenta coloração amarelada. Fonte: Autor. 5
Figura 5. Larvas de *Rhipicephalus microplus* na vegetação. Fonte: Autor. 6
Figura 6. Bovino infestado por *Rhipicephalus microplus*. A) Região de pescoço; B) pavilhão auricular. O local de inserção dos parasitas geralmente apresenta lesões de pele e alopecia. Fonte: Autor. 6
Figura 7. Fórmula estrutural da cipermetrina. Fonte: Anvisa (2020). 8
Figura 8. Fórmula estrutural do clorpirifós. Fonte: Anvisa (2020). 9
Figura 9. Fórmula estrutural do citral. Fonte: Sigma Aldrich (2020). 10
Figura 10. Fórmula estrutural do mentol. Fonte: Sigma Aldrich (2020). 11
Figura 11. Fórmula estrutural do limoneno. Fonte: Sigma Aldrich (2020). 11
Figura 12. Micrografias de Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) com aumento de 27800 vezes, obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). A) NLS contendo ivermectina; B) NLS contendo metopreno. Fonte: Adaptado de Cola et al. (2016). 20
Figura 13. Micrografias de Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) com aumento de 27800 vezes, obtidas por MET. A) CLN contendo ivermectina; B) CLN contendo metopreno. Fonte: Adaptado de Cola et al. (2016). 21
Figura 14. Micrografias de Nanopartículas de zeína (NZ) obtidas por MET. A) Citral encapsulado em NZ com núcleo único; B) Citral encapsulado em NZ com múltiplos núcleos. Fonte: Adaptado de Su (2012). 24

CAPÍTULO 2

Figura 1. Médias de diâmetro das partículas. A) NLS, formulações 1 (NLS+cip+clo+citral), 2 (NLS+cip+clo+mentol) e 3 (NLS+cip+clo+limoneno); B) CLN, formulações 4 (CLN+cip+clo+citral), 5 (CLN+cip+clo+mentol) e 6 (CLN+cip+clo+limoneno). NLS = Nanopartículas Lipídicas Sólidas; CLN = Carreadores Lipídicos Nanoestruturados; cip = cipermetrina (1,875 mg.mL^{-1}); clo = clorpirifós (3,125 mg.mL^{-1}); citral, mentol, limoneno (0,125 mg.mL^{-1}). 51
Figura 2. Polidispersão média das partículas. A) NLS, formulações 1 (NLS+cip+clo+citral), 2 (NLS+cip+clo+mentol) e 3 (NLS+cip+clo+limoneno); B) CLN, formulações 4 (CLN+cip+clo+citral), 5 (CLN+cip+clo+mentol) e 6 (CLN+cip+clo+limoneno). NLS = Nanopartículas Lipídicas Sólidas; CLN = Carreadores Lipídicos Nanoestruturados; cip = cipermetrina (1,875 mg.mL^{-1}); clo = clorpirifós (3,125 mg.mL^{-1}); citral, mentol, limoneno (0,125 mg.mL^{-1}). 52

Figura 3. Médias de Potencial Zeta das partículas. A) NLS, formulações 1 (NLS+cip+clo+citral), 2 (NLS+cip+clo+mentol) e 3 (NLS+cip+clo+limoneno); B) CLN, formulações 4 (CLN+cip+clo+citral), 5 (CLN+cip+clo+mentol) e 6 (CLN+cip+clo+limoneno). NLS = Nanopartículas Lipídicas Sólidas; CLN = Carreadores Lipídicos Nanoestruturados; cip = cipermetrina (1,875 mg.mL^{-1}); clo = clorpirifós (3,125 mg.mL^{-1}); citral, mentol, limoneno (0,125 mg.mL^{-1}). 53
Figura 4. Médias de distribuição de tamanho das partículas. A) NLS, formulações 1 (NLS+cip+clo+citral), 2 (NLS+cip+clo+mentol) e 3 (NLS+cip+clo+limoneno); B) CLN, formulações 4 (CLN+cip+clo+citral), 5 (CLN+cip+clo+mentol) e 6 (CLN+cip+clo+limoneno). NLS = Nanopartículas Lipídicas Sólidas; CLN = Carreadores Lipídicos Nanoestruturados; cip = cipermetrina (1,875 mg.mL^{-1}); clo = clorpirifós (3,125 mg.mL^{-1}); citral, mentol, limoneno (0,125 mg.mL^{-1}). 54
Figura 5. Concentração média das partículas. A) NLS, formulações 1 (NLS+cip+clo+citral), 2 (NLS+cip+clo+mentol) e 3 (NLS+cip+clo+limoneno); B) CLN, formulações 4 (CLN+cip+clo+citral), 5 (CLN+cip+clo+mentol) e 6 (CLN+cip+clo+limoneno). NLS = Nanopartículas Lipídicas Sólidas; CLN = Carreadores Lipídicos Nanoestruturados; cip = cipermetrina (1,875 mg.mL^{-1}); clo = clorpirifós (3,125 mg.mL^{-1}); citral, mentol, limoneno (0,125 mg.mL^{-1}). 55
Figura 6. Valores médios de pH. A) NLS, formulações 1 (NLS+cip+clo+citral), 2 (NLS+cip+clo+mentol) e 3 (NLS+cip+clo+limoneno); B) CLN, formulações 4 (CLN+cip+clo+citral), 5 (CLN+cip+clo+mentol) e 6 (CLN+cip+clo+limoneno). NLS = Nanopartículas Lipídicas Sólidas; CLN = Carreadores Lipídicos Nanoestruturados; cip = cipermetrina (1,875 mg.mL^{-1}); clo = clorpirifós (3,125 mg.mL^{-1}); citral, mentol, limoneno (0,125 mg.mL^{-1}).....56

CAPÍTULO 3

Figura 1. Diâmetro médio das NZ e das formulações NZ-1 (NZ+cip+clo+citral), NZ-2 (NZ+cip+clo+mentol) e NZ-3 (NZ+cip+clo+limoneno) obtido por DLS. NZ = Nanopartículas de zeína; cip = cipermetrina (1,875 mg.mL^{-1}); clo = clorpirifós (3,125 mg.mL^{-1}); citral, mentol, limoneno (0,125 mg.mL^{-1}). 81
Figura 2. Polidispersão média das NZ e das formulações NZ-1 (NZ+cip+clo+citral), NZ-2 (NZ+cip+clo+mentol) e NZ-3 (NZ+cip+clo+limoneno). NZ = Nanopartículas de zeína; cip = cipermetrina (1,875 mg.mL^{-1}); clo = clorpirifós (3,125 mg.mL^{-1}); citral, mentol, limoneno (0,125 mg.mL^{-1}).....82
Figura 3. Potencial Zeta médio das NZ e das formulações NZ-1 (NZ+cip+clo+citral), NZ-2 (NZ+cip+clo+mentol) e NZ-3 (NZ+cip+clo+limoneno). NZ = Nanopartículas de zeína; cip = cipermetrina (1,875 mg.mL^{-1}); clo = clorpirifós (3,125 mg.mL^{-1}); citral, mentol, limoneno (0,125 mg.mL^{-1}).....83
Figura 4. Distribuição de tamanho médio das NZ e das formulações NZ-1 (NZ+cip+clo+citral), NZ-2 (NZ+cip+clo+mentol) e NZ-3 (NZ+cip+clo+limoneno). NZ = Nanopartículas de zeína; cip = cipermetrina (1,875 mg.mL^{-1}); clo = clorpirifós (3,125 mg.mL^{-1}); citral, mentol, limoneno (0,125 mg.mL^{-1}). 83
Figura 5. Concentração média das NZ e das formulações NZ-1 (NZ+cip+clo+citral), NZ-2 (NZ+cip+clo+mentol) e NZ-3 (NZ+cip+clo+limoneno). NZ = Nanopartículas de zeína; cip = cipermetrina (1,875 mg.mL^{-1}); clo = clorpirifós (3,125 mg.mL^{-1}); citral, mentol, limoneno (0,125 mg.mL^{-1}).....84

Figura 6. Valores médios de pH das NZ e das formulações NZ-1 (NZ+cip+clo+citral), NZ-2 (NZ+cip+clo+mentol) e NZ-3 (NZ+cip+clo+limoneno). NZ = Nanopartículas de zeína; cip = cipermetrina (1,875 mg.mL^{-1}); clo = clorpirifós (3,125 mg.mL^{-1}); citral, mentol, limoneno (0,125 mg.mL^{-1}).....85
Figura 7. Atividade residual das formulações e do controle positivo, a partir das médias de mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus*, obtidas por TPL realizado em 1, 2, 3, 7, 14, 42 e 49 dias após o primeiro tratamento dos papéis filtro, indicando a persistência de atividade no decorrer do tempo. NZ = Nanopartículas de zeína; cip = cipermetrina; clo = clorpirifós. Formulações NZ-1 (NZ+cip+clo+citral), NZ-2 (NZ+cip+clo+mentol) e NZ-3 (NZ+cip+clo+limoneno) avaliadas a 0,466 mg.mL^{-1} (0,125, 1,875 e 3,125 mg.mL^{-1} de composto vegetal, cip e clo, respectivamente); Colosso® avaliado a 0,512 mg.mL^{-1} (0,012, 0,187 e 0,312 mg.mL^{-1} de citronelal, cip e clo, respectivamente). 87

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

1. Introdução

De acordo com OCDE-FAO (2020), o Brasil está entre os países que continuarão dominando a produção pecuária nos próximos anos. Do ponto de vista global, há perspectivas de que as produções de leite e carne sejam intensificadas, resultando em forte crescimento para o setor da bovinocultura. A agroindústria tem demonstrado sinais de recuperação da economia desde o segundo semestre de 2017 e o PIB do agronegócio tem se expandido, incluindo o do setor pecuário (Cepea-CNA, 2018; 2020).

Apesar de todos os esforços, entretanto, a pecuária enfrenta dificuldades que impedem um maior desenvolvimento. O parasitismo pelo carrapato *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Canestrini, 1888) é considerado um entrave, pois são inúmeros os prejuízos acarretados por esse parasita, incluindo a queda nos desempenhos de produção e a transmissão de hemoparasitas que podem causar Tristeza Parasitária Bovina, doença que ocasiona altas taxas de mortalidade nos rebanhos (Guglielmone et al., 2006; Raynal et al., 2013; Grisi et al., 2014).

O principal método empregado no controle de carrapatos é a utilização de carrapaticidas comerciais, entretanto, devido ao seu uso indiscriminado e falta de orientação técnica, observou-se um aumento dos relatos científicos acerca da resistência de *R. microplus* (Furtado et al., 2013; Raynal et al., 2013; Cruz et al., 2015; Higa et al., 2016). O risco da presença de resíduos de medicamentos nos produtos de origem animal e no meio ambiente é também um fator preocupante, uma vez que pode comprometer a saúde humana e o equilíbrio ambiental (Schwarzenbach et al., 2010; Furtado et al., 2013).

A população tem voltado sua preocupação para a segurança de alimentos, optando por aqueles livres de resíduos tóxicos, o que demonstra a necessidade da busca por alternativas eficientes que garantam o controle de *R. microplus* e sobretudo a segurança dos alimentos de origem animal. Nesse sentido, há décadas têm se pesquisado novas moléculas provenientes de plantas para o controle parasitário (Habeeb, 2010; Chagas et al., 2014; 2016; Figueiredo et al., 2018; Medeiros et al.,

2019; Vinturelle et al., 2021).

A nanotecnologia tende a contribuir para o desenvolvimento de novos sistemas, visando melhorar a estabilidade físico química de compostos vegetais e prevenir a rápida degradação desses compostos. Além disso, pode promover a liberação de um composto ativo para o organismo alvo, liberação controlada das moléculas no local de ação e minimizar efeitos tóxicos indesejáveis em organismos não-alvo (Ghormade et al., 2011; Gogos et al., 2012; Perlatti et al., 2013; Durán e Marcato, 2013).

Nanoformulações a base de compostos com ação repelente podem ser uma opção para controlar *R. microplus* em propriedades leiteiras (Chagas e Rabelo, 2012; Nogueira et al., 2020), sobretudo se associadas a princípios ativos registrados para uso em vacas em lactação. Sistemas nanocarreadores são capazes de transportar moléculas bioativas de forma prolongada, aumentar a eficiência e garantir a liberação do princípio ativo por longo período de tempo, contribuindo para a redução de impactos ambientais (Mogul et al.,1996).

Dessa forma, o objetivo desse estudo foi desenvolver nanoformulações carrapaticidas a partir de Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS), Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN) e Nanopartículas de Zeína (NZ), associadas à cipermetrina, clorpirifós e um composto vegetal (citral, mentol ou limoneno), caracterizar e verificar a eficácia dessas nanoformulações contra larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

2. Revisão de literatura

2.1 *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* e consequências de seu parasitismo

O carrapato *Rhipicephalus microplus* é originário da Ásia e apresenta ampla distribuição geográfica, sobretudo nos países do hemisfério sul, em regiões de clima tropical e subtropical (Nuñes et al., 1982). O subgênero *Boophilus* está representado por apenas duas espécies na América Latina: *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus e Rhipicephalus* (*Boophilus*) *annulatus* (Guglielmone et al., 2006). Segundo esses autores, a espécie *R. annulatus* está restrita ao nordeste do México, enquanto o *R. microplus* está distribuída do norte da Argentina até o México, incluindo as ilhas do Caribe.

Rhipicephalus microplus é considerado monoxeno, por completar seu ciclo evolutivo parasitando apenas um hospedeiro. Devido à sua predileção por bovinos de raças taurinas (*Bos taurus*) e seus cruzamentos, é conhecido como o carrapato-do-boi ou carrapato-bovino. Há uma grande preocupação decorrente do hematofagismo (hábito de se alimentar de sangue) (Figura 1), fazendo com que esse carrapato seja um importante vetor na transmissão dos agentes etiológicos causadores da Tristeza Parasitária Bovina (*Babesia bigemina*, *Babesia bovis*, *Anaplasma marginale*) e de *Borrelia theileri*, principalmente na América do Sul, Central e Austrália, levando a alto índice de mortalidade nos rebanhos (Veríssimo et al., 1997; Murrell et al., 2001; Estrada-Peña et al., 2006; Guglielmone et al., 2006; Taylor et al., 2007; Pereira et al., 2008; Catto et al., 2010).



Figura 1. *Rhipicephalus microplus* parasitando região caudal (membros posteriores e inserção posterior do úbere) de um bovino, espécie pela qual tem predileção. Fonte: Autor.

Rhipicephalus microplus (Figura 2) apresenta coloração cinza-escuro e escudo dorsal (parcial nas fêmeas, ninfas e larvas; e completo nos machos), com ausência de ornamentações. Seu ciclo evolutivo é dividido em duas fases, conforme ilustrado

na Figura 3 (Guimarães et al., 2001; Mans e Neitz, 2004; Pereira et al., 2008).



Figura 2. Fêmea e macho adultos (vista dorsal) de *Rhipicephalus microplus*. Fonte: Autor.

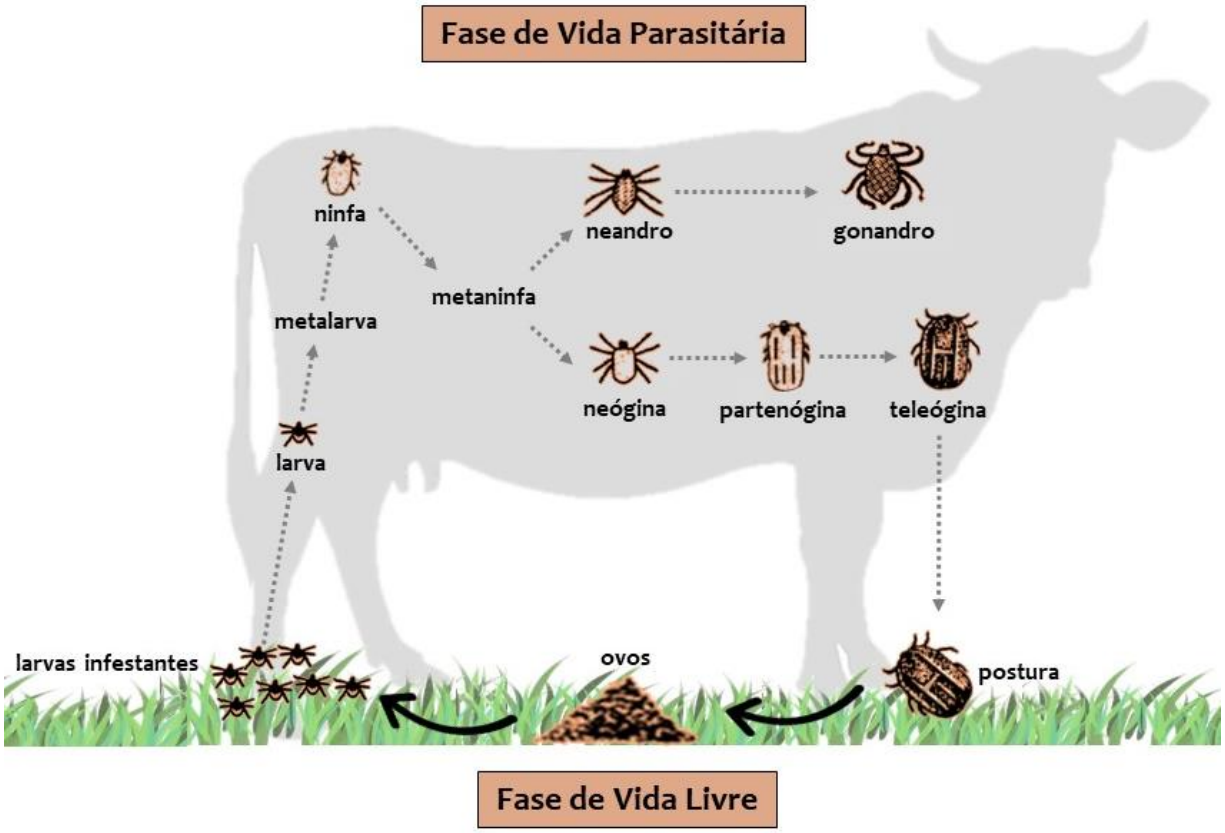


Figura 3. Representação do ciclo de vida do carrapato *Rhipicephalus microplus*. Fonte: Autor.

A fase parasitária inicia-se quando a “larva infestante” consegue subir e fixar-se no bovino, dessa forma permanecendo por aproximadamente 22 dias. Após sofrer diferentes mudas (estágios de metalarva, ninfa e metaninfa), ocorre a diferenciação sexual. O macho (neandro) atinge a fase adulta (gonandro) e começa a percorrer o corpo do bovino para fecundar as fêmeas. A fêmea (neógina) após ser fecundada (partenógina), recebe então a denominação “teleógina”, próximo ao momento de se desprender do animal e dar início à fase de vida livre, na qual ocorre a postura dos ovos (Figura 4) (Gonzales, 1995).



Figura 4. Fêmea de *Rhipicephalus microplus* realizando ovipostura. Nesse período, apresenta coloração amarelada. Fonte: Autor.

A fase de vida livre corresponde ao período no qual o carrapato permanece nas pastagens. Ao se desprender do animal, a teleógina procura um local para se imergir no solo em meio as pastagens. Após 3 a 9 dias, dependendo da temperatura, inicia a postura dos ovos, período que tem a duração de aproximadamente 15 a 18 dias. Após aproximadamente 7 dias ocorre o início da eclosão das larvas. As recém-eclodidas, imediatamente, não têm capacidade de subir no hospedeiro, porém, em 7 dias tornam-se infestantes (Figura 5), ou seja, com capacidade de subir, fixar-se e continuar seu desenvolvimento no bovino. Podem sobreviver até seis meses nas pastagens, sem alimentação (Gonzales, 1995).



Figura 5. Larvas de *Rhipicephalus microplus* na vegetação. Fonte: Autor.

Elevadas infestações por *R. microplus* podem ocasionar anemia, perda de peso, diminuição da imunidade e da produtividade dos bovinos. Esse parasita é considerado um grave problema sanitário nos sistemas de produção devido às lesões que provoca nos locais de sua fixação (Figura 6), resultando em um atrativo para moscas e miíases (bicheiras) que, além de causarem desconforto aos animais, podem afetar a posterior comercialização do couro (Guglielmone et al., 1999; Lopes et al., 2013; Maza et al., 2013).

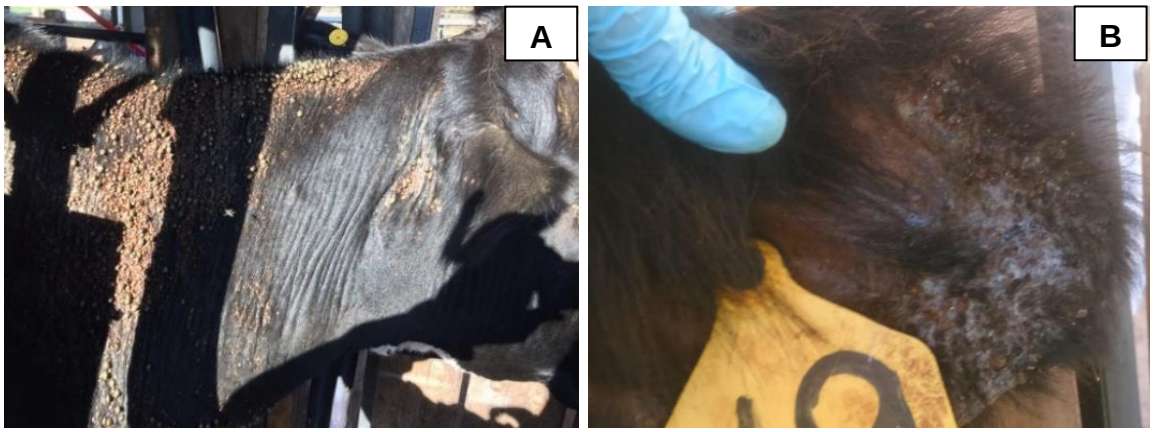


Figura 6. Bovino infestado por *Rhipicephalus microplus*. **A)** Região de pescoço; **B)** pavilhão auricular. O local de inserção dos parasitas geralmente apresenta lesões de pele e alopecia. Fonte: Autor.

2.2 Controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*

Tentativas para promover o controle alternativo do carrapato bovino têm sido realizadas. Há estudos voltados ao emprego de biocontroladores fúngicos (Camargo et al., 2016; Fernández-Salas et al., 2017; Webster et al., 2017), tratamentos alternativos como homeopatia (Valente et al., 2017), extratos e óleos essenciais de plantas (Chagas, 2008; Figueiredo et al., 2018) e até mesmo ao desenvolvimento de vacinas para atuarem na imunização e diminuir as infestações do carrapato (Aguirre et al., 2016; Gomes et al., 2015; Maruyama et al., 2017; Trentelman et al., 2017).

Uma das estratégias de controle de *R. microplus* consiste em reduzir suas populações a níveis economicamente aceitáveis nos bovinos (Martins et al., 2002). Carrapaticidas sintéticos têm sido a principal forma de controlar e reduzir infestações de carrapatos nos rebanhos há mais de um século. A aplicação desses acaricidas (geralmente disponíveis na forma de aspersão, *pour on* ou injetáveis) continua sendo o método de eleição para controle do carrapato *R. microplus* na bovinocultura (Furlong, 2005; Klafke et al., 2006; Furtado et al., 2013).

Em 1896, os acaricidas passaram a ser empregados de forma sistemática no controle de carrapatos em bovinos, a partir da utilização do arsênico. Entretanto, seu uso foi liberado nos Estados Unidos somente em 1910, quando se criou uma ponte para a comercialização internacional e foi muito utilizado até ser detectada a resistência dos carrapatos. Assim, após 1937, as preocupações relacionadas à resistência e ao risco da presença de resíduos que poderiam comprometer a saúde humana impulsionaram o desenvolvimento dos novos produtos: organoclorados (1946), ciclodienos e toxafeno (1947), formamidinas (1975), piretroides (1977), e as lactonas macrocíclicas (1981) (George et al., 2008).

2.2.1 Cipermetrina

A cipermetrina (fórmula molecular: $C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$) (Figura 7) é uma substância da classe dos piretroides tipo 2, os quais apresentam agrupamento α-ciano (Classe II na classificação toxicológica). Sua aplicação foi estimulada extensivamente após o aparecimento de resistência aos carrapaticidas da classe dos organofosforados, utilizados no país na década de 1980 (Andreotti, 2010). Os piretroides apresentam

propriedades lipofílicas que facilitam a sua penetração nos artrópodes através da sua cutícula rica em lipídios. Depois de absorvidos, os piretroides são levados para as células nervosas por meio da hemolinfa (Sartor e Santarém, 2018).

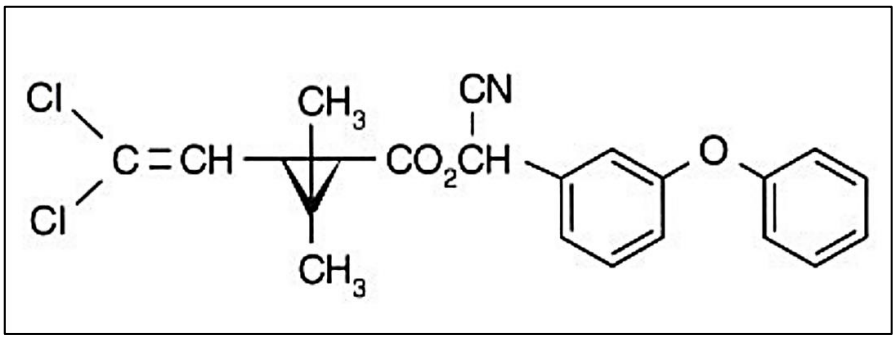


Figura 7. Fórmula estrutural da cipermetrina. Fonte: Anvisa (2020).

Os piretroides, incluindo a cipermetrina, têm seu sítio de ação no canal de sódio da membrana de axônios. Agem aumentando a condutância desse íon para o interior da célula. Também podem causar uma despolarização da membrana nervosa sem descargas repetitivas e reduzir a amplitude do potencial de ação. Além disso, a cipermetrina pode atuar promovendo inibição de Ca^{+2}, Mg^{+2} - adenosina trifosfatase (ATPase) e sobre calmodulina, responsável pela ligação intracelular dos íons de cálcio. Podem ainda atuar como agonista em receptores colinérgicos nicotínicos e como antagonista nos receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA) (Sartor e Santarém, 2018).

Em relação aos mecanismos de resistência, dois padrões foram identificados. O primeiro é a forma de alteração do sítio de ação das esterases, tornando-os insensíveis por mutações do gene relacionados aos canais de sódio. A proteína codificada por esse gene tende a alterar sua estrutura, o que o torna resistente aos piretroides. O segundo mecanismo, menos elucidado, envolve detoxificação metabólica mediada pela ação de esterases e de citocromo P450. Entretanto, podem ser encontradas variações genéticas em diferentes populações para esses mecanismos (He et al., 1999; Miller et al., 1999; Guerrero et al., 2001; Andreotti, 2010).

A cipermetrina não apresenta poder residual quando aplicada sob a forma de pulverização. Nesse caso, é recomendado um intervalo de tratamento de 21 dias. De

maneira geral, os piretroides apresentam baixa toxicidade aos mamíferos, quando comparados aos organofosforados (Andreotti, 2010).

2.2.2 Clorpirifós

O clorpirifós (fórmula molecular: $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$) (Figura 8) é uma substância pertencente à classe dos organofosforados (Classe II na classificação toxicológica), amplamente empregados no controle de pragas agrícolas e pecuárias. Os organofosforados são derivados orgânicos do ácido fosfórico. Seu mecanismo de ação consiste em inibir a enzima acetilcolinesterase, gerando consequente aumento de acetilcolina em níveis tóxicos para os carrapatos, resultando em intensas contrações dos músculos até a paralisia. Os organofosforado, incluindo o clorpirifós, ligam-se “irreversivelmente” ao local esterásico da enzima colinesterase, que é responsável pela hidrólise da molécula de acetilcolina (Ach). Com isso, a Ach se acumula onde esse neurotransmissor é liberado, promovendo hiperexitabilidade e hiperatividade, posterior incoordenação muscular, convulsões e morte do parasita (Andreotti, 2010; Sartor e Santarém, 2018).

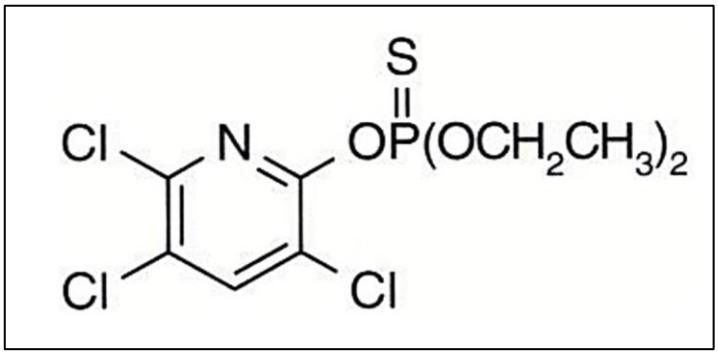


Figura 8. Fórmula estrutural do clorpirifós. Fonte: Anvisa (2020).

Dentre as classes de carrapaticidas disponíveis comercialmente para bovinos no Brasil, organofosforados é a mais antiga. Foram introduzidos em meados de 1955 com o objetivo de substituir os organoclorados como DDT e BHC, os quais já apresentavam resistência cruzada em diferentes espécies de carrapatos. Além disso, havia preocupação relacionada aos seus resíduos, ou seja, à sua capacidade de

persistir no ambiente e no organismo dos animais por meio de seu acúmulo na gordura corpórea (George et al., 2008; Higa et al., 2019).

Os mecanismos da resistência dos carrapatos frente aos organofosforados ainda precisam ser melhor elucidados. No entanto, sabe-se que há relação com a insensibilidade da AChE, o aumento do metabolismo das esterases localizadas no tegumento de teleóginas resistentes e a superexpressão dessas enzimas em larvas (Villarino, 2001; Foil et al., 2004).

Os organofosforados podem ser encontrados em associação com piretroides. Quando aplicados sob a forma de pulverização, não apresentam poder residual, sendo recomendado um intervalo de tratamento de 21 dias (Andreotti, 2010).

2.2.3 Compostos vegetais (citral, mentol e limoneno)

Pesquisas por novas moléculas a base de substâncias vegetais para o controle parasitário têm sido realizadas há décadas, sobretudo para o controle do carrapato bovino (Habeeb, 2010; Chagas et al., 2014; 2016; Sousa et al., 2020).

Citral (fórmula molecular: $C_{10}H_{16}O$) (Figura 9) é amplamente utilizado nas indústrias de perfumaria, alimentos e cosméticos (Bizzo et al., 2009). Possui baixa toxicidade, uma vez que doses inferiores a 1068 g/kg não apresentam toxicidade em ratos (Dieter et al., 1993). Foi relatado em espécies de *Cymbopogon* spp., *Eucalyptus* spp., tendo seu efeito tóxico demonstrado sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* (Chagas et al., 2002; Agnolin et al., 2014).

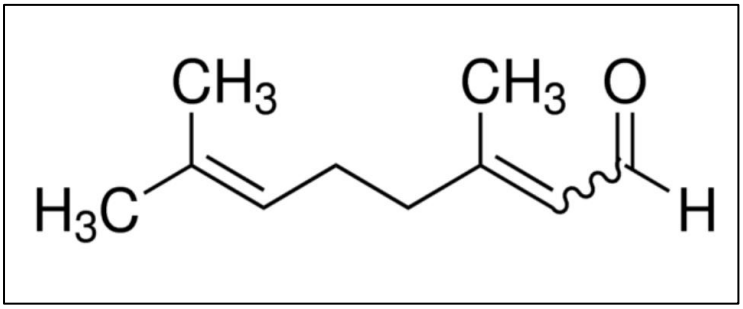


Figura 9. Fórmula estrutural do citral. Fonte: Sigma Aldrich (2020).

Mentol (fórmula molecular: $C_{10}H_{20}O$) (Figura 10) também já demonstrou ter efeito sobre *R. microplus*. *Mentha arvensis* (86,7% de mentol) e *Mentha piperita* (30,5% de mentol) na forma de óleos essenciais obtiveram eficácia de 86 e 89%, respectivamente sobre larvas de *R. microplus*, alcançando CL_{50} e CL_{90} de 14,46 e 16,96 e de 14,81 e 24,99 $mg.mL^{-1}$, respectivamente (Chagas et al., 2016).

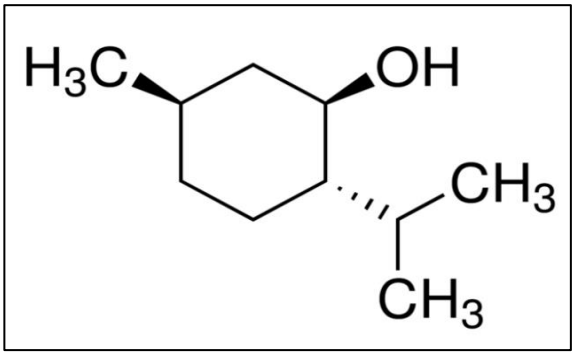


Figura 10. Fórmula estrutural do mentol. Fonte: Sigma Aldrich (2020).

Alguns óleos essenciais ricos em limoneno (fórmula molecular: $C_{10}H_{16}$) (Figura 11) já demonstraram diversas ações inseticidas, repelentes e atividades fitotóxicas (Ibrahim et al., 2001), evidenciando potencial efeito aditivo contra *R. microplus* (Ferrarini et al., 2008; Peixoto et al., 2015).

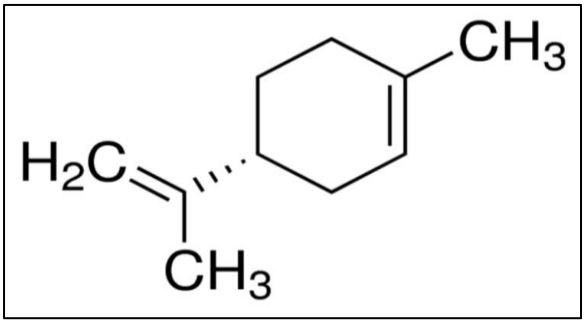


Figura 11. Fórmula estrutural do limoneno. Fonte: Sigma Aldrich (2020).

Limoneno e citral são alguns dos componentes mais prevalentes em óleos essenciais da espécie *Lippia alba*. Ambos apresentam potente atividade acaricida contra larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, principalmente o citral, o que pode ser devido a sua capacidade de penetração cuticular no parasita (Peixoto et al.,

2015).

R-(+)-limoneno e S-(-)-limoneno (comerciais) foram avaliados sobre fêmeas ingurgitadas e larvas de *R. microplus*, determinando CL_{50} de 31,2 e 54,5 $mg.mL^{-1}$, respectivamente. No mesmo estudo, os quimiotipos de carvonas (sintetizados a partir do limoneno) do óleo essencial de *L. alba*: LA-13 (26,95% de limoneno e 52,94% de carvona) e LA-57 (25,86% de limoneno e 63,47% de carvona) obtiveram CL_{50} de 16,8 e 27,0 $mg.mL^{-1}$, respectivamente (Peixoto et al., 2015).

Em outro estudo, o óleo essencial de *L. alba* (61,7% de carvona e 17,5% de limoneno) resultou em 100% de eficácia sobre as larvas de *R. microplus*, determinando as CL_{50} e CL_{90} de 5,84 e 11,14 $mg.mL^{-1}$, respectivamente (Chagas et al., 2016).

2.3 Período de carência

Um dos principais fatores que influenciam diretamente o controle estratégico dos carrapatos é a escolha da medicação a ser administrada nos animais. É preciso levar em consideração o período de retenção dos compostos carrapaticidas, os períodos de proteção residual contra o carrapato e, sobretudo, a eficiência desse produto em relação ao desafio da infestação, para que o tratamento seja bem-sucedido (Pereira, 2009; Corrêa et al., 2015).

O número de grupos químicos comerciais disponíveis para aplicação em vacas lactantes é muito restrito devido ao “período de carência”. Ou seja, tempo de abstinência necessário, mensurado em dias ou horas, que o fabricante deve obrigatoriamente informar na bula, segundo Normas da Coordenação de Fiscalização de Produtos Veterinários do MAPA.

Após a aplicação dos carrapaticidas, o descarte do leite no período recomendado garantirá que a concentração de resíduos resultante no leite destinado ao consumo esteja abaixo do Limite Máximo de Resíduos (LMR), de maneira a não se tornem tóxicos ao serem ingeridos diariamente (Langeloh, 2010). Atualmente, os carrapaticidas mais indicados para animais em lactação são aqueles que possuem princípios ativos com menor período de carência, conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1. Exemplos de carrapaticidas comerciais do tipo pulverização, sua composição e período de carência para leite, de uso comum sobre vacas em lactação no Brasil.

Nome Comercial	Composição (a cada 100 mL)	Carência
Alatox	Diclorvós.....45 g Cipermetrina.....5 g	Não requer
Barrage	Alfaciano-3-fenoxibenzil-2,2-dimetil-3-(2,2-diclorovinil)-ciclopropano carboxilato (Cypermethrin).....15 g	
Butox P CE 25	Deltametrina base.....2,5 g	
Cyperbio	Cipermetrina.....15,0 g	
Sarcolin	Cipermetrina técnica.....10,0 g	
Ciclorfós Pulverização	Cipermetrina.....20 g Clorpirifós.....50 g	6 horas
Neguvon + Asuntol Plus	Triclorfone.....77,6 g Coumafós.....1,0 g Ciflutrina .....1,0 g	10 horas
Supokill	Supona (2 cloro-1-(2,4 diclorofenil) vinil dietil fosfato).....50,0 g	12 horas
Carvet	Amitraz .....12,5 g	24 horas
Carrapatox	Cipermetrina.....10,0 g	
Combo Pulverização	Cipermetrina .....15,00 g Clorpirifós .....25,00 g Butóxido de piperonila .....1,00 mL	
Cypermetril Pulverização e Banho	Cipermetrina.....15,0 g	
Máximo Pulverização	Cipermetrina.....15,00 g Clorpirifós.....25,00 g Butóxido de Piperonila.....1,00 g	
Triatox pulverização	Amitraz .....12,5 g	
Bovitraz	Amitraz .....12,5 g	
Couro Limpo Pulverização	Cipermetrina.....15,0 g Clorpirifós.....25,0 g Citronelal.....1,0 g	
Ectobat 80	DDVP (Diclorvós).....60,0 g Clorpirifós.....20,0 g	
Colosso FC30	Clorpirifós.....30 g Cipermetrina.....15 g Fenthion.....15 g	72 horas (3 dias)
Colosso Pulverização	Cipermetrina.....15,0 g Clorpirifós.....25,0 g Citronelal.....1,0 g	
Cyperclor Plus Pulverização	Cipermetrina.....15,00 g Clorpirifós.....25,00 g Butóxido de Piperonila.....15,00 g Citronelal.....1,00 g	
Flytion SP	Clorpirifós.....50 g Cipermetrina high-cis.....06 g	
Masterfly	Cipermetrina.....15,0 g	

*Fonte: Bula dos referidos medicamentos.

2.4 Resíduos carrapaticidas

O período de carência é um critério que deve ser rigorosamente respeitado. Entretanto, por vezes, os profissionais do campo não se atentam às recomendações de uso dos acaricidas e não respeitam o tempo de descarte do leite dos animais recém tratados. Isso aumenta a possibilidade de resíduos carrapaticidas serem encontrados nos produtos de origem animal. Esse risco da presença de fármacos na carne, leite e até mesmo no ambiente é um grande fator de preocupação, uma vez que podem comprometer a saúde humana e prejudicar o equilíbrio ambiental (Schwarzenbach et al., 2010; Furtado et al., 2013; Jin et al., 2015).

A contaminação do leite pode ocorrer por meio da aplicação de carrapaticidas no corpo dos bovinos lactantes, tanto no estábulo quanto nas áreas de processamento do leite. A constatação da presença de resíduos demonstra a falta de qualidade do alimento destinado ao consumidor e é um fator preocupante, pois o leite é um alimento amplamente consumido nas fases iniciais da vida e efetivo sobretudo na dieta de crianças e idosos (Goulart et al., 2008).

A ocorrência do contato de pesticidas em organismos não-alvo (nesse caso, os humanos) precisa ser avaliada criteriosamente (Altun et al., 2017), uma vez que podem causar efeitos adversos. Sabe-se que a exposição prolongada à pesticidas pode resultar em problemas hepáticos, renais (Peres et al., 2006), distúrbios dos sistemas neurológico, imunológico (Karmaus et al., 2003) e endócrino (Colborn et al., 1993), além do risco de câncer de mama, pulmão, colo do útero e de próstata (Ahmed et al., 2002). Dessa forma, urge a necessidade de tentar reverter esse quadro.

2.5 Resistência de *Rhipicephalus microplus* frente aos carrapaticidas

Relatos de resistência do carrapato *R. microplus* frente aos carrapaticidas a base de piretróides sintéticos e organofosforados têm sido registrados (Nolan et al., 1977; Raynal et al., 2013; Cruz et al., 2015; Higa et al., 2016). Em 2014 foi documentado o primeiro caso de resistência ao Fluazuron, mais recente carrapaticida lançado no mercado e único princípio ativo até então sem relatos anteriores de resistência. Além disso, foi identificada a primeira população de carrapatos resistentes a seis classes de acaricidas, por meio dos estudos de Reck et al. (2014).

Levantamentos da resistência do carrapato bovino no estado de São Paulo, por exemplo, indicaram que em propriedades do Noroeste do estado, os piretroides foram os menos eficazes (17% e 27% para cipermetrina e deltametrina, respectivamente), indicando resistência em todas as propriedades averiguadas. Amitraz, clorpirifós+cipermetrina e clorpirifós+diclorvós demonstraram as maiores médias de eficácia: 73%, 79% e 76%, respectivamente (Ueno et al., 2012).

Em um novo estudo realizado em diferentes propriedades da mesma região, Oliveira et al. (2013) observaram que as médias de eficácia para amitraz, cipermetrina, deltametrina, fipronil, organofosforado e cipermetrina+clorpirofós+citronela foram de: 66%, 70%, 85%, 87%, 78% e 98%, respectivamente, demonstrando que associações tenderam a aumentar a eficácia sobre o controle de populações de carrapatos resistentes.

Um problema que merece destaque em relação à resitência adquirida por *R. microplus* frente aos carrapaticidas está ligado à mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*), ectoparasita de bovinos. A aplicação de piretroides e organoforados para o controle dessa mosca, porém, em dosagens insuficientes para controlar os carrapatos, contribuiu e continua a contribuir, indiretamente, para o aumento da resistência do carrapato a esses dois grupos químicos (Martins, 2004).

2.6 Associação de princípios ativos

A associação de princípios ativos de diferentes grupos químicos, incluindo substâncias de origem vegetal, tem sido bastante difundida na agropecuária e surgiram com a finalidade de promover um controle mais eficaz dos ectoparasitas que comprometem o agronegócio, como é o caso do parasitismo pelo carrapato *R. microplus* (Roel et al., 2001). A associação de piretroides e organofosforados, por exemplo, é realizada com o intuito de aumentar a eficiência dos piretróides (Andreotti, 2010).

De acordo com Vargas et al. (2003), combinações de diferentes classes de compostos químicos geralmente são mais eficazes do que formulações com único princípio ativo. Isso ocorre devido à possibilidade de os antiparasitários associados diminuirem a indução de mecanismos de resistência por meio das diferentes formas

de ação sobre os parasitas (Chagas, 2015).

Shalaby et al. (2012) compararam os efeitos morfológicos, *in vitro*, de compostos químicos sintéticos e vegetais sobre formas adultas de *Haemonchus contortus*, *Moniezia expansa* e *Fasciola gigantica*. Após 24 horas de incubação nos princípios ativos, os autores evidenciaram que a associação do óleo de sementes secas de *Nigella sativa* (0,5 $mg.mL^{-1}$) + ivermectina (25 $ng.mL^{-1}$) foi significativamente mais eficaz na destruição das superfícies cuticulares e tegumentais dos helmintos, em relação aos efeitos produzidos pelos mesmos compostos, de maneira isolada, contendo o dobro da dosagem (ou seja: 1 $mg.mL^{-1}$ de extrato de óleo de *N. sativa* e 50 $ng.mL^{-1}$ de ivermectina).

Associações de inseticidas e o óleo essencial de *Piper aduncum* L. foram testadas sobre larvas da “lagarta do cartucho” (*Spodoptera frugiperda*), praga de culturas de milho, e por meio da relação das doses e concentrações letais, os fatores de sinergismo (FS) foram determinados. A partir da associação com o éleo essencial, verificaram potencializações significativas dos inseticidas formulados com cipermetrina (FS= 73,03), zeta-cipermetrina (FS= 16,51) e permetrina (FS= 8,46-17,22), por contato residual, e dos inseticidas a base de zeta-cipermetrina (FS= 0,40-4,26), permetrina (FS= 2,10-4,79) e esfenvarelato (FS= 3,80), por contato tópico, demonstrando que *P. aduncum* pode ser uma boa alternativa frente ao butóxido de piperonila, sinergista sintético (Fazolin et al., 2016).

> Butóxido de piperonila é o sinérgico de maior utilização industrial. Sua principal função é potencializar os princípios ativos piretroides, reforçando e aperfeiçoando sua ação inseticida. Isso ocorre por meio da ação inibidora sobre o complexo enzimático do citocromo P450. Ao inibir essas enzimas que atuam nos mecanismos de desintoxicação dos piretroides, permitem que a concentração dos princípios ativos dentro do corpo do parasita seja maior. Sinergistas agem como uma substância alternativa, competindo com o pesticida e reduzindo a detoxificação. Agem também inibindo alostericamente outros sítios enzimáticos em esterases e oxidases multifuncionais, minimizando a quantidade de princípios ativos necessária para o controle dos parasitas (Gunning et al., 1999; Rocha e Ming, 1999).

Citronelal tem sido amplamente utilizado em carrapaticidas comerciais. Vários óleos essenciais têm esse composto como majoritário ou em porcentagens

significativas em sua composição, e alguns estudos já evidenciaram sua ação repelente e acaricida contra *R. microplus* (Olivo et al., 2008; Chagas et al., 2002; 2014; Mello et al., 2014). Além da influência exclusiva do composto majoritário, a interação com os demais metabólitos presentes nos óleos essenciais (especialmente a interação sinérgica) tem sido avaliada e sugerida como a responsável pela atividade biológica desempenhada pelos óleos essenciais. A interação sinérgica acontece quando o efeito da associação de duas ou mais substâncias ocorrem na mesma direção, podendo ser por adição (quando o efeito da associação é igual a soma dos efeitos das substâncias isoladas) ou por potencialização (quando o efeito da associação supera o efeito da soma das substâncias isoladas) (Bakkali et al., 2008; Florio, 2011).

Essas evidências reforçam a idéia de que associações de drogas sintéticas e compostos vegetais podem ser uma alternativa para tentar conter o atual quadro de acelerada resistência de *R. microplus* aos fármacos disponíveis comercialmente. Pesquisas com enfoque na área de medicina etnoveterinária devem ser priorizadas devido a esse aumento de resistência (Avinash et al., 2017) e ainda devido a esse motivo, há uma urgente necessidade de buscar medidas que possam controlar, de maneira segura, as infestações por carrapatos nos animais. Assim como citronelal, os terpenos citral, mentol e limoneno (presentes em óleos essenciais de diferentes espécies vegetais, os quais já demonstraram ação contra *R. microplus*, segundo Cruz et al. (2013) e Chagas et al., 2016), também podem ser uma alternativa para potencializar a ação de acaricidas sintéticos.

2.7 Nanotecnologia e nanocarreadores

Nanotecnologia é o termo utilizado para a ciência que descreve processos de manipulação, geração e uso de nanomateriais. Desde o início do surgimento da nanotecnologia seu potencial promissor sempre foi evidente, principalmente devido a sua ampla possibilidade de atuação. Estudos recentes evidenciaram que o emprego dos nanomateriais podem contribuir até mesmo em problemas relacionados ao uso e aplicação de pesticidas (Chen e Yada, 2011; Kah e Hofmann, 2014; Campos et al., 2014; Pascoli et al., 2020).

Nanomateriais, na forma de nanopartículas, podem ser utilizados como carreadores de princípios ativos em fármacos para uso na agropecuária. Sistemas nanocarreadores são capazes de transportar uma molécula bioativa de forma contínua e prolongada, possuem características desejáveis como o aumento da eficiência, minimização de impactos ambientais e garantia de liberação prolongada. Esses sistemas ainda podem proporcionar maior eficiência às formulações, permitindo a redução da quantidade necessária de princípios ativos para se obter eficácia, contribuindo, dessa forma, para o desenvolvimento sustentável (Mogul et al., 1996; Campos et al., 2014; Oliveira et al., 2015).

Martin-Ortigosa et al. (2012), por exemplo, proposeram um novo sistema de entrega de DNA/proteína para a área de genômica vegetal, por meio de nanopartículas de sílica mesoporosa (NSM). Esses autores demonstraram que NSM com poros de 10 nm funcionalizadas com ouro (Au) podem ser utilizadas para carrear proteínas com grandes diâmetros hidrodinâmicos (4,5 nm) e liberá-las em condições fisiológicas. Essa associação Au-NSM englobando a proteína ainda pode ser revestida com DNA de plasmídeo e introduzida em tecidos vegetais por meio de bombardeio de partículas, de modo que a entrega e liberação de dois tipos de biomoléculas, proteínas e DNA plasmidial podem ser detectadas nas mesmas células vegetais.

Avinash et al. (2017) demonstraram que os compostos 2,3-desidroalanol (DHS) e quercetina di-hidratada (QDH), sintetizados a partir de extrato das folhas de nim (EN), *Azadirachta indica*, apresentaram maior atividade sobre *R. microplus* quando associados a nanopartículas de prata (NPs-Ag) em comparação com deltametrina (DN) e não-associações. As CL_{50} determinadas sobre larvas pelo EN, 2,3-DHS, QDH e DN foram de: 1449,35, 26,37, 183,78 e 49,71 ppm, respectivamente, enquanto para as associações NPs-Ag-mediadas por EN, 2,3-DHS-NPs-Ag, QDH-NPs-Ag e DN-NPs-Ag foram de: 35,40, 14,42, 22,6, e 3,87 ppm, respectivamente.

Estudos envolvendo a aplicação de carreadores têm sido cada vez mais difundidos, almejando avanços na medicina humana e veterinária. Na área da parasitologia, entretanto, nanocarreadores ainda têm poucas aplicações. Contudo, o desenvolvimento de novos sistemas de liberação, que possibilitem intervalos de

dosagem mais prolongados e o aumento da atividade dos fármacos contra parasitas de importância de saúde pública e animal são alguns dos temas mais estudados em nanoparasitologia (Cruz e Molento, 2015).

2.7.1 Nanocarreadores lipídicos

Nanocarreadores lipídicos possuem a capacidade de aumentar o perfil de segurança e reduzir efeitos colaterais de medicamentos. São sistemas utilizados para direcionar fármacos para seu sítio de ação específico. Nanocarreadores lipídicos contendo fármacos antineoplásicos tendem a aumentar a segurança da terapia medicamentosa ao favorecerem o acúmulo desses no local de tratamento (Oliveira et al., 2012; Bruni et al., 2017). Esses sistemas têm atraído a atenção da comunidade científica, pois além de serem biocompatíveis e biodegradáveis, não possuem toxicidade e contêm grande potencial para transportar fármacos citotóxicos (Wong et al., 2007).

Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) (Figura 12) são sistemas constituídos por lipídeos sólidos sob temperatura ambiente e corporal, apresentam boa estabilidade física, química e biológica, além de boa tolerabilidade, biodegradação e alta disponibilidade. Permitem a prevenção da degradação química e oxidativa do composto encapsulado (Müller et al., 2000; Souto et al., 2011). Em um estudo com formulações contendo NLS, foi verificado que essas podem permanecer estáveis por um período de dois meses, reduzindo significativamente a perda de princípios ativos por evaporação, quando comparado a emulsões clássicas (Lai et al., 2006).

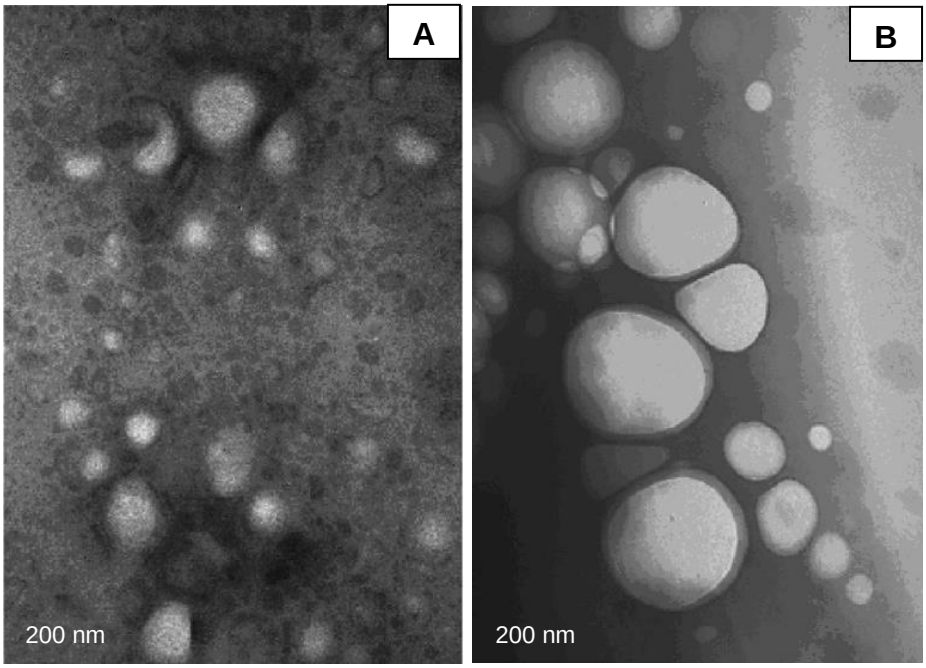


Figura 12. Micrografias de Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) com aumento de 27800 vezes, obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). **A)** NLS contendo ivermectina; **B)** NLS contendo metopreno. Fonte: Adaptado de Cola et al. (2016).

Nanopartículas Lipídicas Sólidas podem ser utilizadas por várias vias de administração e são bastante empregadas em fármacos de uso dermatológico e cosméticos. Suas vantagens incluem ótima biocompatibilidade, baixa toxicidade e citotoxicidade, sistema de entrega transdérmico eficiente (isso devido ao pequeno tamanho, o que garante maior área de contato com o estrato córneo aumentando a quantidade de fármaco que penetra através da pele), além de alta hidratação da pele (Dimer et al., 2013). Formulações contendo NLS, entretanto, contêm desvantagens como alto teor de água, o que pode resultar em problemas de estabilidade dos produtos finais em que foram inseridas (Pardeike et al., 2009).

Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) (Figura 13) foram desenvolvidos como uma segunda geração das NLS. São compostos por uma matriz lipídica sólida encapsulando compartimentos de lipídios líquidos, contêm menor temperatura de fusão, pois devido a adição de lipídeos líquidos resultam em um maior teor lipídico (40–50%), o que reduz o teor de água necessário na formulação. Apresentam vantagens em relação às NLS, como: maior eficiência de encapsulação e menor liberação do fármaco da matriz lipídica durante o período de armazenamento. Além

disso, o princípio ativo não é expulso do interior das nanopartículas, como geralmente ocorre nas NLS (Wissing et al., 2004; Pardeike et al., 2009; Attama et al., 2012; Cola et al., 2016).

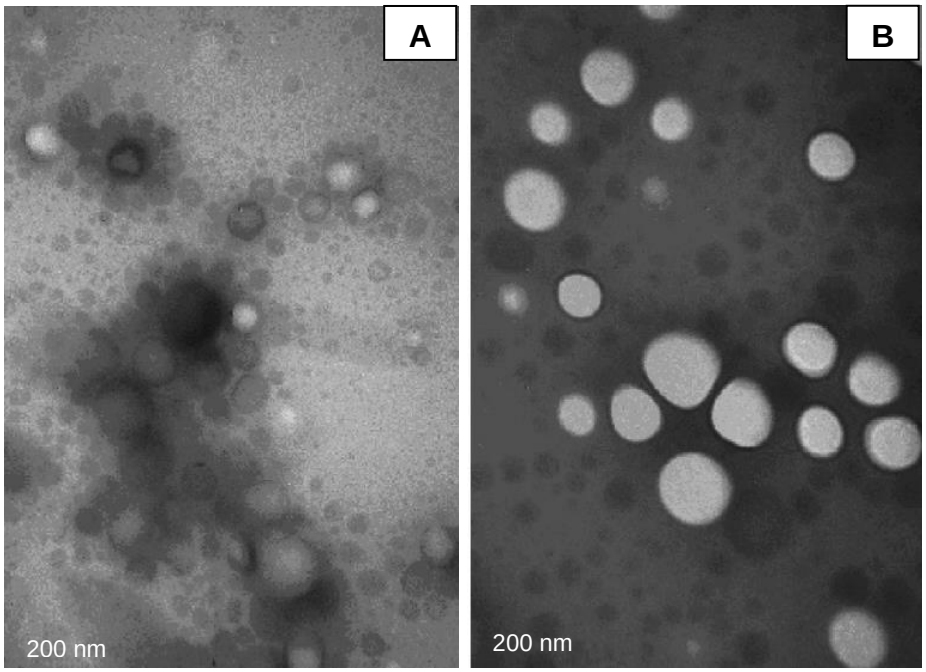


Figura 13. Micrografias de Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) com aumento de 27800 vezes, obtidas por MET. **A)** CLN contendo ivermectina; **B)** CLN contendo metopreno. Fonte: Adaptado de Cola et al. (2016).

Carreadores lipídicos nanoestruturados possuem, ainda, alta capacidade para entrega de fármacos por diferentes vias (oral, parenteral, tópica, oftálmica e pulmonar) e ao mesmo tempo aumentam a estabilidade física e química dos medicamentos, fornecendo controle sobre sua liberação, protegendo-os contra a degradação e melhorando seus parâmetros farmacocinéticos fracos. Favorecem a aplicação de quimioterápicos tóxicos e têm capacidade de direcioná-los aos locais de tumor, reduzindo efeitos colaterais indesejados (Haider et al., 2020).

Carreadores a partir de nanopartículas lipídicas melhoraram a biodisponibilidade e a seletividade de um fármaco, mesmo em tratamentos complexos. A administração de uma nanoformulação com lipossomas contendo hemissuccinato de β-metasona (BMS) (fármaco utilizado para casos de malária cerebral pela infecção por *Plasmodium falciparum*) resultou no acúmulo de BMS no

cérebro de camundongos que continham a afecção, enquanto o mesmo não foi observado nos camundongos saudáveis que receberam a formulação. Mesmo em estágios avançados da doença, quando ocorreu a ruptura da barreira hematoencefálica e os ratos já mostravam sinais claros de comprometimento neurológico, a nanoformulação demonstrou-se eficaz. O tratamento com BMS gera níveis mais baixos de inflamação cerebral e os lipossomas estabilizados nanoestericamente melhoraram substancialmente a eficácia do BMS, além de terem eliminado a alta toxicidade observada na sua administração livre (Waknine-Grinberg et al., 2013).

Alta eficácia e diminuição na toxicidade de um fármaco mediante ao encapsulamento por nanopartículas lipídicas também foram observadas por Oliveira et al. (2015). Nanoformulações herbicidas de NLS contendo atrazina+simazina foram mais eficazes (0,3 $kg.ha^{-1}$) sobre a espécie alvo (*Raphanus raphanistrum*) em relação ao produto comercial (3 $kg.ha^{-1}$), não causando toxicidade nos organismos não-alvo. Ambos (nanoformulação e produto comercial) foram eficazes nas concentrações recomendadas (3 $kg.ha^{-1}$) e em concentrações 10 vezes menores, porém, enquanto o efeito do produto comercial diminuía, as nanoformulações permaneceram eficazes. No ensaio de toxicidade sobre fibroblastos de camundongo (Balb-c 3T3), a viabilidade celular permaneceu em torno de 100, 80 e 64% para NLS, NLS+herbicidas e formulação comercial, respectivamente, confirmando que o encapsulamento dos herbicidas nas NLS resultou em diminuição da citotoxicidade.

Em um estudo visando o controle de parasitas com sistemas de NLS e CLN, formulações contendo ivermectina e metopreno encapsulados demonstraram boa estabilidade e eficiência de encapsulação. Não foram realizados testes *in vitro* sobre parasitas, porém, os resultados do ensaio de cito e genotoxicidade demonstraram que os referidos princípios ativos, quando encapsulados, ocasionaram alteração na viabilidade celular das células da linhagem 3T3 (fibroblastos de camundongos Balb-c 3T3) e V79 (fibroblastos pulmonares de Hamster), causando menor toxidade e demonstrando a possibilidade de aplicações dessas formulações nanocarreadoras nos animais (Cola et al., 2016).

2.7.2 Nanopartículas de zeína

A proteína é um dos recursos renováveis mais importantes e pode ser usada como material biodegradável (Cuq et al., 1998). Zeína, principal proteína do endosperma do milho, representa aproximadamente 50% das proteínas totais encontradas nesse grão, conferindo sua dureza (Shukla e Cheryan, 2001). Apresenta, ainda, propriedades para o desenvolvimento de sistemas coloidais em diferentes formas e estruturas, incluindo filmes, nanopartículas, micelas, géis e fibras (Paliwal e Palakurthi, 2014).

A zeína tem ganhado destaque como material de embalagem de biopolímero seguro. Possui capacidade de atuar como barreira para a água e por esse motivo é muito utilizada em revestimento para doces, nozes, frutas e embalagem para alimentos. Na área médica, há estudos para aplicação de zeína como carreador de biocompostos para liberação em sítios específicos no corpo humano (Lawton, 2002; Picklesimer, 2005).

Devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade, a zeína é considerada segura inclusive pela FDA (Agência Federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos), responsável por promover a saúde pública. Há grande interesse científico para a aplicação dessa proteína em diversas áreas, e principalmente no maior desenvolvimento de seus sistemas de entrega tanto de nutrientes quanto de fármacos (Shukla e Cheryan, 2001; Kim e Xu, 2008; Luo e Wang, 2014).

Segundo Pascoli et al. (2020), devido à sua resistência, a zeína tem um grande potencial para atuar como nanocarreador. Nanopartículas de Zeína (NZ) (Figura 14) têm sido amplamente avaliadas em pesquisas científicas de diferentes espectros, desde estudos que visam a encapsulação de óleos essenciais e ingredientes de importância para a indústria de alimentos (Parris et al., 2005; Chen e Zong, 2015), encapsulamento, liberação controlada, direcionamento e entrega de fármacos ou suplementos terapêuticos (Liu et al., 2005; Zhong et al., 2009; Lai e Guo, 2011; Luo et al., 2012; Donsì et al., 2017; Dai et al., 2018; Mahalakshmi et al., 2020; Afonso et al., 2020), até sua aplicação na área de genética e imunogenicidade (Hadavi et al., 2018; Li et al., 2019).

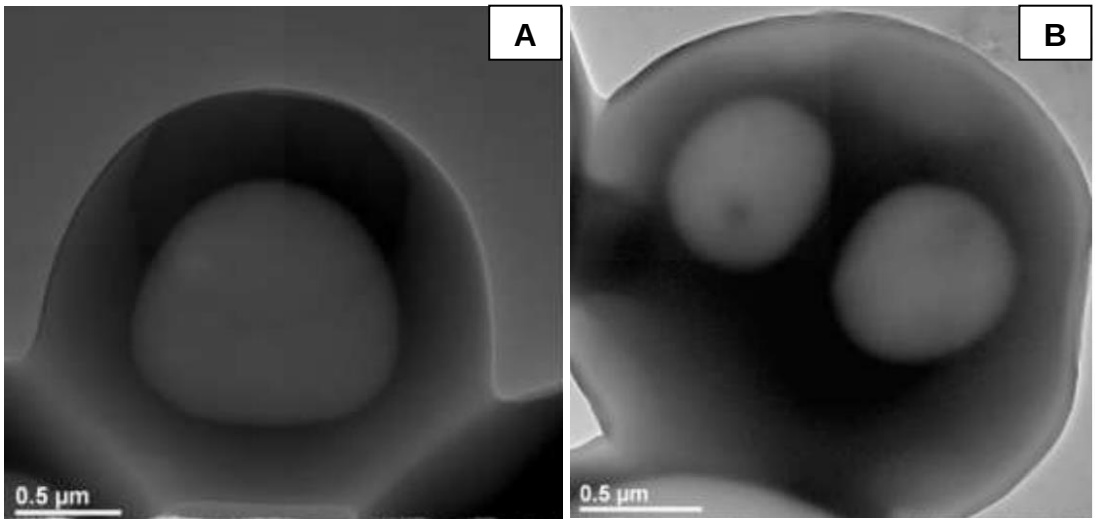


Figura 14. Micrografias de Nanopartículas de zeína (NZ) obtidas por MET. **A)** Citral encapsulado em NZ com núcleo único; **B)** Citral encapsulado em NZ com múltiplos núcleos. Fonte: Adaptado de Su (2012).

Estudos empregando NZ como carreador, com enfoque em saúde humana e animal, têm aumentado. O encapsulamento de princípios ativos com potencial repelente visando o controle de *Aedes aegypti*, assim como novos herbicidas, pesticidas e até mesmo carrapaticidas para o controle de *R. microplus* têm sido avaliados, com o intuito de serem uma alternativa para a promoção de novos fármacos eficazes e seguros, que contenham menores possibilidades de ocasionar danos aos humanos, animais e ambiente (Proença, 2018; Oliveira et al., 2018; 2019; Miranda, 2019; Pascoli et al., 2020).

Um dos principais entraves nas pesquisas na área de parasitologia veterinária é o desenvolvimento de resistência dos parasitas aos fármacos. Nanopartículas podem contribuir impedindo o desenvolvimento de alguns dos mecanismos de resistência dos parasitas, e dessa forma auxiliar na redução de resistência aos fármacos atualmente disponíveis, podem, ainda, aumentar a biodisponibilidade dos medicamentos e potencializar o alvo do tratamento. Novos antiparasitários podem ser desenvolvidos empregando-se a nanotecnologia, de maneira a ser um produto biodegradável para uso na medicina veterinária (Molento, 2009; Cruz e Molento, 2015).

REFERÊNCIAS

Afonso BS, Azevedo AG, Gonçalves C, Amado IR, Ferreira EC, Pastrana LM, Cerqueira MA (2020). Bio-Based nanoparticles as a carrier of β-carotene: production, characterisation and *in vitro* gastrointestinal digestion. **Molecules** 25:4497-4514.

Agnolin CA, Olivo CJ, Parra CLC (2014) Efeito do óleo de capim limão (*Cymbopogon flexuosus* Stapf) no controle do carrapato dos bovinos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais** 16:77-82.

Aguirre AAR, Lobo FP, Cunha RC, Garcia MV, Andreotti R (2016) Design of the ATAQ peptide and its evaluation as an immunogen to develop a *Rhipicephalus* vaccine. **Veterinary Parasitology** 221:30-38.

Ahmed MT, Loutfy N, El Shieke E (2002) Residue levels of DDE and PCBs in blood serum of women in Port Said in Egypt. **Journal of Hazardous Materials** 89:41-48.

Altun S, Ozdemir S, Arslan H (2017) Histopathological effects, responses of oxidative stress, inflammation, apoptosis biomarkers and alteration of gene expressions related toapoptosis, oxidative stress, and reproductive system in chlorpyrifos-exposed common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Environmental Pollution** 230:432-443.

Andreotti R (2010) **Situação atual da resistência do carrapato-do-boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos acaricidas no Brasil**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 36 p. (Documento Técnico).

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Índice monográfico das substâncias cipermetrina e clorpirifós**. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/C10%2B%2BCipermetrina.pdf/37400888-3f11-44ed-b53f-dea1abacb865?version=1.3; e em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/C20%2B%2BClorpirif%25C3%25B3s.pdf/f8ddca3d-4e17-4cea-a3d2-d8c5babe36ae> Acesso em: 22 set. 2020.

Attama AA, Momoh MA, Builders PF (2012) Lipid nanoparticulate drug delivery systems: a revolution in dosage form design and development. In: Sezer, AD (Ed.). **Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems**. 1. ed. Rijeka, Croatia: Intech. 5, p. 107–140. Disponível em: < https://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-novel-drug-carrier-systems/lipid-nanoparticulate-drug-delivery-systems-a-revolution-in-dosage-form-design-and-development>. Acesso em: 16 out. 2020.

Avinash B, Venu R, Raj MA, Rao KS, Srilatha Ch, Prasad TNVKV (2017) *In vitro* evaluation of acaricidal activity of novel green silver nanoparticles against deltamethrin resistance *Rhipicephalus (Boophilus) microplus.* **Veterinary Parasitology** 237:130-136.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M (2008) Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology** 46:446-475.

Bizzo HR, Hovell AMC, Rezende CM (2009) Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova** 32:588-594.

Bruni N, Stella B, Giraudo L, Pepa CD, Gastaldi D, Dosio F (2017) Nanostructured delivery systems with improved leishmanicidal activity: a critical review. **International Journal of Nanomedicine** 12: 5289-5311.

Camargo MG, Nogueira MRS, Marciano AF, Perinotto WMS, Coutinho-Rodrigues CJB, Scott FB, Angelo IC, Prata MCA, Bittencourt VREP (2016) *Metarhizium anisopliae* for controlling *Rhipicephalus microplus* ticks under field conditions. **Veterinary Parasitology** 223:38-42.

Campos EVR, Oliveira JL, Fraceto LF (2014) Applications of controlled release systems for fungicides, herbicides, acaricides, nutrients, and plant growth hormones: a review. **Advanced Science, Engineering and Medicine** 6:1-15.

Catto JB, Andreotti R, Koller WW (2010) **Atualização sobre o controle estratégico do carrapato-do-boi.** Campo Grande: Embrapa CNPGC, 6 p. (Comunicado Técnico, 123).

CEPEA-CNA – Centro de estudos avançados em economia aplicada, Esalq/Usp, Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (2018). **Boletim Cepea do Agronegócio brasileiro**. Piracicaba: CEPEA-CNA (Boletim, 8). Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/upload/kceditor/files/Relatorio%20PIBAGRO%20Brasil_MAR%C3%87O_CEPEA.pdf>. Acesso em: 23 abr. 2018.

CEPEA-CNA – Centro de estudos avançados em economia aplicada, Esalq/Usp; Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (2020). **PIB do Agronegócio**. CEPEA-CNA (06 de julho de 2020). Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/upload/kceditor/files/Cepea_CNA_PIB_jan_abr_JUL2020.pdf>. Acesso em: 28 set. 2020.

Chagas ACS, Passos WM, Prates HT, Leite RC, Furlong J, Fortes ICP (2002) Acaricide effect of *Eucalyptus* spp essential oils and concentrated emulsion on *Boophilus microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** 39:247-253.

Chagas ACS (2008) Metodologias *in vitro* para avaliação de fitoterápicos sobre parasitas e resultados de testes a campo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, **Anais...** Curitiba: CBPV, 13 p.

Chagas ACS, Rabelo MD (2012) **Método para detecção de substâncias com atividade repelente sobre larvas do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: revisão e recomendações**. São Carlos: CPPSE, 27 p. (Embrapa-CPPSE. Documento Técnico, 106).

Chagas ACS, Domingues LF, Fantatto RR, Giglioti R, Oliveira MCS, Oliveira DH, Mano RA, Jacob RG (2014) *In vitro* and *in vivo* acaricide action of juvenoid analogs produced from the chemical modification of *Cymbopogon* spp. and *Corymbia citriodora* essential oil on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology** 205:277-284.

Chagas ACS (2015) Medicinal plant extracts and nematode control. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources** 10:1-8.

Chagas ACS, Oliveira MCS, Giglioti R, Santana RCM, Bizzo HR, Gama PE, Chaves FCM (2016) Efficacy of 11 Brazilian essential oils on lethality of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Ticks and Tick-borne Diseases** 7:427-432.

Chen HD, Yada R (2011) Nanotechnologies in agriculture: New tools for sustainable development. **Trends in Food Science & Technology** 22:585-594.

Chen H, Zhong Q (2015) A novel method of preparing stable zein nanoparticle dispersions for encapsulation of peppermint oil. **Food Hydrocolloids** 43:593-602.

Cola DF, Pasquoto T, Guilger M, Lima R, Silva CMG, Fraceto LF (2016) Sistemas carreadores lipídicos nanoestruturados para ivermectina e metopreno visando controle de parasitas. **Química Nova** 39:1034-1043.

Colborn T, Vomsaal FS, Soto AM (1993) Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. **Environmental Health Perspectives** 101:378-384.

Corrêa RR, Lopes WDZ, Teixeira WFP, Cruz BC, Gomes LVC, Felippelli G, Maciel WG, Fávero FC, Buzzulini C, Bichuette MA, Soares VE, Da Costa AJ (2015) A comparison of three different methodologies for evaluating *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* susceptibility to topical spray compounds. **Veterinary Parasitology** 207:115-124.

Cruz EMO, Costa-Junior LM, Pinto JAO, Santos DA, Araujo SA, Arrigoni-Blank MF, Bacci L, Alves PB, Cavalcanti SCH, Blank AF (2013) Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology** 195:198-202.

Cruz AA, Molento MB (2015) Nanotechnology: meeting the future of Veterinary Parasitology Research. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 35:842-843.

Cruz BC, Lopes WD, Maciel WG, Felippelli G, Fávero FC, Teixeira WF, Carvalho RS, Ruivo MA, Colli MH, Sakamoto CA, Da Costa AJ, De Oliveira GP (2015) Susceptibility of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* to ivermectin (200, 500 and 630 µg/kg) in field studies in Brazil. **Veterinary Parasitology** 207:309-317.

Cuq B, Gontard N, Guilbert S (1998) Proteins as Agricultural Polymers for Packaging Production. **Cereal Chemistry** 75:1-9.

Dai L, Li R, Wei Y, Sun C, Mao L, Gao Y (2018) Fabrication of zein and rhamnolipid complex nanoparticles to enhance the stability and *in vitro* release of curcumin. **Food Hydrocoll** 77:617-628.

Dieter MP, Goehl TJ, Jameson CW, Elwell MR, Hildebrandt PK, Yuan JH (1993) Comparison of the toxicity of citral in F344 rats and B6C3F1 mice when administrated by microencapsulation in feed or by corn-oil gavage. **Food and Chemical Toxicology** 31:463-474.

Dimer FA, Friedrich RB, Beck RCR, Guterres SS, Pohlmann AR (2013) Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Química Nova** 36:1520-1526.

Donsì F, Voudouris P, Veen SJ, Velikov KP (2017) Zein-based colloidal particles for encapsulation and delivery of epigallocatechin gallate. **Food Hydrocolloids** 63:508-517.

Durán N, Marcato PD (2013) Nanobiotechnology perspectives. Role of nanotechnology in the food industry: a review. **International Journal of Food Science and Technology** 48:1127-1134.

Estrada-Peña A, García Z, Sánchez HF (2006) The distribution and ecological preferences of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in Mexico. **Experimental and Applied Acarology** 38:307-316.

Fazolin M, Estrela JLV, Monteiro AFM, Silva IM, Gomes LP, Silva MSF (2016) Combining the essential oil of *Piper aduncum* L. with comercial insecticides. **Semina: Ciências Agrárias** 37:3903-3914.

Fernández-Salas A, Alonso-Díaz MA, Alonso-Morales RA, Lezama-Gutiérrez L, Rodríguez-Rodríguez JC, Cervantes-Chávez JA (2017) Acaricidal activity of *Metarhizium anisopliae* isolated from paddocks in the Mexican tropics against two populations of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Medical and Veterinary Entomology** 31:36-43.

Ferrarini SR, Duarte MO, Rosa RG, Rolim V, Eifler-Lima VL, Von Poser G, Ribeiro VLS (2008) Acaricidal activity of limonene, limonene oxide and b-amino alcohol derivatives on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus.* **Veterinary Parasitology** 157:149-153.

Figueiredo A, Nascimento LM, Lopes LG, Giglioti R, Albuquerque RDGG, Santos MG, Falcão DQ, Nogueira JAP, Rocha L, Chagas ACS (2018) First report of the effect of *Ocotea elegans* essential oil on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus.* **Veterinary Parasitology** 252:131-136.

Florio JC (2011) Mecanismo de ação e relação dose-resposta. In: Spinosa HS, Gorniak Sl, Bernardi MM (5 Ed.) **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 17-26.

Foil LD, Coleman P, Eisler M, Fragoso-Sanchez H, Garcia-Vazquez Z, Guerrero FD, Jonsson NN, Langstaff IG, Li AY, Machila N, Miller RJ, Morton J, Pruett JH, Torr S (2004) Factors that influence the prevalence of acaricide resistance and tick-borne diseases. **Veterinary Parasitology** 125:163-181.

Furlong J (2005) **Carrapatos: Problemas e soluções**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 65 p. (Documento Técnico).

Furtado FN, Silva VAR, Pereira JRG, Kisue A, Coêlho FAZ, Coêlho MDG (2013) Avaliação *in vitro* do potencial acaricida do óleo essencial de *Tagetes minuta* frente à *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887). **Revista Biociências** 19:104-110.

George JE, Pound JM, Davey RB (2008) Acaricides for controlling ticks on cattle and the problem of acaricide resistance. In: Bowman AS, Nuttall PA (Eds). **Ticks: biology, disease and control**. Cambridge: University Press, p. 415-416.

Ghormade V, Deshpande MV, Paknikar KM (2011) Perspectives for nano-biotechnology enabled protection and nutrition of plants. **Biotechnology Advances** 29:792-803.

Gogos A, Knauer K, Bucheli TD (2012) Nanomaterials in Plant Protection and Fertilization: Current State, Foreseen Applications, and Research Priorities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 60:9781-9792.

Gomes H, Moraes J, Githaka N, Martins R, Isezaki M, Silva Vaz Jr I, Logullo C, Konnai S, Ohashi K (2015) Vaccination with cyclin-dependent kinase tick antigen confers protection against Ixodes infestation. **Veterinary Parasitology** 211:266-273.

Gonzales JC (1995) **O controle do carrapato do boi**. 2. ed. Porto Alegre: Edição do Autor. 235 p.

Goulart S, De Queiroz M, Neves AA, De Queiros JH (2008) Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. **Talanta** 75:1320-1323.

Grisi L, Leite RC, Martins JRS, Barros ATM, Andreotti R, Cançado PHD, Perez De León AA, Pereira JB, Villela HS (2014) Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 23:150-156.

Guerrero FD, Davey RB, Miller RJ (2001) Use of an allele-specific polymerase chain reaction assay to genotype pyrethroid resistant strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixadidae). **Journal of Medical Entomology** 38:44-50.

Guimarães JH, Tucci EC, Barros-Battesti DM (2001) **Ectoparasitos de importância veterinária**. São Paulo: Plêiade. 213 p.

Guglielmone AA, Gimeno E, Idiart J, Fisher WF, Volpogni MM, Quaino O, Anziani OS, Flores SG, Warnke O (1999) Skin lesions and cattle hide damage from *Haematobia irritans* infestations. **Medical and Veterinary Entomology** 13:324-329.

Guglielmone AA, Beati L, Barros-Battesti DM (2006) Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Experimental and Applied Acarology** 40:83-100.

Guglielmone AA, Szabó MPJ, Martins JRS, Estrada-Peña A (2006) **Diversidade e importância de carrapatos na sanidade animal**. In: Barros-Battesti DM, Arzua M, Bechara GH (Eds.) Carrapatos de Importância médico veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies, Vox/ICTTD-3/Butantan, São Paulo, p. 115-138.

Gunning RV, Moores GD, Devonshire AL (1999) Esterases inhibitors synergise the toxicity of pyrethroids in Australian *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science** 63:50-62.

Habeeb SM (2010) Ethno-veterinary and medical knowledge of crude plant extracts and its methods of application (traditional and modern) for tick control. **World Applied Sciences Journal** 11:1047-1054.

Hadavi M, Hasannia S, Faghihi S, Mashayekhi F, Homazadeh H, Mostofi SB (2018) Zein nanoparticle as a novel BMP6 derived peptide carrier for enhanced osteogenic differentiation of C2C12 cells. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology** 46:559-567.

Haider M, Abdin SM, Kamal L, Orive G (2020) Nanostructured Lipid Carriers for Delivery of Chemotherapeutics: A Review. **Pharmaceutics** 12:288.

He H, Chen AC, Davey RB, Ivie GW, Wagner GG, George JE (1999) Sequence analysis of the knockdown resistance-homologous regions ot the para-type sodium channel gene from pyrethroid-resistance *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology** 36:539-543.

Higa LOS, Garcia MV, Barros JC, Koller WW, Andreotti R (2016) Evaluation of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) resistance to different acaricide formulations using samples from Brazilian properties. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 25:163-171.

Higa LOS, Garcia MV, Barros JC, Bonatte Junior P (2019) Controle do carrapato-do-boi por meio de acaricidas. In: **Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos**. Brasília: Embrapa. p. 137-140.

Ibrahim MA, Kainulainen P, Aflatuni A, Tiilikkala K, Holopainen JK (2001) Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: With special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. **Agricultural and Food Science in Finland** 10:243-259.

Jin Y, Liu Z, Peng T, Fu Z (2015) The toxicity of chlorpyrifos on the early life stage of zebrafish: a survey on the endpoints at development, locomotor behavior, oxidative stress and immunotoxicity. **Fish and Shellfish Immunology** 43:405-414.

Kah M, Hofmann T (2014) Nanopesticide research: Current trends and future priorities. **Environment International** 63:224-235.

Karmaus W, Davis S, Chen Q, Kuehr J, Kruse H (2003) Atopic manifestations, breast-feeding protection and the adverse effect of DDE. **Paediatric and Perinatal Epidemiology** 17:212-220.

Kim S, Xu J (2008) Aggregate Formation of zein and its structural inversion in aqueous ethanol. **Journal of Cereal Science** 47:1-5.

Klafke GM, Sabatini GA, Albuquerque TA, Martins JR, Kemp DH, Miller RJ, Schumaker TS (2006) Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from estate of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology** 142:386-390.

Lai F, Wissing SA, Muller RH, Fadda AM (2006) *Artemisia arborescens* L essential oil-loaded solid lipid nanoparticles for potential agricultural application: Preparation and characterization. **AAPS PharmSciTech** 7:1-9.

Lai LF, Guo HX (2011) Preparation of new 5-fluorouracil-loaded zein nanoparticles for liver targeting. **International Journal of Pharmaceutics** 404:317-323.

Langeloh A (2010) Carrapaticidas, seus resíduos e a saúde do consumidor. **Revista CFMV-DF** XVI:59-61.

Lawton JW (2002) Zein: A History of Processing and Use. **Cereal Chemistry** 79:1-18.

Li F, Chen Y, Liu S, Pan X, Liu Y, Zhao H, Yin X, Yu C, Kong W, Zhang Y (2019) The effect of size, dose, and administration route on zein nanoparticle immunogenicity in BALB/c mice. **International Journal of Nanomedicine** 2019:9917-9928.

Liu X, Sun K, Wang H, Zhang L, Wang J-Y (2005) Microspheres of corn protein, zein, for an ivermectin drug delivery system. **Biomaterials** 26:109-115.

Lopes WDZ, Teixeira WFP, Matos LVS, Felippelli G, Cruz BC, Maciel WG, Buzzulini C, Fávero FC, Soares VE, Oliveira GP, Costa AJ (2013) Effects of macrocyclic lactones on the reproductive parameters of engorged *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* females detached from experimentally infested cattle. **Experimental Parasitology** 135:72-78.

Luo Y, Teng Z, Wang Q (2012) Development of zein nanoparticles coated with carboxymethyl chitosan for encapsulation and controlled release of vitamin D3. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 60:836-843.

Luo Y, Wang Q (2014) Zein-Based Micro- and Nano-Particles for Drug and Nutrient Delivery: A Review. **Journal of Applied Polymer Science** 131:1-12.

Mahalakshmi L, Leena MM, Moses JA, Anandharamakrishnan C (2020) Micro- and nano-encapsulation of β-carotene in zein protein: size-dependent release and absorption behavior. **Food & Function** 11:1647-1660.

Mans BJ, Neitz AWH (2004) Adaptation of ticks to a blood-feeding environment: evolution from a functional perspective. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 34:1-17.

Martin-Ortigosa S, Valenstein JS, Lin VS-Y, Trewyn BG, Wang K (2012) Gold Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticle Mediated Protein and DNA Codelivery to Plant Cells Via the Biolistic Method. **Advanced Functional Materials** 22:3576-3582.

Maruyama SR, Garcia GR, Teixeira FR, Brandão LG, Anderson JM, Ribeiro JMC, Valenzuela JG, Horackova J, Veríssimo CJ, Katiki LM, Banin TM, Zangirolamo AF, Gardinassi LG, Ferreira BR, Miranda-Santos IKF (2017) Mining a differential sialotranscriptome of *Rhipicephalus microplus* guides antigen discovery to formulate a vaccine that reduces tick infestations. **Parasites & Vectors** 10:2-16.

Martins JR, Evans DE, Cereser VH, Corrêa BL (2002) Partial strategic tick control within a herd of European breed cattle in the state of Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Experimental and Applied Acarology** 27:241-251.

Martins JR (2004) Manejo da resistência aos carrapaticidas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 13:114-115.

Maza AP, Pinto ISB, Fonseca I, Antunes GR, Monteiro CMO, Dae-Mon E, Muniz MS, Martins MF, Furlong J, Prata MCA (2013) A new approach to characterization of the resistance of populations of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) to organophosphate and pyrethroid in the state of Minas Gerais, Brazil. **Experimental Parasitology** 134:519-523.

Medeiros JP, Bortollucci WC, Silva ES, Oliveira HLM, Campo CFAA, Gonçalves JE, Junior RP, Gazim ZC (2019) Biocidal potential of *Eugenia pyriformis* essential oil in the control of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* in the free-living cycle. Pesquisa **Veterinária Brasileira** 39:879-888.

Mello V, Prata MCA, Silva MR, Daemon E, Silva LS, Guimarães FG, Mendonça AE, Folly E, Vilela FMP, Amaral LH, Cabral LM, Amaral MPH (2014) Acaricidal properties of the formulations based on essential oils from *Cymbopogon winterianus* and *Syzygium aromaticum* plants. **Parasitology Research** 113:4431-4437.

Miller RJ, Davey RB, George JE (1999) Characterization of pyrethroid resistance and susceptibility to coumaphos in Mexican *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology** 36:533-538.

Miranda VR (2019) **Desenvolvimento de nanopartículas de zeína contendo repelentes visando controle do mosquito *Aedes Aegypti***. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Unesp, Sorocaba.

Mogul MG, Akin H, Hasirci N, Trantolo DJ, Gresser JD, Wise DL (1996) Controlled release of biologically active agents for purposes of agricultural crop management. **Resources, Conservation and Recycling** 16:289-320.

Molento MB (2009) Parasite control in the age of drug resistance. **Veterinary Parasitology** 3:188-196.

Müller RH, Maëder K, Gohla S (2000) Solid-lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery-a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** 50:161-177.

Murrell A, Campbell NJ, Barker SC (2001) A total-evidence phylogeny of ticks provides insights into the evolution of life cycles and biogeography. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 21:244-258.

Nogueira JAP, Figueiredo A, Duarte JL, Almeida FB, Santos MG, Nascimento LM, Fernandes CP, Mourão SC, Toscano JHB, Rocha LM, Chagas ACS (2020) Repellency effect of *Pilocarpus spicatus* A. St.-Hil essential oil and nanoemulsion against *Rhipicephalus microplus* larvae. **Experimental Parasitology** 215:107919.

Nolan J, Roulston WJ, Wharton RH (1977) Resistance to Synthetic Pyrethroids in a DDT-resistant Strain of *BooPhilus microplus.* Journal of **Pesticide Science** 8:484-486.

Nuñes JL, Muñoz Cobenas ME, Moltedo HL (1982) ***Boophilus microplus*, la garrapata comun del ganado vacuno**. Buenos Aires: Hemisfério Sur. 19 p.

OCDE-FAO (2020) **OECD-FAO Agricultural Outlook 2020-2029**. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/1112c23b-en>. Acesso em: 28 set. 2020.

Oliveira LC, Taveira EJF, Souza LG, Marreto RN, Lima EM, Taveira SF (2012) Aplicações das Nanopartículas Lipídicas no Tratamento de Tumores Sólidos: Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia** 58: 695-701.

Oliveira FP, Spada JCP, Silva TSD, Ferreira LC, Luquetti BC, Soutello RVG (2013) Resistência do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos diferentes grupos de acaricidas utilizados na região Noroeste do estado de São Paulo. **Ciências Agrárias e da Saúde** 9:54-60.

Oliveira HC, Stolf-Moreira R, Martinez CBR, Grillo R, Jesus MB, Fraceto LF (2015) Nanoencapsulation enhances the post-emergence herbicidal activity of atrazine against mustard plants. **Plos One** 10:1-12.

Oliveira JL, Campos EVR, Pereira AES, Pasquoto T, Lima R, Grillo R, Andrade DJ, Santos FAD, Fraceto LF (2018) Zein nanoparticles as eco-friendly carrier systems for botanical repellents aiming sustainable agriculture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 66:1330-1340.

Oliveira JL, Campos EVR, Germano-Costa T, Lima R, Vechia JFD, Soares ST, Andrade DJ, Gonçalves KC, Nascimento J, Polanczyk RA, Fraceto LF (2019) Association of zein nanoparticles with botanical compounds for effective pest control systems. **Pest Management Science** 75:1855-1865.

Olivo CJ, Carvalho NM, Silva JHS, Vogel FF, Massariol P, Meinerz G, Agnolin CA, Morel AF, Viau LV (2008) Óleo de citronela no controle do carrapato de bovinos. **Ciência Rural** 38:406-410.

Paliwal R, Palakurthi S (2014) Zein in controlled drug delivery and tissue engineering. **Journal of Controlled Release** 189:108-22.

Pardeike J, Hommoss A, Müller RH (2009) Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products**. International Journal of Pharmaceutics** 366:170-184.

Parris N, Cooke PH, Hicks KB (2005) Encapsulation of essential oils in zein nanospherical particles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 53:4788-4792.

Pascoli M, Albuquerque FP, Calzavara AK, Tinoco-Nunes B, Oliveira WHC, Gonçalves KC, Polanczyk RA, Vechia JFD, Matos STS, Andrade DJ, Oliveira HCO, Souza Neto JÁ, Lima R, Fraceto LF (2020) The potential of nanobiopesticide based on zein nanoparticles and neem oil for enhanced control of agricultural pests. **Journal of Pest Science** 93:793-806.

Peixoto MG, Costa-Júnior LM, Blank AF, Lima AS, Menezes TSA, Santos DA, Alves PB, Cavalcanti SCH, Bacci L, Arrigoni-Blank MF (2015) Acaricidal activity of essential oils from *Lippia alba* genotypes and its major components carvone, limonene, and citral against *Rhipicephalus microplus.* **Veterinary Parasitology** 210:118-22.

Pereira MC, Labruna MB, Szabó MPJ, Klafke GM (2008) ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: biologia, controle e resistência**. São Paulo: MedVet. p. 21-25, 65-90.

Pereira JR (2009) The efficiency of avermectins (abamectin, doramectinand ivermectin) in the control of *Boophilus microplus*, in artificially infested bovines kept in field conditions. **Veterinary Parasitology** 162:116-119.

Peres F, Moreire CJ, Rodrigues MK, Claudio L (2006) Risk perception and communication regarding pesticide use in rural work: a case study in Rio de Janeiro State, Brazil. **International Journal of Occupational and Environmental Health** 12:400-407.

Perlatti B, Bergo PLS, Silva MFGF, Fernandes JB, Forim MR (2013) Polymeric Nanoparticle-Based Insecticides: A Controlled Release Purpose for Agrochemicals. In: **Insecticides - Development of Safer and More Effective Technologies**. p. 523-550.

Picklesimer P (2005) Nanotechnologist plans to build things with bricklike corn molecules. **University of Illinois at UrbanaChampaign**. Illinois: v. 24, n. 17.

Proença VR (2018) **Sistema nanocarreador de zeina para compostos bioativos (óleo de menta, cipermetrina, clorpirifós e amitraz) visando controle do carrapato bovino**. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Unesp, Sorocaba.

Raynal JT, Silva AAB, Sousa TJ, Bahiense TC, Meyer R, Portela RW (2013) Acaricides efficiency on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from Bahia state North-Central region. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 22:71-77.

Reck J, Klafke GM, Webster A, Dall'agnol B, Scheffer R, Souza AU, Coraqssini BV, Vargas R, Dos Santos SJ, Martins JR (2014) First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. **Veterinary Parasitology** 201:128-136.

Rocha SFR, Ming LC (1999) ***Piper hispidinervum*: a sustainable source of safrole**. In: Janick J. (ed.). Perspectives on new crops and news uses. Alexandria: ASHS Press, p. 479-481.

Roel AR (2001) The use of plants with insecticide properties: a contribution for Sustainable Rural Development. **Interações – Revista Internacional de Desenvolvimento Local** 1:43-50.

Sartor IF, Santarém VA (2018). **Agentes empregados no controle de ectoparasitas**. In.: Spinosa HS, Gorniak Sl, Bernardi MM (6 Ed.) **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 600-603.

Schwarzenbach RP, Egli P, Hofstetter TB, Gunten U, Wehrli B (2010) Global Water Pollution and Human Health. **Annual Review of Environment and Resources** 35:109-136.

Shalaby HA, Abu El Ezz NMT, Farag TK, Abou-Zeina HAA (2012) *In vitro* efficacy of a combination of ivermectin and *Nigella sativa* oil against helminth parasites. **Global Veterinaria** 9:465-473.

Shukla R, Cheryan M (2001) Zein: the industrial protein from corn. **Industrial Crops and Products** 13:171-192.

Sigma Aldrich: **Analytical, Biology, Chemistry & Materials** (2020). Disponível em: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/c83007?lang=pt&region=BR; <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/lmenthol15627221651511?lang=pt&region=BR;<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/183164?lang=pt&region=BR >. Acesso em: 15 out. 2020.

Sousa EO, Lima AS, Lopes SG, Costa-Junior LM, Costa JGM (2020) Chemical composition and acaricidal activity of *Lantana camara* L. and *Lantana montevidensis* Briq. essential oils on the tick *Rhipicephalus microplus.* **Journal of Essential Oil Research** 32:316-322.

Souto BE, Severino P, Santana AHM, Pinho CS (2011) Nanopartículas de lipídios sólidos: Métodos clássicos de produção laboratorial. **Química Nova** 34:1762-1769.

Su C-P (2012) **Zein encapsulation of amphiphilic compounds**. 97f. Dissertação (Master's degree in Food Science and Human Nutrition) – University of Illinois, Urbana.

Taylor MA, Coop RL, Wall RL (3 Ed) (2007) **Parasitologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 576-577.

Trentelman JJA, Kleuskens JAGM, Crommert J, Schetters TPM (2017) A new method for *in vitro* feeding of *Rhipicephalus australis* (formerly *Rhipicephalus microplus*) larvae: a valuable tool for tick vaccine development. **Parasites & Vectors** 10:2-9.

Ueno TEH, Mendes EEB, Pomaro SHK, Lima CKP, Guilloux AGA, Mendes MC (2012) Sensitivity profile of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* ticks of dairy cattle to acaricides in small farms in the northwestern São Paulo State, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico** 79:177-183.

Valente PP, Moreira GHFA, Serafini MF, Facury-Filho EJ, Carvalho AU, Faraco AAG, Castilho RO, Ribeiro MFB (2017) *In vivo* efficacy of a biotherapic and eugenol formulation against *Rhipicephalus microplus*. **Parasitology Research** 116:929-938.

Vargas MS, Céspedes NS, Sánchez HF, Martins JR, Céspedes COC (2003) *In vitro* evaluation of a field strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) resistant to Amitraz. **Ciência Rural** 33:737-742.

Veríssimo CJ, Silva RG, Oliveira AAD, Ribeiro WR, Rocha UF (1997) Contagens de ínstares do carrapato *Boophilus microplus* em bovinos mestiços. **Boletim de Indústria Animal** 54:21-26.

Villarino MA, Waghela SD, Wagner GG (2001) Histochemical localizations on esterases in integument of the female *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) tick. **Journal of Medical Entomology** 38:780-782.

Vinturelle R, Mattos C, Meloni J, Lamberti HD, Nogueira J, Vaz Júnior IS, Rocha L, Lione V, Folly E (2021) Evaluation of essential oils as an ecological alternative in the search for control *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports** 23: 100523.

Waknine-Grinberg JH, Even-Chen S, Avichzer J, Turjeman K, Bentura-Marciano A, Haynes RK, Weiss L, Allon N, Ovadia H, Golenser J, Barenholz Y (2013). Glucocorticosteroids in nano-sterically stabilized liposomes are efficacious for elimination of the acute symptoms of experimental cerebral malaria. **PLoS ONE** 8:e72722.

Webster A, Pradel E, Souza UA, Martins JR, Reck J, Schrank A, Klafke G (2017) Does the effect of a *Metarhizium anisopliae* isolate on *Rhipicephalus microplus* depend on the tick population evaluated? **Ticks and Tick-borne Diseases** 8:270-274.

Wissing SA, Kayser O, Müller RH (2004) Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews** 56:1257-1272.

Wong HL, Bendayon R, Rauth AM, Li Y, Wu XY (2007) Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews** 59:491-504.

Zhong QX, Tian HL, Zivanovic S (2009) Encapsulation of fish oil in solid zein particles by liquid-liquid dispersion. **Journal of Food Processing and Preservation** 33:255-270.

CAPÍTULO 2 - Uso de nanocarreadores lipídicos no desenvolvimento de nanoformulações para controle de larvas de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*

Resumo

Nanocarreadores de acaricidas para carrapato permitem melhorar a biodisponibilidade, absorção e distribuição tecidual dos princípios ativos, liberá-los de maneira lenta, direcionada, protegendo-os contra a degradação prematura. Assim, o objetivo desse estudo foi desenvolver formulações a partir de Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) ou Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN) associados a cipermetrina (cip) + clorpirifós (clo) e um composto vegetal (citral, mentol ou limoneno), caracterizá-las e verificar sua eficácia sobre *R. microplus*. Seis diferentes formulações foram desenvolvidas e caracterizadas por Dynamic Light Scattering (DLS) e Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). As formulações 1 (NLS+cip+clo+citral), 2 (NLS+cip+clo+mentol), 3 (NLS+cip+clo+limoneno), 4 (CLN+cip+clo+citral), 5 (CLN+cip+clo+mentol) e 6 (CLN+cip+clo+limoneno) obtiveram médias de diâmetro de 286 a 304 nm; polidispersão de 0,16 a 0,18; potencial zeta de -15,8 a -20 mV, concentração de 3,37 ± 0,24 x 10^{13} a 5,44 ± 0,18 x 10^{13} partículas/mL; e Eficiência de Encapsulação (EE) > 98,01% para todos os princípios ativos. Todas as formulações foram avaliadas quanto ao seu potencial acaricida e comparadas com controles positivo (Colosso®) e negativos (água destilada; e nanopartículas sem princípio ativo). Na avaliação das formulações de nanocarreadores lipídicos, pelo Teste de Pacote de Larvas (TPL), os controles negativos não ocasionaram mortalidade das larvas, enquanto o controle positivo, avaliado na concentração de 0,512 mg.mL^{-1}, causou 100% de mortalidade. As formulações de NLS 1, 2, 3 e de CLN 4, 5 e 6 foram avaliadas de 0,004 a 0,466 mg.mL^{-1}. Na concentração de 0,007 mg.mL^{-1} atingiram 90,4, 75,9, 93,8, 100, 95,1, 72,7 % de mortalidade. Com excessão da 4, para a qual não foi possível determinar concentrações letais (CL), as formulações 1, 2, 3, 5 e 6 resultaram em CL_{50} e CL_{90} de: 0,0033 e 0,0072, 0,0054 e 0,0092, 0,0040 e 0,0081, 0,0023 e 0,0054, 0,0055 e 0,0094 mg.mL^{-1}, respectivamente. Foi possível encapsular os princípios ativos e caracterizar os sistemas carreadores lipídicos. As nanoformulações de NLS e CLN foram capazes de proteger os princípios ativos contra a degradação em solução, o que é uma característica de estabilidade visada para produtos

carrapaticidas comerciais e as formulações com ambos os nanocarreadores foram eficazes sobre larvas de *R. microplus*. Espera-se que esses achados possam contribuir com novos estudos e ser mais um incentivo ao emprego de nanocarreadores no desenvolvimento de novos carrapaticidas visando menor quantidade de princípios ativos, a fim de promover um controle parasitário mais seguro, com menor risco de resíduos nos alimentos de origem animal e no ambiente.

Palavras-chave: carrapato bovino, nanopartículas lipídicas sólidas, carreadores lipídicos nanoestruturados, cipermetrina, clorpirifós, fitoterapia.

1. Introdução

O carrapato *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae) é um obstáculo para a pecuária, sobretudo em países tropicais e subtropicais, onde encontra condições ideais para a sua multiplicação. Além de queda na produção de leite/carne e lesões no couro (porta de entrada para infecções e miíases), pode transmitir hemoparasitas que causam severa anemia e altas taxas de mortalidade (De La Fuente et al., 2008; Labruna et al., 2009). A falta de controle desse parasita agrava os prejuízos econômicos (Grisi et al., 2014) e para minimizar perdas, uma das estratégias consiste em reduzir as populações a níveis economicamente aceitáveis (Martins et al., 2002).

A falha na eficácia de produtos comerciais carrapaticidas pode estar ligada à resistência (Abbas et al., 2014; Klafke et al., 2017; Rodriguez-Vivas et al., 2018). Apesar disso, acaricidas sintéticos são os mais empregados no controle de *R. microplus* e continuarão sendo a base dos programas de controle nos próximos anos, entretanto, é importante que seu uso seja racional e estratégico (Kumar, 2019). Nesse sentido, agentes sinergistas e repelentes (como butóxido de piperonila e citronelal) podem contribuir para potencializar uma formulação carrapaticida (Gomes et al., 2011; Higa et al., 2016).

Acaricidas utilizados de forma indiscriminada podem ameaçar a saúde humana (pelo risco da presença de resíduos químicos nos produtos de origem animal) e ocasionar impactos ambientais (Graf et al., 2004; Fagnani et al., 2011; Wang e Kannan, 2018). Por esses motivos, busca-se controles alternativos. Espécies vegetais podem ser fontes de biopesticidas para substituir/complementar carrapaticidas

sintéticos (Corrêa e Salgado, 2011). A utilização de seus compostos pode reduzir os riscos de resíduos, de custos, e da taxa de seleção para resistência devido aos diferentes modos de ação sobre os parasitas. Esses compostos ainda tendem a ter uma degradação mais rápida no ambiente e podem promover a extensão da vida útil dos acaricidas comerciais (Chagas, 2015), entretanto, possuem limitações, como: fácil degradação/volatilização quando expostos ao ambiente, baixa estabilidade físico-química e alto índice decomposição térmica, dificultando a aplicação prática (Chagas et al., 2014; Oliveira et al., 2014).

A nanotecnologia tende a contribuir com ferramentas para o aperfeiçoamento da estabilidade físico-química de princípios ativos, como é o caso dos nanocarreadores, que podem aumentar a disponibilidade desses, promover uma liberação mais lenta e direcionada e protegê-los contra a degradação prematura. Podem ainda melhorar processos de absorção/distribuição tecidual e diminuir possíveis efeitos tóxicos, sendo um potencial aliado para atuar no controle de pragas agrícolas e de importância veterinária (Fricker et al., 2010; Ghormade et al., 2011; Gogos et al., 2012; Underwood e van Eps, 2012; Rai e Ingle, 2012; Kah et al., 2013; Perlatti et al. 2013; Durán e Marcato, 2013; Kah e Hofmann, 2014; Cola et al., 2016; Benelli et al., 2017). Considerando-se que combinações de diferentes classes de compostos químicos geralmente são mais eficazes do que formulações com único princípio ativo (Vargas et al., 2003), o objetivo desse estudo foi desenvolver formulações a partir de cipermetrina + clorpirifós e um composto vegetal (citral, mentol ou limoneno) associados à Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) ou Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN), caracterizá-las e verificar a eficácia dessas sobre larvas de *R. microplus.* Espera-se que este estudo possa contribuir para o desenvolvimento de alternativas para o controle de ectoparasitas a fim de minimizar os problemas residuais, de resistência e de toxicidade.

2. Material e Métodos

2.1 Local e condições experimentais

As formulações de NLS e CLN foram desenvolvidas e caracterizadas no Laboratório de Nanotecnologia Ambiental da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Sorocaba-SP.

Fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram coletadas de bovinos (livres de tratamento acaricida por no mínimo 90 dias) pertencentes à Embrapa Pecuária Sudeste – CPPSE, São Carlos-SP. Após incubação dessas fêmeas, postura e eclosão, o teste *in vitro* foi realizado no Laboratório de Parasitologia Veterinária dessa mesma Unidade de Pesquisa.

Todos os protocolos foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Embrapa (CEUA-CPPSE nº. 01/2019).

2.2 Reagentes

As substâncias sintéticas cipermetrina e clorpirifós foram adquiridas na Sigma-Aldrich, bem como o citral (Ref: C83007/Código: 5392405), mentol (Ref: W266523/Código: 1002126617), limoneno (Ref: 183164/Código: 1001647352). Também foram utilizados: ácido oleico - Sigma®, gliceril tripalmitato (85%) - Sigma®, Poli (Álcool Vinílico) – (PVA) - Sigma®, clorofórmio (analítico) - Merck®, acetonitrila (grau HPLC) – JT Baker®, membranas filtrantes de celulose 30 kDa- Millipore®.

2.3 Preparo das Nanopartículas Lipídicas

Preconizou-se o processo emulsão/evaporação de solvente, adaptado de Vitorino et al. (2011). A solução contendo 30 mL de água deionizada e 1,25% (v:v) de Poli (Álcool Vinílico) (polímero semicristalino utilizado como tensoativo), foi mantida sob agitação. Em seguida, 250 mg de tripalmitina foram dissolvidos em 5 mL de clorofórmio, e foram adicionados 18,75 mg de cipermetrina, 31,25 mg de clorpirifós e 1,25 mg do composto vegetal (citral, mentol ou limoneno). A fase orgânica foi gotejada na fase aquosa e essa solução foi submetida à sonicação (40 W) por 5 minutos,

resultando em uma pré-emulsão, a qual foi submetida a ultraturrax e agitada vigorosamente (14.000 rpm) por 7 minutos. Posteriormente, realizou-se a evaporação do solvente orgânico com o auxílio de um evaporador rotativo, concentrando-se a emulsão até 10 mL e obtendo-se Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) com os princípios ativos encapsulados. O mesmo procedimento foi realizado para o preparo de Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN), porém, utilizando-se 125 mg de tripalmitina e 125 mg de ácido oleico. Ao final do preparo, as seis diferentes formulações encontravam-se na concentração de 5,125 $mg.mL^{-1}$ (0,125, 1,875 e 3,125 $mg.mL^{-1}$ de composto vegetal, cipermetrina e clorpirifós, respectivamente), que foi submetida aos testes de caracterização e estabilidade dos sistemas lipídicos, conforme detalhado na Tabela 1, a seguir:

Tabela 1. Composição e concentração dos princípios ativos nas formulações de Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) e de Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN) ao final do preparo (para caracterização e avaliação de estabilidade), em comparação com o produto comercial.

Formulações de NLS e de CLN ao final do preparo (5,125 $mg.mL^{-1}$)				
Formulações	**cipermetrina**	**clorpirifós**	**composto vegetal**	
1 - NLS	1,875 $mg.mL^{-1}$	3,125 $mg.mL^{-1}$	**citral**	0,125 $mg.mL^{-1}$
2 - NLS	1,875 $mg.mL^{-1}$	3,125 $mg.mL^{-1}$	**mentol**	0,125 $mg.mL^{-1}$
3 - NLS	1,875 $mg.mL^{-1}$	3,125 $mg.mL^{-1}$	**limoneno**	0,125 $mg.mL^{-1}$
4 - CLN	1,875 $mg.mL^{-1}$	3,125 $mg.mL^{-1}$	**citral**	0,125 $mg.mL^{-1}$
5 - CLN	1,875 $mg.mL^{-1}$	3,125 $mg.mL^{-1}$	**mentol**	0,125 $mg.mL^{-1}$
6 - CLN	1,875 $mg.mL^{-1}$	3,125 $mg.mL^{-1}$	**limoneno**	0,125 $mg.mL^{-1}$
Produto comercial (410 $mg.mL^{-1}$)				
	cipermetrina	**clorpirifós**	**citronelal**	
Colosso®	150 $mg.mL^{-1}$	250 $mg.mL^{-1}$	10 $mg.mL^{-1}$	

2.4 Quantificação dos princípios ativos e Determinação da Eficiência de encapsulação

Os princípios ativos foram quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), empregando-se um CLAE-Varian com Sistema controlador, isocrático, detector UV-VIS, injetor automático. Para cada princípio ativo utilizou-se coluna cromatográfica, fase móvel e parâmetros específicos, conforme descrito na Tabela 2, a seguir:

Tabela 2. Condições analíticas utilizadas para quantificação dos princípios ativos por meio da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Amostra	Cipermetrina	Clorpirifós	Citral	Mentol	Limoneno
Fase Móvel	Acetonitrila/Água (85:15) (v:v)	Metanol/Água (82:18) (v:v)	Acetonitrila/Água (70:30) (v:v)	Metanol/Água (70:30) (v:v)	Metanol/Água (85:15) (v:v)
Volume de Injeção	100 µL	100 µL	100 µL	20 µL	20 µL
Fluxo	1,0 mL/min	1,0 mL/min	1,0 mL/min	1,0 mL/min	1,0 mL/min
Temperatura	Ambiente (25°C)	Ambiente (25°C)	Ambiente (25°C)	Ambiente (25°C)	Ambiente (25°C)
Detector	Ultravioleta (UV), λ= 210 nm	Ultravioleta (UV), λ= 230nm	Ultravioleta (UV), λ= 233 nm	Ultravioleta (UV), λ= 270 nm	Ultravioleta (UV), λ= 204 nm
Coluna Cromatográfica	Phenomenex® Kinetex C18 2,6µ 100A, 150 x 4,60mm	Phenomenex® Gemini-NX C18 5µ 110A, 150 x 4,60mm	Phenomenex® Gemini-NX C18 5µ 110A, 150 x 4,60mm	Phenomenex® Gemini-NX C18 5µ 110A, 150 x 4,60mm	Phenomenex® Gemini-NX C18 5µ 110A, 150 x 4,60mm

As estimativas dos Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) foram realizadas a partir de dados obtidos com as regressões lineares das curvas analíticas aplicados às equações LD = DP x 3 / IC; e LQ = DP x 10 / IC, em que “DP” corresponde ao desvio padrão do coeficiente linear com o eixo y e “IC” a inclinação da curva analítica média (Brasil, 2003; Inmetro, 2011). Para a análise de solubilização, aplicou-se o coeficiente de partição (Log P), sendo P = Co/Ca, em que “Co” corresponde a concentração do soluto na fase n-octanol e “Ca” a concentração do soluto na fase aquosa (Curtis e Mnzava, 2000; Yamamoto, 1970).

A Determinação da Eficiência de encapsulação dos princípios ativos encapsulados pelas nanopartículas de NLS ou CLN foi determinada pelo método de ultrafiltração/centrifugação, utilizando-se celulose regenerada de 10 kDa (Microcon – Millipore®), e o ultrafiltrado foi quantificado por CLAE (Gamisans et al., 1999; Schaffazick et al., 2003; Kilic et al., 2005). Por meio das curvas analíticas, obteve-se a eficiência de encapsulamento (EE), por meio da equação: % EE = A / B x 100, em que “A” corresponde à quantidade do princípio ativo encapsulada nas partículas e “B” ao total inicial de princípio ativo adicionado às formulações.

2.5 Caracterização das nanopartículas

Os dados de médias de diâmetro, polidispersão, potencial zeta, distribuição do tamanho, concentração e pH para análise das formulações foram coletados nos dias: 0, 7°, 15°, 30°, 60°, 90° e 120° de armazenamento. Todos os resultados foram expressos em triplicatas.

2.5.1 Medidas de Diâmetro, Polidispersão e Potencial Zeta por Espectroscopia de correlação de fótons (Dynamic Light Scattering - DLS)

Foram avaliados a partir da diluição de suspensões de partículas em água deionizada (1:1000 v:v) submetidas a um analisador de partículas (*ZetaSizer Nano ZS90*, Malvern®) sob um ângulo fixo de 90º e 25 ºC. A distribuição do diâmetro médio foi obtida pelo índice de polidispersão por *DLS* (Govender et al., 1999; Venkatraman et al., 2005).

2.5.2 Medidas de Distribuição de Tamanho e Concentração das partículas por Análise de Rastreamento de Nanopartículas (Nanoparticle Tracking Analysis - NTA)

Suspensões de nanopartículas foram diluídas 30.000 vezes. Para garantir a análise de diferentes partículas, 1 mL de suspensão da amostra foi injetado na célula volumétrica para cada réplica, a fim de deslocar o conteúdo medido anteriormente. Cada repetição constituiu-se de 5 medições de partículas quantificadas em cada

análise. Os dados foram coletados por meio de uma célula *NanoSight LM 10* (laser verde, 532 nm) e câmera sCMOS utilizando o NanoSight (v. 3.1). Para evitar a contaminação das amostras, medições da água deionizada foram realizadas. Obteve-se, assim, a distribuição de tamanho das partículas em função da concentração por NTA (Anderson et al., 2013).

2.5.3 Estabilidade lipídica (pH)

Foi avaliada empregando-se um pHmetro (Jenway®, modelo 3510) previamente calibrado com soluções tampão (pH 7,0 e 4,0).

2.6 Diluições para o teste *in vitro* sobre *Rhipicephalus microplus*

2.6.1 Nanoformulações

A partir de cada nanoformulação de NLS ou CLN (5,125 $mg.mL^{-1}$), a diluição 1:11 (v:v) foi realizada em água destilada, obtendo-se a concentração de 0,466 $mg.mL^{-1}$ (0,01132, 0,1705 e 0,2841 $mg.mL^{-1}$ de composto vegetal, cipermetrina ou clorpirifós, respectivamente) (Tabela 3), e diluições seriadas a partir dessa foram realizadas para a avaliação pelo Teste de Pacote de Larvas (TPL) sobre *R. microplus*.

2.6.2 Controle positivo

A partir do produto comercial (410 $mg.mL^{-1}$), a diluição 1:801 (v:v) (indicada na bula do Colosso Pulverização®), foi realizada em água destilada, obtendo-se a concentração de 0,512 $mg.mL^{-1}$ (0,0124, 0,1873 e 0,3121 $mg.mL^{-1}$ de citronelal, cipermetrina e clorpirifós, respectivamente) (Tabela 3). A partir dessa, foram realizadas diluições seriadas para a avaliação pelo TPL sobre *R. microplus*.

Tabela 3. Composição e concentração dos princípios ativos nas formulações de Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) e de Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN) após a diluição para o teste sobre larvas de Rhipicephalus microplus, em comparação com o produto comercial.

Formulações de NLS e de CLN após a diluição 1:11 (v:v) (0,466 mg.mL^{-1})				
Formulações	**cipermetrina**	**clorpirifós**	**composto vegetal**	
1 - NLS	0,170 mg.mL^{-1}	0,284 mg.mL^{-1}	**citral**	0,011 mg.mL^{-1}
2 - NLS	0,170 mg.mL^{-1}	0,284 mg.mL^{-1}	**mentol**	0,011 mg.mL^{-1}
3 - NLS	0,170 mg.mL^{-1}	0,284 mg.mL^{-1}	**limoneno**	0,011 mg.mL^{-1}
4 - CLN	0,170 mg.mL^{-1}	0,284 mg.mL^{-1}	**citral**	0,011 mg.mL^{-1}
5 - CLN	0,170 mg.mL^{-1}	0,284 mg.mL^{-1}	**mentol**	0,011 mg.mL^{-1}
6 - CLN	0,170 mg.mL^{-1}	0,284 mg.mL^{-1}	**limoneno**	0,011 mg.mL^{-1}
Produto comercial após diluição 1:801 (v:v) (0,512 mg.mL^{-1})				
	cipermetrina	**clorpirifós**	**citronelal**	
Colosso®	0,187 mg.mL^{-1}	0,312 mg.mL^{-1}	0,012 mg.mL^{-1}	

2.7 Teste de Pacote de larvas (TPL)

Papéis filtro (2 cm × 2 cm) foram impregnados com 1 mL de cada formulação (em diferentes concentrações: 0,004, 0,007, 0,014, 0,029, 0,058, 0,116, 0,233 e 0,466 mg.mL^{-1}) e cerca de 100 larvas com idade entre 14 e 21 dias foram depositadas em um desses papéis, cobertas com outro e em seguida foram depositados em um papel filtro maior (7,5 x 8,5 cm) que foi dobrado, vedado com clipes e mantido em incubadora (±27°C e UR > 80%) por 24 horas (FAO, 1971). As leituras foram realizadas, utilizando-se bomba de vácuo com ponteira de barreira (1000 µL) acoplada à mangueira, contando-se as larvas vivas e mortas. Os resultados foram expressos em triplicatas para cada concentração. Avaliou-se, ainda, NLS e CLN (sem princípios ativos), controle negativo composto por água destilada e o controle positivo Colosso Pulverização® na concentração de 0,512 mg.mL^{-1}.

2.8 Análises estatísticas

Os resultados das medidas de caracterização e estabilidade e pH das formulações foram submetidos a análises estatísticas de variância (ANOVA), com o teste de Tukey-Kramer, utilizando-se o programa GraphPad Prism v.7®. Os resultados do TPL foram submetidos ao ANOVA-One-Way e comparação múltipla pelo teste de Tukey. A determinação das concentrações letais (CLs) das formulações foi realizada por meio da regressão linear Probit, utilizando a distribuição normal, e o modelo linear generalizado foi utilizado para dados binários (regressão logística), com estimativas dos parâmetros dessas equações por máxima verossimilhança. CL_{50} e CL_{90} foram estimadas. Os dados foram analisados pelo pacote estatístico do SAS® (2002/2010).

3. Resultados

3.1 Caracterização e estabilidade das formulações de nanopartículas lipídicas

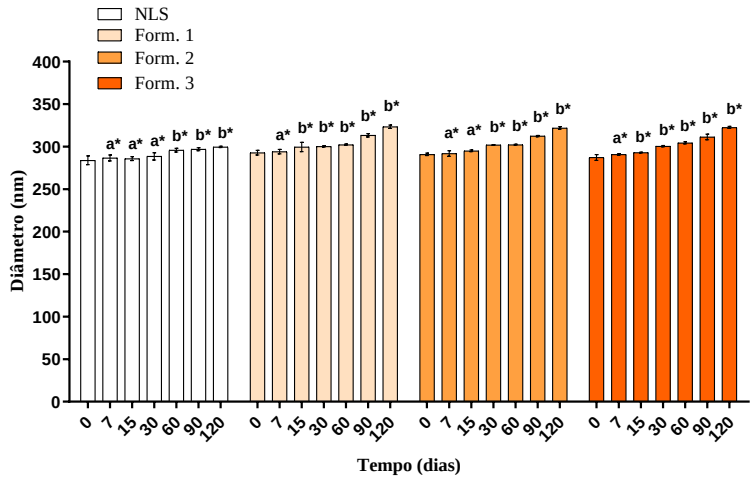
A partir de resultados obtidos por meio das regressões lineares das curvas de calibração, cipermetrina, clorpirifós, citral, mentol e limoneno apresentaram LD de: 1,05, 0,37, 12,58, 12,94 e 2,59 $\mu g.mL^{-1}$ e LQ de: 3,49, 1,23, 41,95, 43,14 e 9,64 $\mu g.mL^{-1}$, respectivamente, enquanto os coeficientes de partição (Log P) para esses princípios ativos foram de: 2,44, 1,39, 3,17, 3,40, 4,45, apresentando: $9x10^{-6}$, 0,00139, 0,42, 0,456, e 0,00569 $g.L^{-1}$ de solubilidade em água.

As curvas analíticas para cada formulação obtiveram coeficiente de correlação superiores a (r) 0,99. A média da porcentagem de EE de todos os princípios ativos foram de: 98,51 ± 0,10%, 98,47 ± 0,10%, 98,34 ± 0,11%, 98,13 ± 0,12% e 98,01 ± 0,11%, respectivamente, para cipermetrina, clorpirifós, citral, mentol e limoneno.

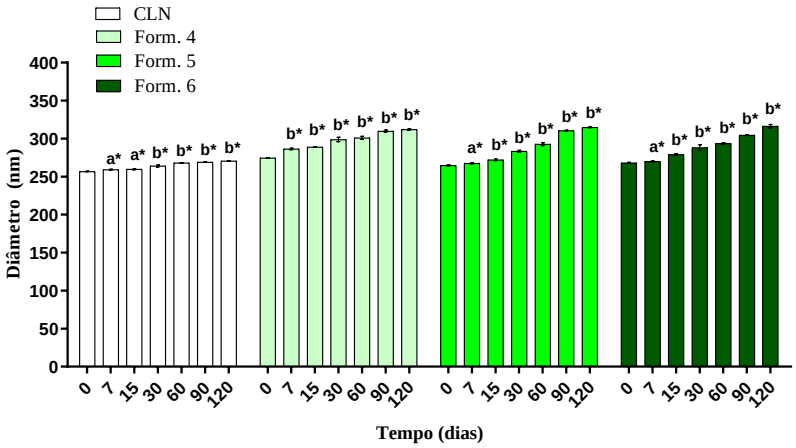
Em todas as formulações, ambos os sistemas nanocarreadores demostraram um perfil monomodal, prevalecendo apenas uma população de nanopartículas.

Na Figura 1 estão os resultados das médias de diâmetro obtidas para as nanopartículas de cada formulação.

A)



B)



a* representa variações não significativas entre o mesmo carreador ou mesma formulação, em função do tempo, em comparação com o tempo inicial (0); b* representa variações significativas entre o mesmo carreador ou mesma formulação, em função do tempo, em comparação com o tempo inicial (0) (Teste de Tukey, p<0,05).

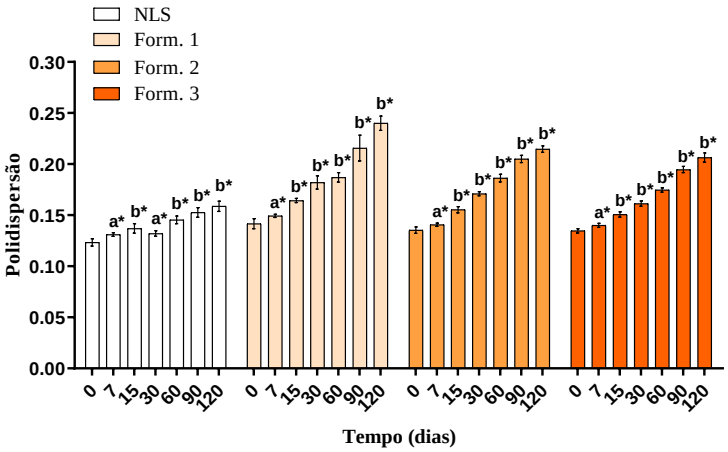
Figura 1. Médias de diâmetro das partículas. **A)** NLS, formulações 1 (NLS+cip+clo+citral), 2 (NLS+cip+clo+mentol) e 3 (NLS+cip+clo+limoneno); **B)** CLN, formulações 4 (CLN+cip+clo+citral), 5 (CLN+cip+clo+mentol) e 6 (CLN+cip+clo+limoneno). NLS = Nanopartículas Lipídicas Sólidas; CLN = Carreadores Lipídicos Nanoestruturados; cip = cipermetrina (1,875 $mg.mL^{-1}$); clo = clorpirifós (3,125 $mg.mL^{-1}$); citral, mentol, limoneno (0,125 $mg.mL^{-1}$).

Conforme Figura 1, no tempo inicial (0), todas as partículas apresentaram diâmetros médios abaixo de 300 nm. As médias para NLS e CLN foram de: 291 e 264 nm, respectivamente, enquanto para as formulações 1, 2, 3, 4, 5 e 6 foram de: 304, 302 e 301, 296, 286 e 289 nm, respectivamente. As formulações 1, 2, 3, 4, 5 e 6

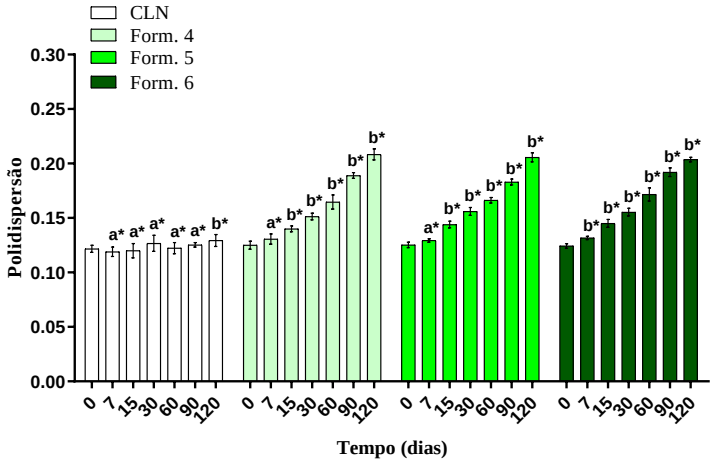
começaram a apresentar variações significativas a partir dos dias 15, 30, 15, 7, 15 e 15, respectivamente.

Na Figura 2 estão dispostos os dados médios de polidispersão das partículas, obtidos para cada formulação.

A)



B)



a* representa variações não significativas entre o mesmo carreador ou mesma formulação, em função do tempo, em comparação com o tempo inicial (0); b* representa variações significativas entre o mesmo carreador ou mesma formulação, em função do tempo, em comparação com o tempo inicial (0) (Teste de Tukey, p<0,05).

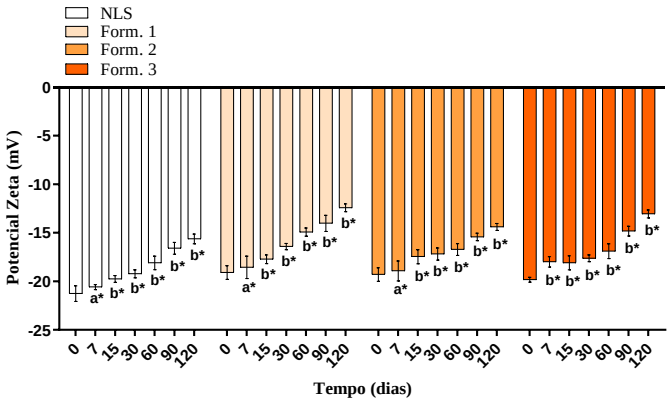
Figura 2. Polidispersão média das partículas. **A)** NLS, formulações 1 (NLS+cip+clo+citral), 2 (NLS+cip+clo+mentol) e 3 (NLS+cip+clo+limoneno); **B)** CLN, formulações 4 (CLN+cip+clo+citral), 5 (CLN+cip+clo+mentol) e 6 (CLN+cip+clo+limoneno). NLS = Nanopartículas Lipídicas Sólidas; CLN = Carreadores Lipídicos Nanoestruturados; cip = cipermetrina (1,875 mg.mL^{-1}); clo = clorpirifós (3,125 mg.mL^{-1}); citral, mentol, limoneno (0,125 mg.mL^{-1}).

De acordo com a Figura 2, é possível observar que as partículas de todas as formulações, no tempo inicial (0), apresentaram polidispersão média abaixo de 0,2.

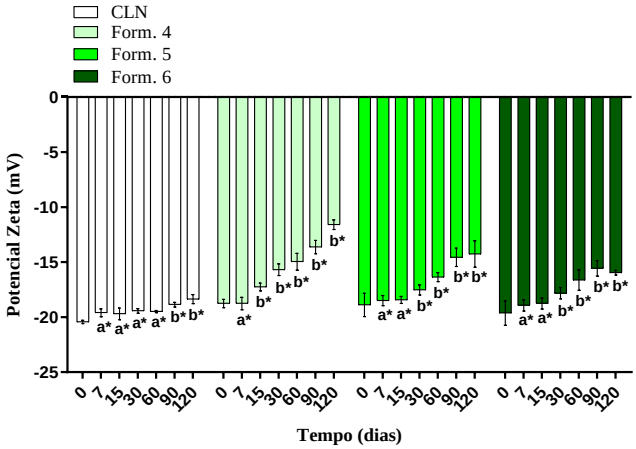
As médias para NLS e CLN foram de: 0,14 e 0,12, respectivamente, enquanto para as formulações 1, 2, 3 foram de: 0,18, 0,17, 0,16, respectivamente e 0,16 para as formulações 4, 5 e 6. Com exceção da Form. 6, que apresentou variações significativas a partir do dia 7, as demais formulações começaram a apresentar a partir do dia 15.

Na Figura 3 estão as médias de potencial zeta encontradas para cada formulação.

A)



B)



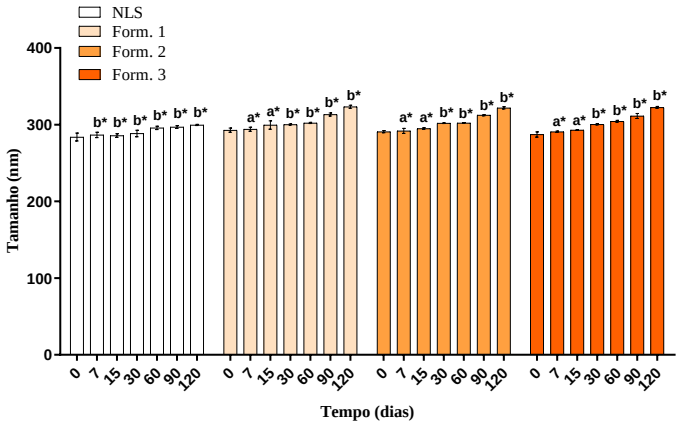
a* representa variações não significativas entre o mesmo carreador ou mesma formulação, em função do tempo, em comparação com o tempo inicial (0); b* representa variações significativas entre o mesmo carreador ou mesma formulação, em função do tempo, em comparação com o tempo inicial (0) (Teste de Tukey, p<0,05).

Figura 3. Médias de Potencial Zeta das partículas. **A)** NLS, formulações 1 (NLS+cip+clo+citral), 2 (NLS+cip+clo+mentol) e 3 (NLS+cip+clo+limoneno); **B)** CLN, formulações 4 (CLN+cip+clo+citral), 5 (CLN+cip+clo+mentol) e 6 (CLN+cip+clo+limoneno). NLS = Nanopartículas Lipídicas Sólidas; CLN = Carreadores Lipídicos Nanoestruturados; cip = cipermetrina (1,875 $mg.mL^{-1}$); clo = clorpirifós (3,125 $mg.mL^{-1}$); citral, mentol, limoneno (0,125 $mg.mL^{-1}$).

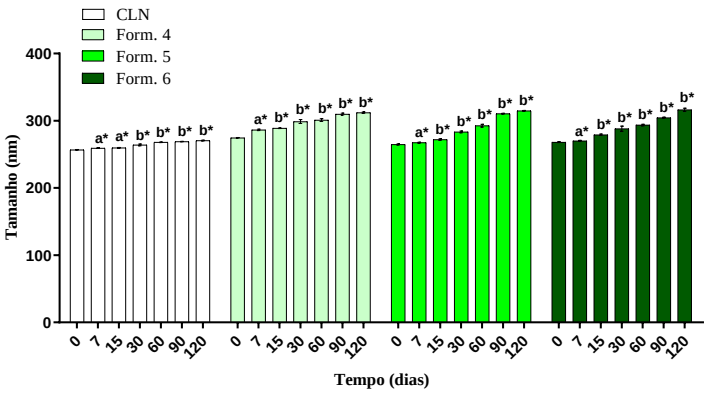
Como pode ser observado na Figura 3, as médias de potencial zeta de todas as formulações apresentaram aumento, variando entre -15,8 e -20 mV. As médias para NLS e CLN foram de: -18,7 e -20,0 mV, respectivamente, enquanto para as formulações 1, 2, 3, 4, 5 e 6 foram de: -16,1, -17,0, -16,9, -15,8, -16,9 e -17,6 mV, respectivamente. As formulações 1, 2, 3, 4, 5 e 6 começaram a apresentar variações significativas a partir dos dias 15, 15, 7, 15, 30 e 30, respectivamente.

Na Figura 4 estão as médias encontradas para a distribuição de tamanho das partículas de cada formulação.

A)



B)



a* representa variações não significativas entre o mesmo carreador ou mesma formulação, em função do tempo, em comparação com o tempo inicial (0); b* representa variações significativas entre o mesmo carreador ou mesma formulação, em função do tempo, em comparação com o tempo inicial (0) (Teste de Tukey, p<0,05).

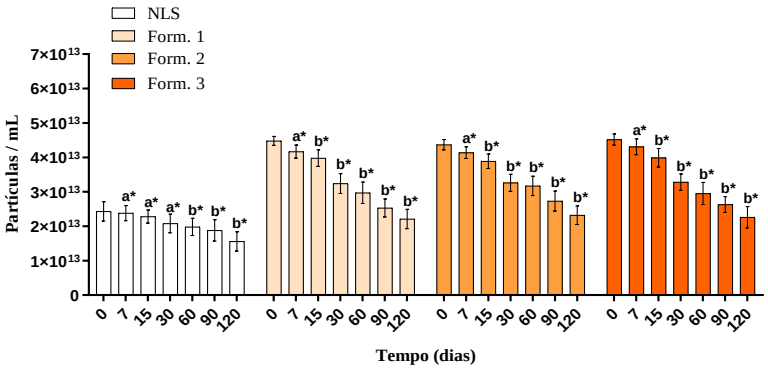
Figura 4. Médias de distribuição de tamanho das partículas. **A)** NLS, formulações 1 (NLS+cip+clo+citral), 2 (NLS+cip+clo+mentol) e 3 (NLS+cip+clo+limoneno); **B)** CLN, formulações 4 (CLN+cip+clo+citral), 5 (CLN+cip+clo+mentol) e 6 (CLN+cip+clo+limoneno). NLS = Nanopartículas Lipídicas Sólidas; CLN = Carreadores Lipídicos Nanoestruturados; cip = cipermetrina (1,875

mg.mL^{-1}); clo = clorpirifós (3,125 mg.mL^{-1}); citral, mentol, limoneno (0,125 mg.mL^{-1}).

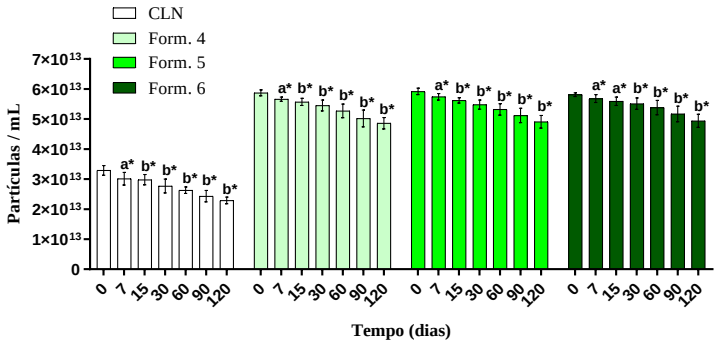
Conforme Figura 4, as médias de distribuição de tamanho de todas as partículas, no tempo inicial (0), exibiram valores abaixo de 300 nm. As médias para NLS e CLN foram de: 291 e 264 nm, respectivamente, enquanto para as formulações 1, 2, 3, 4, 5 e 6 foram de: 304, 302, 301, 296, 286, 289 nm, respectivamente. As formulações 1, 2 e 3 começaram a apresentar variações significativas a partir do dia 30 e 4, 5 e 6 a partir do dia 15, e em 120 dias apresentaram médias de distribuição de tamanho de: 323, 322, 323, 312, 315 e 316, respectivamente.

Na Figura 5 estão as médias de concentração obtidas para cada formulação.

A)



B)



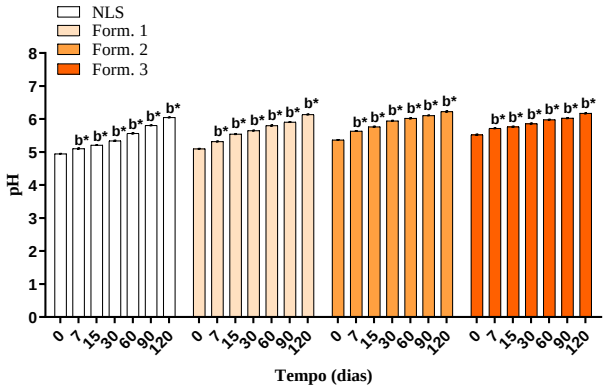
a* representa variações não significativas entre o mesmo carreador ou mesma formulação, em função do tempo, em comparação com o tempo inicial (0); b* representa variações significativas entre o mesmo carreador ou mesma formulação, em função do tempo, em comparação com o tempo inicial (0) (Teste de Tukey, p<0,05).

Figura 5. Concentração média das partículas. **A)** NLS, formulações 1 (NLS+cip+clo+citral), 2 (NLS+cip+clo+mentol) e 3 (NLS+cip+clo+limoneno); **B)** CLN, formulações 4 (CLN+cip+clo+citral), 5 (CLN+cip+clo+mentol) e 6 (CLN+cip+clo+limoneno). NLS = Nanopartículas Lipídicas Sólidas; CLN = Carreadores Lipídicos Nanoestruturados; cip = cipermetrina (1,875 mg.mL^{-1}); clo = clorpirifós (3,125 mg.mL^{-1}); citral, mentol, limoneno (0,125 mg.mL^{-1}).

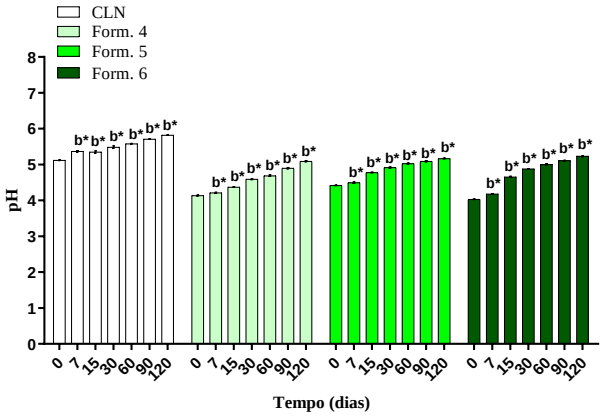
Conforme Figura 5, é possível observar que as médias para NLS e CLN foram de: 2,08 ± 0,26 x 10^{13} e 2,77 ± 0,17 x 10^{13} partículas/mL, respectivamente, enquanto para as formulações 1, 2, 3, 4, 5 e 6 foram de: 3,37 ± 0,24 x 10^{13}, 3,41 ± 0,23 x 10^{13}, 3,42 ± 0,25 x 10^{13}, 5,38 ± 0,17 x 10^{13}, 5,44 ± 0,16 x 10^{13}, 5,44 ± 0,18 x 10^{13} partículas/mL, respectivamente. As formulações 1, 2 e 3 começaram a apresentar variações significativas a partir do dia 15 e 4, 5 e 6 a partir do dia 15, 15 e 30, respectivamente, e em 120 dias apresentaram médias de: 2,21 ± 0,28 x 10^{13}, 2,32 ± 0,27 x 10^{13}, 2,26 ± 0,31 x 10^{13}, 4,86 ± 0,19 x 10^{13}, 4,91 ± 0,21 x 10^{13} e 4,94 ± 0,22 x 10^{13} partículas/mL, respectivamente.

A Figura 6 mostra os valores médios de pH obtidos para cada formulação.

A)



B)



a* representa variações não significativas entre o mesmo carreador ou mesma formulação, em função do tempo, em comparação com o tempo inicial (0); b* representa variações significativas entre o mesmo carreador ou mesma formulação, em função do tempo, em comparação com o tempo inicial (0) (Teste de Tukey, p<0,05).

Figura 6. Valores médios de pH. **A)** NLS, formulações 1 (NLS+cip+clo+citral), 2 (NLS+cip+clo+mentol) e 3 (NLS+cip+clo+limoneno); **B)** CLN, formulações 4 (CLN+cip+clo+citral), 5 (CLN+cip+clo+mentol) e 6 (CLN+cip+clo+limoneno). NLS = Nanopartículas Lipídicas Sólidas; CLN = Carreadores Lipídicos Nanoestruturados; cip = cipermetrina (1,875 mg.mL^{-1}); clo = clorpirifós (3,125

mg.mL^{-1}); citral, mentol, limoneno (0,125 mg.mL^{-1}).

Conforme Figura 6, as médias de pH permaneceram abaixo de 6.2. Os valores médios para NLS e CLN foram de: 5,4 e 5,5, respectivamente, enquanto para as formulações 1, 2, 3, 4, 5 e 6 foram de: 5,6, 5,8, 5,8, 4,6, 4,8 e 4,7, respectivamente. Variações significativas foram observadas para todas as formulações a partir do dia 15.

3.2 Teste de Pacote de Larvas (TPL)

Na Tabela 4 estão as médias de mortalidade de larvas de *R. microplus*, obtidas para as formulações e controles, a partir do TPL.

Tabela 4. Médias de eficácia das formulações de Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) e de Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN) em relação à mortalidade (%) das larvas de *Rhipicephalus microplus* pelo Teste de Pacote de Larvas (TPL).

	Formulações de NLS			**Formulações de CLN**		
Concentração (mg.mL^{-1})	**Form. 1**	**Form. 2**	**Form. 3**	**Form. 4**	**Form. 5**	**Form. 6**
0,466	100 ± 0,0^{Aa}	100 ± 0,0^{Aa}	100 ± 0,0^{Aa}	100 ± 0,0^{Aa}	100 ± 0,0^{Aa}	100 ± 0,0^{Aa}
0,233	100 ± 0,0^{Aa}	100 ± 0,0^{Aa}	100 ± 0,0^{Aa}	100 ± 0,0^{Aa}	100 ± 0,0^{Aa}	100 ± 0,0^{Aa}
0,116	100 ± 0,0^{Aa}	100 ± 0,0^{Aa}	100 ± 0,0^{Aa}	100 ± 0,0^{Aa}	100 ± 0,0^{Aa}	100 ± 0,0^{Aa}
0,058	100 ± 0,0^{Aa}	100 ± 0,0^{Aa}	100 ± 0,0^{Aa}	100 ± 0,0^{Aa}	100 ± 0,0^{Aa}	100 ± 0,0^{Aa}
0,029	100 ± 0,0^{Aa}	100 ± 0,0^{Aa}	100 ± 0,0^{Aa}	100 ± 0,0^{Aa}	100 ± 0,0^{Aa}	100 ± 0,0^{Aa}
0,014	100 ± 0,0^{Ac}	98,5 ± 0,8^{Ab}	96,3 ± 2,7^{Aa}	100 ± 0,0^{Ab}	100 ± 0,0^{Ab}	99,7 ± 0,3^{Aa}
0,007	90,4 ± 6,4^{Ab}	75,9 ± 9,8^{Ba}	93,8 ± 1,8^{Ac}	100 ± 0,0^{Ac}	95,1 ± 0,9^{Ab}	72,7 ± 7,8^{Ba}
0,004	54,5 ± 5,0^{Bc}	15 ± 1,7^{Ca}	42,2 ± 9,1^{Bb}	81,3 ± 11,1^{Bc}	76,3 ± 11,7^{Bb}	17 ± 4,1^{Ca}
C- (água destilada)	0,0 ± 0,0^{Ca}	0,0 ± 0,0^{Ca}	0,0 ± 0,0^{Ca}	0,0 ± 0,0^{Ca}	0,0 ± 0,0^{Ca}	0,0 ± 0,0^{Da}
NLS e CLN	0,0 ± 0,0^{Ca}	0,0 ± 0,0^{Ca}	0,0 ± 0,0^{Ca}	0,0 ± 0,0^{Ca}	0,0 ± 0,0^{Ca}	0,0 ± 0,0^{Da}
Colosso® (**0,512 mg.mL^{-1}**)	100 ± 0,0^{Aa}	100 ± 0,0^{Aa}	100 ± 0,0^{Aa}	100,0 ± 0,0^{Aa}	100 ± 0,0^{Aa}	100 ± 0,0^{Aa}

*Letras maiúsculas comparam os valores médios nas colunas (diferentes concentrações) entre as formulações do mesmo carreador e letras minúsculas comparam os valores médios nas linhas (diferentes formulações). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo ANOVA e teste de Tukey ($p \geq 0.05$).

Conforme Tabela 4, é possível observar que os controles negativos (água destilada, NLS e CLN) não ocasionaram mortalidade das larvas, enquanto o controle positivo Colosso®, avaliado na concentração de 0,512 mg.mL^{-1}, causou 100% de mortalidade. Do mesmo modo, todas as formulações, na maior concentração avaliada (0,466 mg.mL^{-1}), apresentaram eficácia de 100%, causando mortalidades ainda em

menores concentrações. Na concentração de 0,007 mg.mL^{-1}, as formulações 1, 2 e 3 atingiram 90,4, 75,9 e 93,8% de mortalidade de larvas, enquanto as formulações 4, 5 e 6 ocasionaram 100, 95,1 e 72,7%. Não foi possível determinar concentrações letais (CL) apenas para a formulação 4, uma vez que essa foi a única que causou 100% de mortalidade das larvas de 0,466 até 0,007 mg.mL^{-1}. As formulações 1, 2 e 3 resultaram em CL_{50} e CL_{90} de: 0,0033 (0,0029 - 0,0038) e 0,0072 (0,0064 - 0,0085); 0,0054 (0,0051 - 0,0058) e 0,0092 (0,0085 - 0,0103); e 0,0040 (0,0033 - 0,0045) e 0,0081 (0,0069 - 0,0107) mg.mL^{-1}, respectivamente, enquanto as formulações 5 e 6 resultaram em CL_{50} e CL_{90} de: 0,0023 (0,0016 - 0,0028) e 0,0054 (0,0048 - 0,0063); e 0,0055 (0,0052 - 0,0058) e 0,0094 (0,0086 - 0,0104) mg.mL^{-1}, respectivamente.

4. Discussão

O presente estudo evidenciou que foi possível encapsular os três princípios ativos em NLS e CLN. A possibilidade de encapsulamento de diferentes princípios ativos em ambos os sistemas carreadores já havia sido demonstrada, tanto de forma isolada quanto associada (Oliveira et al., 2015; Cola et al., 2016; Wang et al., 2016; You et al., 2017; Barbosa et al., 2016; Santos et al., 2017).

O fato do coeficiente de correlação linear das curvas de calibração ter sido superior a (r) 0,99, para todas as formulações indica uma ótima correlação e demonstra que os métodos analíticos utilizados apresentaram elevada linearidade, permitindo assim quantificar a porcentagem de retenção dos princípios ativos não encapsulados e livres no ultrafiltrado de cada formulação, por meio da equação previamente citada. Além disso, a taxa de retenção média de cada princípio ativo (acima de 98,01%) indica uma alta afinidade com os sistemas nanoestruturados lipídicos, possivelmente devido à hidrofobicidade e à baixa solubilidade em meio aquoso por parte desses princípios ativos (Cola et al., 2016).

O perfil monomodal, encontrado para as formulações de NLS e CLN, corrobora com os achados de Cola et al. (2016) e é uma característica importante, pois quando se almeja liberação modificada, a homogeneidade de um sistema é de extrema importância, por reduzir interferências que venham a ocorrer no processo de liberação dos princípios ativos (Govender et al., 1999; Cola et al., 2016).

O diâmetro médio abaixo de 300 nm no tempo inicial (0), obtido para todas as formulações, indicou eficiência no método de preparo das partículas (Cola et al., 2016). As médias das partículas das formulações de NLS foram maiores quando comparadas às de CLN, o que corrobora com os achados de Cola et al. (2016). O diâmetro das partículas lipídicas pode ser afetado pela composição, preparo da formulação, etc. (Marcato, 2009). Nesse sentido, Cola et al. (2016) sugeriram a relação: partículas de NLS são compostas apenas por lipídio sólido (tripalmitina) e as de CLN por tripalmitina + ácido oleico. Considerando-se que lipídios com ponto de fusão mais elevados tendem a contribuir para um aumento no tamanho das nanopartículas (Rai et al., 2008) e que o ácido oleico apresenta ponto de fusão menor que o da tripalmitina, era esperado que nas formulações de CLN as partículas apresentassem diâmetros menores. Observou-se ainda um aumento crescente no diâmetro de ambas as partículas, o que sugere possível formação de agregados, pois partículas menores apresentam maior risco de agregação no decorrer do tempo (Mohanraj e Chen, 2006; Cola et al., 2016).

As médias de polidispersão verificadas abaixo de 0,2, do tempo inicial (0) a pelo menos 60 dias, evidenciaram boa estabilidade, pois esse valor é um bom indicador (Mohanraj e Chen, 2006). As variações significativas podem estar relacionadas a fatores, como: 1) reorganização na distribuição de tamanho das partículas durante o período de armazenagem, uma vez que a polidispersão representa essa variabilidade no tamanho; 2) composição das formulações como tipo de lipídio, princípios ativos, surfactantes, etc.; 3) método, condições de preparo (temperatura, agitação, pressão, etc.) e armazenamento (Marcato, 2009; Cola et al., 2016).

Os valores médios de potencial zeta, que variaram entre -15,8 e -20 mV, estão de acordo com os achados de Cola et al. (2016) que obtiveram valores entre -14 e -25 mV. Altos índices de potencial zeta (altas cargas superficiais) impedem a aglomeração de partículas, em migração ou difusão, principal motivo da desestabilização física, ou seja, é relativamente importante ter um alto valor de potencial zeta para que haja boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais das nanopartículas adjacentes (Schaffazick et al., 2003; Xu, 2007; Marín et al., 2017). Entretanto, apesar de baixos, os resultados encontrados não indicam,

necessariamente, baixa estabilidade, pois no presente estudo a estabilidade foi determinada pela presença do tensoativo (álcool polivinílico) o qual possui ação adsorvente sobre a superfície das partículas. O tensoativo gera uma camada estabilizadora por efeito esférico e, consequentemente, reduz o potencial zeta (Mosqueira et al., 2000; Marin et al., 2013). Para que não ocorra agregação entre partículas, são necessárias altas cargas de potencial zeta. Os valores encontrados no presente estudo, no decorrer do tempo, podem estar associados à agregações das partículas, o que está correlacionado com o aumento do diâmetro dessas, e que por sua vez pode ter contribuído para a maior diminuição do potencial eletrocinético.

Foi possível notar que as concentrações médias de partículas, obtidas em 120 dias, tiveram uma tendência a ser mais baixas do que as do tempo inicial (0), o que reforça a ideia de que há uma reorganização na distribuição dos tamanhos das partículas, no decorrer do tempo, influenciando na concentração (Cola et al. 2016).

Todas as médias de pH permaneceram abaixo de 6.2, indicando boa estabilidade química dos componentes das formulações e não divergindo dos resultados de Cola et al. (2016) que tiveram pH máximo 6.0. Esses autores observaram ainda uma tendência de aumento das médias de pH nas formulações de NLS e uma tendência de diminuição nas formulações de CLN. No presente estudo, entretanto, observou-se que as médias tenderam a aumentar de maneira crescente para todas as formulações. As variações de pH entre as formulações podem estar relacionadas tanto aos componentes encapsulados em cada formulação quanto a possível degradação dos componentes pela hidrólise química de grupos funcionais presentes nesses princípios ativos (Schaffazick et al., 2003).

Conforme esperado, o controle negativo, NLS e CLN sem princípios ativos não causaram mortalidade.

Por outro lado, todas as formulações resultaram em 100% de mortalidade sobre as larvas de *R. microplus*, mesmo em baixas concentrações. As médias de mortalidade, para todas as formulações na concentração de 0,007 $mg.mL^{-1}$ foram maiores do que 70%. A presença dos nanocarreadores (NLS e CLN), os quais possuem propriedades lipofílicas, pode ter facilitado a penetração dos princípios ativos na cutícula das larvas (rica em lipídios), e dessa forma ter ocasionado mortalidade mesmo em baixas concentrações.

Embora as formulações de CLN tenham demonstrado maior potencial larvicida quando comparadas às formulações de NLS, ambas foram eficazes, assim como o controle positivo. Colosso® Pulverização® é composto por “cipermetrina + clorpirifós + citronelal” e possui um dos menores períodos de carência (3 dias) dentre os carrapaticidas sintéticos disponíveis comercialmente.

Associações de cipermetrina e organofosforados, como o clorpirifós, têm sido realizadas visando aumentar a eficácia de carrapaticidas (Mendes et al., 2013; Machado et al., 2014; Rodrigues et al., 2018), entretanto, já há relatos de resistência (Domingues et al., 2012; Ueno et al., 2012; Reginato et al., 2017).

Colosso® na concentração de 0,512 $mg.mL^{-1}$ é composto por 0,12, 0,187 e 0,312 $mg.mL^{-1}$ de citronelal, cipermetrina e clorpirifós, respectivamente. As formulações avaliadas neste estudo, na concentração de 0,466 $mg.mL^{-1}$, eram compostas por 0,011, 0,170 e 0,284 $mg.mL^{-1}$ de composto vegetal (citral, mentol ou limoneno), cipermetrina e clorpirifós, respectivamente. As CL_{50} e CL_{90} da Form. 1 (0,0033 e 0,0072 $mg.mL^{-1}$) e da Form. 5 (0,0023 e 0,0054 $mg.mL^{-1}$), por exemplo, demonstraram que é possível reduzir a concentração dos princípios ativos e ainda assim obter mortalidade das larvas.

Além dos carrapaticidas cipermetrina e clorpirifós, comprovadamente eficazes sobre *R. microplus* e disponíveis em maior proporção, a eficácia das formulações pode estar relacionada às associações com os nanocarreadores, uma vez que, de acordo com Oliveira et al. (2015), esses nanomateriais podem proporcionar maior eficiência e permitir a redução da quantidade necessária de princípios ativos para se obter eficácia. Deve-se atentar, ainda, ao fato de que compostos de óleos essenciais, mesmo em baixas concentrações, podem contribuir para um efeito repelente (Nerio et al., 2010) e sobretudo agir sinergicamente ou aumentar o efeito da ação repelente de um óleo essencial (Da Silva Lima et al., 2016).

O potencial dos compostos vegetais citral, mentol e limoneno foi previamente demonstrado. O efeito acaricida do citral, por exemplo, já foi demonstrado sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* por meio do óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus* Stapf (90,6% de citral = geranial 51,7% e neral 38,9%), cuja eficácia foi de 100% até a concentração de 5% do óleo essencial (Agnolin et al., 2014). Da mesma forma, eficácia sobre fêmeas ingurgitadas e larvas foi observada para citral comercial

e os quimiotipos citrais do óleo essencial de *Lippia alba*: genótipos LA-10 (33,50% de neral e 46,25% de geraniol) e LA-44 (31,13% de neral e 44,17% de geranial), que determinaram CL_{50} de: 7,0, 8,8 e 10,9 $mg.mL^{-1}$, respectivamente (Peixoto et al., 2015). O óleo essencial de *Zingiber officinale* (23,2% de geranial e 16,7% de neral) que obteve eficácia de 100% sobre as larvas determinou as CL_{50} e CL_{90} de: 7,74 e 13,62 $mg.mL^{-1}$, respectivamente (Chagas et al., 2016). No presente estudo, a formulação 1 e 4 (que continham citral em sua composição) ocasionaram 100% de eficácia sobre as larvas até a concentração de 0,014 e 0,007 $mg.mL^{-1}$, apresentando CL_{50} e CL_{90} de: 0,0033 e 0,0072 $mg.mL^{-1}$, respectivamente para a formulação 1 e não sendo possível determinar CL para a formulação 4, demonstrando que a associação "NLS+cip+clo+citral" foi eficaz sobre as larvas de *R. microplus*, mesmo em concentrações baixas.

Chagas et al. (2016) verificaram que os óleos essenciais de *Mentha arvensis* (86,7% de mentol) e *Mentha piperita* (30,5% de mentol) obtiveram eficácia de 86% e 89%, respectivamente, alcançando as CL_{50} e CL_{90} de 14,46 e 16,96 e de 14,81 e 24,99 $mg.mL^{-1}$, respectivamente. No presente estudo, as formulações 2 e 5 (que continham mentol em sua composição) resultaram em 100% de mortalidade de larvas até as concentrações de 0,029 e 0,014 $mg.mL^{-1}$, respectivamente, e obtiveram CL_{50} e CL_{90} de: 0,0054 e 0,0092; 0,0023 e 0,0054 $mg.mL^{-1}$, respectivamente, demonstrando que as associações "NLS+cip+clo+mentol" e "CLN+cip+clo+mentol" possibilitaram altas taxas de mortalidade de larvas de *R. microplus*, mesmo diante de baixas concentrações de princípios ativos.

Nos estudos de Peixoto et al. (2015) o desempenho do limoneno foi avaliado sobre fêmeas ingurgitadas e larvas, determinando-se CL_{50} de: 31,2 e 54,5 $mg.mL^{-1}$, respectivamente, para R-(+)-limoneno e S-(-)-limoneno (comerciais) e CL_{50} de: 16,8 e 27,0 $mg.mL^{-1}$ para os quimiotipos de carvonas (sintetizados a partir do limoneno) do óleo essencial de *L. alba*: LA-13 (26,95% de limoneno e 52,94% de carvona) e LA-57 (25,86% de limoneno e 63,47% de carvona). Chagas et al. (2016), que também avaliaram o óleo essencial de *L. alba* (61,7 de carvona e 17,5% de limoneno), o qual obteve 100% de eficácia sobre as larvas e determinou as CL_{50} e CL_{90} de: 5,84 e 11,14 $mg.mL^{-1}$. No presente estudo, as formulações 3 e 6, contendo limoneno, resultaram em 100 % de mortalidade a partir da concentração 0,029 $mg.mL^{-1}$ e alcançaram CL_{50}

e CL_{90} de: 0,0040 e 0,0081; 0,0055 e 0,0094 $mg.mL^{-1}$, respectivamente, demonstrando que ambas as associações “NLS+cip+clo+limoneno” e “CLN+cip+clo+limoneno” foram eficazes sobre larvas de *R. microplus*, mesmo diante de baixas concentrações de princípios ativos.

Pelos resultados, é possível que a partir da utilização de nanocarreadores os princípios ativos tenham diminuído, significativamente, a concentração letal das formulações, sugerindo a possibilidade de redução da quantidade de princípios ativos em formulações carrapaticidas associadas à nanocarreadores. Mais estudos são necessários, porém, nanoformulações com menores concentrações de princípios ativos tendem a reduzir o período residual e o impacto ambiental. E como nanocarreadores podem permitir a redução da quantidade necessária de princípios ativos para se obter eficácia (Oliveira et al., 2015), acredita-se na possibilidade de redução do período de carência em casos de associações desses carreadores com carrapaticidas.

Conclusões

O presente estudo evidenciou que foi possível encapsular os princípios ativos em NLS e CLN, e que todas as formulações se demonstraram estáveis, com poucas variações significativas no período de estocagem. Evidenciou também que ambos os carreadores foram eficazes em todas as associações sobre as larvas de *R. microplus*, causando 100% de mortalidade em menores concentrações. Tais resultados abrem perspectivas para o uso destes sistemas carreadores em controle de ectoparasitas, pois os resultados aqui apresentados demonstram que nanocarreadores podem ser utilizados para potencializar formulações antiparasitárias. Porém, cabe destacar que um estudo do mecanismo de ação, bem como toxicidade destes precisam ser realizados a fim de que se tenha uma melhor compreensão da segurança destes sistemas. Espera-se que os resultados aqui encontrados possam contribuir para estudos envolvendo parasitas, e ser mais um incentivo a aplicação de nanocarreadores no desenvolvimento de novos carrapaticidas, a fim de promover um controle mais eficaz e seguro sobretudo por meio da diminuição do risco da presença de resíduos químicos nos produtos de origem animal e ambiente.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Processo: 2017/13249-8 e 2017/21004-5), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Processos: 169777/2017-0 e 169777/2017-0), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (Processo: 88882.434504/2019-01), à Ipanema Ltda., à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP (Campus Jaboticabal e Sorocaba), e à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Pecuária Sudeste (Processo n°: 20.18.03.017.00-02).

Referências

Abbas RZ, Zaman MA, Colwell DD, Gilleard J, Iqbal Z (2014) Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: the state of play. **Veterinary Parasitology** 203:6-20.

Agnolin CA, Olivo CJ, Parra CLC (2014) Efeito do óleo de capim limão (*Cymbopogon flexuosus* Stapf) no controle do carrapato dos bovinos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais** 16:77-82.

Anderson W, Kozak D, Coleman VA, Jämting ÅK, Trau M (2013) A comparative study of submicron particle sizing platforms: Accuracy, precision and resolution analysis of polydisperse particle size distributions. **Journal of Colloid and Interface Science** 405:322-330.

Barbosa PFP, Mendonça PP, Andrade RDA, Aguiar ACR, Chaves AR, Silva FG (2016) Efficacy of chitosan supported organic acaricide extract from *Melia azedarach* leaves on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks. **African Journal of Biotechnology** 15:1391-1400.

Benelli G, Pavela R, Maggi F, Petrelli R, Nicoletti M (2017) Commentary: making green pesticides greener? The potential of plant products for nanosynthesis and pest control. **Journal of Cluster Science** 28:3-10.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução nº 899**, Brasília, 2003.

Chagas ACS, Domingues LF, Fantatto RR, Giglioti R, Oliveira MCS, Oliveira DH, Mano RA, Jacob RG (2014) *In vitro* and *in vivo* acaricide action of juvenoid analogs produced from the chemical modification of *Cymbopogon* spp. and *Corymbia citriodora* essential oil on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology** 205:277-284.

Chagas ACS (2015) Medicinal plant extracts and nematode control. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources** 10:1-8.

Chagas ACS, Oliveira MCS, Giglioti R, Santana RCM, Bizzo HR, Gama PE, Chaves FCM (2016) Efficacy of 11 Brazilian essential oils on lethality of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Ticks and Tick-borne Diseases** 7:427-432.

Cola DF, Pasquoto T, Guilger M, Lima R, Silva CMG, Fraceto LF (2016) Sistemas carreadores lipídicos nanoestruturados para ivermectina e metopreno visando controle de parasitas. **Química Nova** 39:1034-1043.

Corrêa JCR, Salgado HRN (2011) Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais** 13:500-506.

Curtis CF, Mnzava EP (2000) Comparison of house spraying and insecticide-treated nets for malaria control. **Bulletin of the World Health Organization** 78:1389-1400.

Da Silva Lima A, Carvalho JF, Peixoto MG, Blank AF, Borges LMF, Costa Junior LM (2016) Assessment of the repellent effect of *Lippia alba* essential oil and major monoterpenes on the cattle tick *Rhipicephalus microplus.* **Medical and Veterinary Entomology** 30:73-77.

De La Fuente J, Estrada-Pena A, Venzal JM, Kocan KM, Sonenshine DE (2008) Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. **Frontiers in Bioscience** 13:6938-6946.

Domingues LN, Brasil BSAF, Bello ACPP, Cunha AP, Barros ATM, Leite RC, Silaghi C, Pfister K, Passos LMF (2012) Survey of pyrethroid and organophosphate resistance in brazilian field populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: detection of C190A mutation in domain II of the *para*-type sodium channel gene. **Veterinary Parasitology** 189:327-332.

Durán N, Marcato PD (2013) Nanobiotechnology perspectives. Role of nanotechnology in the food industry: a review. **International Journal of Food Science & Technology** 48:1127-1134.

Fagnani R, Battaglini APP, Tamanini R, Seixas FN, Beloti V (2011) Análise de risco de praguicidas em leite cru e caracterização do uso em propriedades leiteiras. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes** 383:20-26.

FAO (1971) Recommended method for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides: tentative methods for larvae of cattle tick *Boophilus* spp. **Plant Protection Bulletin** 19:15-18.

Fricker G, Kromp T, Wendel A, Blume A, Zirkel J, Rebmann H, Setzer C, Quinkert RO, Martin F, Müller-Goymann C (2010) Phospholipids and lipid-based formulations in oral drug delivery. **Pharmaceutical Research** 27:1469-1486.

Gamisans F, Lacoulonche F, Chauvet A, Espina M, Garcia ML, Egea MA (1999) Flurbiprofen-loaded nanospheres: analysis of the matrix structure by thermal methods. **International Journal of Pharmaceutics** 179:37-48.

Ghormade V, Deshpande MV, Paknikar KM (2011) Perspectives for nano-biotechnology enabled protection and nutrition of plants. **Biotechnology Advances** 29:792-803.

Gogos A, Knauer K, Bucheli TD (2012) Nanomaterials in plant protection and fertilization: current state, foreseen applications, and research priorities. Journal of **Agricultural and Food Chemistry** 60:9781-9792.

Gomes A, Koller WW, Barros ATM (2011) Suscetibilidade de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a carrapaticidas em Mato Grosso do Sul, Brasil. **Ciência Rural** 41:1447-1452.

Govender T, Stolnik S, Garnett MC, Illum L, Davis SS (1999) PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. **Journal of Controlled Release** 57:171-185.

Graf JF, Gogolewski R, Leach BN (2004) Tick control: an industry point of view. **Parasitology** 129:S427-S442.

Grisi L, Leite RC, Martins JRS, Barros ATM, Andreotti R, Cançado PHD, Perez de León AA, Pereira JB, Villela HS (2014) Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 23:150-156.

Higa LOS, Garcia MV, Barros JC, Koller WW, Andreotti R (2016) Evaluation of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) resistance to different acaricide formulations using samples from Brazilian properties. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 25:163-171.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **Orientação sobre validação de métodos analíticos** - DOC CGRE-008, Brasília, 2011. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf>.

Kah M, Beulke S, Tiede K, Hofmann T (2013) Nanopesticides: state of knowledge, environmental fate, and exposure modeling. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology** 43:1823-1867.

Kah M, Hofmann T (2014) Nanopesticide research: Current trends and future priorities. **Environment International** 63:224-235.

Kilic AC, Capan Y, Vural I, Gursoy RN, Dalkara T, Cuine A, Hincal AA (2005) Preparation and characterization of PLGA nanospheres for the targeted delivery of NR2B-specific antisense oligonucleotides to the NMDA receptors in the brain. **Journal of Microencapsulation** 22:633-641.

Klafke G, Webster A, Agnol BD, Pradel E, Silva J, de La Canal LH, Becker M, Osório MF, Mansson M, Barreto R, Scheffer R, Souza UA, Corassini VB, Santos J, Reck J, Martins JR (2017) Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases** 8:73-80.

Kumar R (2019) Molecular markers and their application in the monitoring of acaricide resistance in *Rhipicephalus microplus.* **Experimental and Applied Acarology** 78:149-172.

Labruna MB, Naranjo V, Mangold AJ, Thompson C, Estrada-Peña A, Guglielmone AA, Jongejan F, de la Fuente J (2009) Allopatric speciation in ticks: genetic and reproductive divergence between geographic strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus.* **BMC Evolutionary Biology** 9:2-12.

Machado FA, Pivoto FL, Ferreira MST, Gregorio FV, Vogel FSF, Sangioni LA (2014) *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in the western-central region of Rio Grande do Sul, Brazil: multiresistant tick. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 23:337-342.

Marcato PD (2009) Preparation, characterization and application in drugs and cosmetics of solid lipid nanoparticles. **Revista Eletrônica de Farmácia** 6:1-37.

Marin E, Briceno MI, Caballero-George C (2013) Critical evaluation of biodegradable polymers used in nanodrugs. **International Journal of Nanomedicine** 8:3071-3091.

Marín RRR, Babick F, Hillemann L (2017) Zeta potential measurements for non-spherical colloidal particles – Practical issues of characterisation of interfacial properties of nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects** 532:516-521.

Martins JR, Evans DE, Cereser VH, Corrêa BL (2002) Partial strategic tick control within a herd of European breed cattle in the state of Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Experimental and Applied Acarology** 27:241-251.

Mendes MC, Duarte FC, Martins JR, Klafke GM, Fiorini LC, Barros ATM (2013) Characterization of the pyrethroid resistance profile of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* populations from the states of Rio Grande do Sul and Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 22:379-384.

Mohanraj VJ, Chen Y (2006) Nanoparticles–a review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research** 5:561-573.

Mosqueira VCF, Legrand P, Pinto-Alphandary H, Puisieux F, Barrat GJ (2000) Poly (D,L-Lactide) Nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences** 89:614-626.

Nerio LS, Olivero-Verbel J, Stashenko E (2010) Repellent activity of essential oils: a review. **Bioresource Technology** 101:372-378.

Oliveira JL, Campos EVR, Bakshic M, Abhilash PC, Fraceto LF (2014) Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: prospects and promises. **Biotechnology Advances** 32:1550-1561.

Oliveira JL, Campos EVR, Silva CMG, Pasquoto T, Lima R, Fraceto LF (2015) Solid lipid nanoparticles co-loaded with simazine and atrazine: preparation, characterization, and evaluation of herbicidal activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 63:422-432.

Peixoto MG, Costa-Júnior LM, Blank AF, Lima AS, Menezes TSA, Santos DA, Alves PB, Cavalcanti, SCH, Bacci L, Arrigoni-Blank MF (2015) Acaricidal activity of essential oils from *Lippia alba* genotypes and its major components carvone, limonene, and citral against *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology** 210:118-122.

Perlatti B, Bergo PLS, Silva MFGF, Fernandes JB, Forim MR (2013) **Polymeric nanoparticle-based insecticides: a controlled release purpose for agrochemicals**. In: Trdan, S., ed. Insectic - Dev Safer More Eff Technol. InTech. 20:523-550. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/insecticides-development-of-safer-and-more-effective-technologies/polymeric-nanoparticle-based-insecticides-a-controlled-release-purpose-for-agrochemicals>.

Rai S, Paliwal R, Gupta PN, Khatri K, Goyal AK, Vaidya B, Vyas SP (2008) Solid Lipid Nanoparticles (SLNs) as a Rising Tool in Drug Delivery Science: One Step Up in Nanotechnology. **Current Nanoscience** 4:30-44.

Rai M, Ingle A (2012) Role of nanotechnology in agriculture with special reference to management of insect pests. **Applied Microbiology and Biotechnology** 94:287-293.

Reginato CZ, Cadore GC, Menezes FR, Sangioni LA, Vogel FSF (2017) Efficacy of commercial synthetic pyrethroids and organophosphates associations used to control *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 26:500-504.

Rodrigues VS, Bonatte JrP, Garcia MV, Higa LOS, Piña FTB, Zimmermannd NP, Duarte PO, Barros JC, Andreotti R (2018) Efficacy profile of cypermethrin and chlorpyrifos based acaricides on *Rhipicephalus microplus* control on cattle in the rearing phase, naturally infested and exposed to tick fever agents in central Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports** 12:43-48.

Rodriguez-Vivas RI, Jonsson NN, Bhushan C (2018) Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. **Parasitology Research** 117:3-29.

Santos DS, Boito JP, Santos RCV, Quatrin PM, Ourique AF, Reis JH, Gebert RR, Glombowsky P, Klauck V, Boligon AA, Baldissera MD, Silva AS (2017) Nanostructured cinnamon oil has the potential to control *Rhipicephalus microplus* ticks on cattle. **Experimental and Applied Acarology** 73:129-138.

Schaffazick SR, Guterres S, Freitas LL, Pohlmann AR (2003) Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova** 26:726-737.

Ueno TEH, Mendes EEB, Pomaro SHK, Lima CKP, Guilloux AGA, Mendes MC (2012) Sensitivity profile of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks of dairy cattle to acaricides in small farms in the northwestern São Paulo State, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico** 79:177-183.

Underwood C, van Eps AW (2012) Nanomedicine and veterinary science: The reality and the practicality. **The Veterinary Journal** 193:12-23.

Vargas MS, Céspedes NS, Sánchez HF, Martins JR, Céspedes COC (2003) *In vitro* evaluation of a field strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) resistant to Amitraz. **Ciência Rural** 33:737-742.

Venkatraman SS, Jie P, Min F, Freddy BYC, Leong-Huat G (2005) Micelle-like nanoparticles of PLA–PEG–PLA triblock copolymer as chemotherapeutic carrier. **International Journal of Pharmaceutics** 298:219-232.

Vitorino C, Carvalho FA, Almeida AJ, Sousa JJ, Pais AACC (2011) The size of solid lipid nanoparticles: an interpretation from experimental design. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 84:117-130.

Wang Y, Zhang H, Hao J, Li B, Li M, Xiuwen W (2016) Lung cancer combination therapy: co-delivery of paclitaxel and doxorubicin by nanostructured lipid carriers for synergistic effect. **Drug Delivery** 23:1398-1403.

Wang Y, Kannan K (2018) Concentrations and dietary exposure to organophosphate esters in foodstuffs from Albany, New York, United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 26:13525-13532.

Xu R (2007) Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. **Particuology** 6:112-115.

Yamamoto I (1970) **Biochemical Toxicology of Insecticides - Problems in Mode of action of Pyrethroids**. London, UK: Academic Press Inc, 218p.

You P, Yuan R, Chen C (2017) Design and evaluation of lidocaine- and prilocaine-coloaded nanoparticulate drug delivery systems for topical anesthetic analgesic therapy: a comparison between solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers. **Drug Design, Development and Therapy** 11:2743-2752.

CAPÍTULO 3 - Nanopartículas de zeína em formulações carrapaticidas para controle de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*

Resumo

Nanocarreadores como a zeína podem contribuir para maior estabilidade e proteção de moléculas vegetais com potencial carrapaticida e colaborar com a redução de toxicidade dos princípios ativos nos organismos não alvo. Assim, esse estudo teve como objetivo desenvolver formulações a partir da associação de cipermetrina (cip) + clorpirifós (clo), um composto vegetal (citral, mentol ou limoneno) e Nanopartículas de Zeína (NZ), caracterizá-las e verificar sua eficácia sobre *Rhipicephalus microplus,* parasita que causa grandes impactos econômicos na pecuária mundial. Três formulações foram desenvolvidas e caracterizadas por Dynamic Light Scattering (DLS) e Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). As formulações de zeína NZ-1 (NZ+cip+clo+citral), NZ-2 (NZ+cip+clo+mentol) e NZ-3 (NZ+cip+clo+limoneno) obtiveram médias de diâmetro de 282,18 a 290,64 nm; polidispersão de 0,24 a 0,25; potencial zeta de -3,35 a -6,10 mV, concentração de 2,73 ± 2,67 x 10^{13} a 3,20 ± 3,03 x 10^{13} partículas/mL; e Eficiência de Encapsulação (EE) > 96% para todos os princípios ativos. Todas as formulações foram avaliadas quanto ao seu potencial acaricida e comparadas com controles positivo (Colosso®) e negativos (água destilada; e nanopartículas de zeína sem princípio ativo). Pelo Teste de Pacote de Larvas (TPL), os controles negativos não ocasionaram mortalidade das larvas, entretanto, o controle positivo (avaliado de 0,004 a 0,512 mg.mL^{-1}) resultou em mortalidade de larvas > 71,9% na concentração de 0,064 mg.mL^{-1}, enquanto as formulações de zeína (avaliadas de 0,004 a 0,466 mg.mL^{-1}) ocasionaram mortalidade > 80 % na concentração de 0,029 mg.mL^{-1}. As formulações NZ-1, NZ-2 e NZ-3 ainda ocasionaram altas taxas de mortalidade de larvas em menores concentrações, determinando concentrações letais CL_{50} e CL_{90} de: 0,0136 e 0,0352, 0,0115 e 0,0386, 0,0117 e 0,0301 mg.mL^{-1}, respectivamente, e 0,0319 e 0,1028 mg.mL^{-1}, respectivamente, para o controle positivo). Pelo Teste de Imersão de Adultos (TIA), NZ-1, NZ-2 e NZ-3 obtiveram, respectivamente: 50,2, 40,5 e 60,1% de eficácia sobre fêmeas ingurgitadas na concentração de 0,466 mg.mL^{-1}, enquanto o controle positivo resultou em 39,4% de eficácia a 0,512 mg.mL^{-1}. Essas nanoformulações também

apresentaram uma alta atividade residual, embora menor do que a observada para o controle positivo. Esse estudo demonstrou que foi possível encapsular os princípios ativos priorizados e que as formulações de zeína apresentaram estabilidade durante a estocagem. As NZ foram capazes de proteger os princípios ativos contra a degradação em solução, demonstrando estabilidade. Dessa forma, NZ podem ser uma alternativa para o desenvolvimento de novos biocarrapaticidas empregando-se menor concentração de princípios ativos, para diminuir o risco de presença de resíduos nos alimentos de origem animal e no ambiente, promovendo um controle parasitário mais seguro.

Palavras-chave: carrapato bovino, resistência, resíduos carrapaticidas, controle alternativo, nanocarreador.

1. Introdução

O parasitismo pelo carrapato *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae) causa elevada perda econômica, incluindo quedas na produção, danos no couro e transmissão de hemoparasitas que ocasionam altos índices de mortalidade nos rebanhos (De La Fuente et al., 2008; Grisi et al., 2014; Andreotti et al., 2016; Calvano et al., 2019). Acaricidas sintéticos estão entre os métodos de controle mais utilizados atualmente, porém, além da resistência adquirida pelos carrapatos (Klafke et al., 2017; Rodriguez-Vivas et al., 2018; Vilela et al., 2020), o uso indiscriminado desses produtos pode ameaçar a saúde humana e ambiental (Graf et al., 2004; Fagnani et al., 2011; Wang e Kannan, 2018).

A busca por controles alternativos tem sido estimulada. Muitas espécies de plantas possuem potencial biopesticida e seus compostos podem substituir e/ou integrar pesticidas sintéticos, de maneira a colaborar para a redução de resíduos em alimentos e degradação ambiental, aumentar a vida útil e reduzir custos desses produtos. Além disso, possuem baixa toxicidade em organismos não-alvo e podem contribuir para a diminuição da resistência parasitária devido aos múltiplos mecanismos de ação sobre os parasitas (Corrêa e Salgado, 2011; Chagas, 2015; Pavela e Benelli, 2016). No entanto, existem limitações na aplicação desses subprodutos, devido à sua alta volatilidade, altas taxas de degradação no ambiente e baixa estabilidade físico-química (Chagas et al., 2014).

Nesse sentido, a nanotecnologia tende a contribuir para o aperfeiçoamento da estabilidade físico-química de formulações, pois nanocarreadores permitem melhorar a biodisponibilidade, absorção e distribuição tecidual dos princípios ativos, aumentar a solubilidade aquosa aparente, liberá-los de maneira lenta, direcionada e protegê-los contra a degradação prematura (Fricker et al., 2010; Kah e Hofmann, 2014). A zeína é o principal componente da proteína do milho e tem sido um material importante na ciência e na indústria (Shukla e Cheryan, 2001; Sozer e Kokini, 2009).

A zeína tem sido alvo de estudos e detém um potencial promissor para atuar como nanocarreador principalmente devido à sua resistência (Pascoli et al., 2020). Dessa forma, o presente estudo teve por objetivo desenvolver formulações a partir de Nanopartículas de Zeína (NZ) associadas à cipermetrina + clorpirifós + um composto vegetal (citral, mentol ou limoneno), caracterizá-las e verificar a eficácia sobre larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus.*

2. Material e Métodos

2.1 Local e condições experimentais

As formulações foram desenvolvidas e caracterizadas no Laboratório de Nanotecnologia Ambiental da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Sorocaba-SP. Fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram coletadas de bovinos (livres de tratamento acaricida por no mínimo 90 dias) pertencentes à Embrapa Pecuária Sudeste – CPPSE, São Carlos-SP. As larvas foram obtidas a partir de incubação, postura e eclosão. Os testes *in vitro* foram realizados no Laboratório de Parasitologia Veterinária dessa mesma Unidade de Pesquisa.

Todos os protocolos foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Embrapa (CEUA-CPPSE nº. 01/2019).

2.2 Reagentes

Cipermetrina, clorpirifós, citral (Ref: C83007/Código: 5392405), mentol (Ref: W266523/Código: 1002126617), limoneno (Ref: 183164/Código: 1001647352), zeína e tensoativos foram adquiridas da empresa Sigma-Aldrich. Também foram utilizados:

Pluronic F-68 – Sigma®, Álcool etílico - Merck®, Metanol – JT Baker®, clorofórmio (analítico) - Merck®, acetonitrila (grau HPLC) – JT Baker®, membranas filtrantes de celulose 30 kDa- Millipore®.

2.3 Preparo das Nanopartículas de Zeína (NZ)

Para o preparo das nanopartículas de zeína, foi utilizado o método de precipitação com anti-solvente, descrito por Hu e McClements (2015). Inicialmente a zeína (2%) foi dissolvida em solução hidroetanólica (85% v:v) e mantida sob agitação *overnight*. A solução foi então filtrada (filtros de seringa 0,45 µm) a fim de remover partículas insolúveis. Em seguida, foram adicionados 56,25 mg de cipermetrina, 93,75 mg clorpirifós e 3,75 mg do composto vegetal (mentol, citral ou limoneno) à solução de zeína. Separadamente, foi preparada uma solução aquosa de pluronic F68 (2% m/v) e o pH foi ajustado para 4.0. Com o auxílio de uma seringa, 10 mL da solução de zeína foi injetada rapidamente em 30 mL da solução de pluronic sob agitação. O solvente foi removido à temperatura ambiente. Após a evaporação, o volume perdido foi compensado pela adição de água a pH 4.0.

Ao final do preparo, as três diferentes formulações encontravam-se a 5,125 $mg.mL^{-1}$ (0,125, 1,875 e 3,125 $mg.mL^{-1}$ de composto vegetal, cipermetrina e clorpirifós, respectivamente), concentração que foi submetida aos testes de caracterização e estabilidade das nanopartículas de zeína (Tabela 1).

Tabela 1. Composição e concentração dos princípios ativos nas formulações de Nanopartículas de Zeína (NZ) ao final do preparo (para caracterização e avaliação de estabilidade), em comparação com o produto comercial.

Formulações de zeína ao final do preparo (5,125 $mg.mL^{-1}$)				
Formulações	**cipermetrina**	**clorpirifós**	**composto vegetal**	
NZ-1 - NZ	1,875 $mg.mL^{-1}$	3,125 $mg.mL^{-1}$	**citral**	0,125 $mg.mL^{-1}$
NZ-2 - NZ	1,875 $mg.mL^{-1}$	3,125 $mg.mL^{-1}$	**mentol**	0,125 $mg.mL^{-1}$
NZ-3 - NZ	1,875 $mg.mL^{-1}$	3,125 $mg.mL^{-1}$	**limoneno**	0,125 $mg.mL^{-1}$
Produto comercial (410 $mg.mL^{-1}$)				
	cipermetrina	**clorpirifós**	**citronelal**	
Colosso®	150 $mg.mL^{-1}$	250 $mg.mL^{-1}$	10 $mg.mL^{-1}$	

2.4 Quantificação dos princípios ativos e Determinação da Eficiência de encapsulação

Os princípios ativos foram quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), empregando-se um CLAE-Varian com Sistema controlador, isocrático, detector UV-VIS, injetor automático. Para cada princípio ativo utilizou-se coluna cromatográfica, fase móvel e parâmetros específicos, conforme descrito na Tabela 2, a seguir:

Tabela 2. Condições analíticas utilizadas para quantificação dos princípios ativos por meio da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Amostra	Cipermetrina	Clorpirifós	Citral	Mentol	Limoneno
Fase Móvel	Acetonitrila/Água (85:15) (v:v)	Metanol/Água (82:18) (v:v)	Acetonitrila/Água (70:30) (v:v)	Metanol/Água (70:30) (v:v)	Metanol/Água (85:15) (v:v)
Volume de Injeção	100 µL	100 µL	100 µL	20 µL	20 µL
Fluxo	1,0 mL/min	1,0 mL/min	1,0 mL/min	1,0 mL/min	1,0 mL/min
Temperatura	Ambiente (25°C)	Ambiente (25°C)	Ambiente (25°C)	Ambiente (25°C)	Ambiente (25°C)
Detector	Ultravioleta (UV), λ= 210 nm	Ultravioleta (UV), λ= 230 nm	Ultravioleta (UV), λ= 233 nm	Ultravioleta (UV), λ= 270 nm	Ultravioleta (UV), λ= 204 nm
Coluna Cromatográfica	Phenomenex® Kinetex C18 2,6µ 100A, 150 x 4,60mm	Phenomenex® Gemini-NX C18 5µ 110A, 150 x 4,60mm	Phenomenex® Gemini-NX C18 5µ 110A, 150 x 4,60mm	Phenomenex® Gemini-NX C18 5µ 110A, 150 x 4,60mm	Phenomenex® Gemini-NX C18 5µ 110A, 150 x 4,60mm

As estimativas dos Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) foram realizadas a partir de dados obtidos com as regressões lineares das curvas analíticas aplicados às equações LD = DP x 3 / IC; e LQ = DP x 10 / IC, em que “DP” corresponde ao desvio padrão do coeficiente linear com o eixo y e “IC” a inclinação da curva analítica média (Brasil, 2003; Inmetro, 2011).

A Determinação da Eficiência de encapsulação dos princípios ativos encapsulados pelas nanopartículas de zeína foi determinada pelo método de ultrafiltração/centrifugação, utilizando-se celulose regenerada de 10 kDa (Microcon – Millipore®), e o ultrafiltrado foi quantificado por CLAE (Gamisans et al., 1999;

Schaffazick et al., 2003; Kilic et al., 2005). Por meio das curvas analíticas obteve-se a eficiência de encapsulamento (EE) usando-se a equação: % EE = A/B x 100, em que “A” corresponde à quantidade do princípio ativo encapsulada nas partículas e “B” ao total inicial de princípio ativo adicionado às formulações.

2.5 Caracterização das nanopartículas

Os dados de médias de diâmetro, polidispersão, potencial zeta, distribuição do tamanho, concentração e pH para análise das formulações foram coletados nos dias: 0, 7°, 15°, 30°, 60°, 90° e 120° de armazenamento. Todos os resultados foram expressos em triplicatas.

2.5.1 Medidas de Diâmetro, Polidispersão e Potencial Zeta por Espectroscopia de correlação de fótons (Dynamic Light Scattering - DLS)

Foram avaliados a partir da diluição de suspensões de partículas em água deionizada (1:1000 v:v) submetidas a um analisador de partículas (*ZetaSizer Nano ZS90*, Malvern®) sob um ângulo fixo de 90º e 25 ºC. A distribuição do diâmetro médio foi obtida pelo índice de polidispersão por Espectroscopia de correlação de fótons *(Dynamic Light Scattering - DLS)* (Govender et al., 1999; Venkatraman et al., 2005).

2.5.2 Medidas de Distribuição de Tamanho e Concentração das partículas por Análise de Rastreamento de Nanopartículas (Nanoparticle Tracking Analysis - NTA)

Suspensões de nanopartículas foram diluídas 1.500 vezes. Para garantir a análise de diferentes partículas, 1 mL de suspensão da amostra foi injetado na célula volumétrica para cada réplica, a fim de deslocar o conteúdo medido anteriormente. Cada repetição constituiu-se de 5 medições de partículas quantificadas em cada análise. Os dados foram coletados por meio de uma célula *NanoSight LM 10* (laser verde, 532 nm) e câmera sCMOS utilizando o NanoSight (v. 3.1). Para evitar a contaminação das amostras, medições da água deionizada foram realizadas. Obteve-se, assim, a distribuição de tamanho das partículas em função da concentração por

Análise de Rastreamento de Nanopartículas *(Nanoparticle Tracking Analysis - NTA)* (Anderson et al., 2013).

2.5.3 Estabilidade lipídica (pH)

O pH foi avaliado empregando-se um pHmetro (Jenway®, modelo 3510) previamente calibrado com soluções tampão (pH 7,0 e 4,0).

2.6 Diluições para os testes *in vitro* sobre *Rhipicephalus microplus*

2.6.1 Nanoformulações de zeína

A partir de cada formulação de zeína (5,125 $mg.mL^{-1}$), a diluição 1:11 (v:v) foi realizada em água destilada, obtendo-se a concentração de 0,4659 $mg.mL^{-1}$ (0,01132, 0,1705 e 0,2841 $mg.mL^{-1}$ de composto vegetal, cipermetrina e clorpirifós, respectivamente) (Tabela 3), e diluições seriadas a partir dessa foram realizadas para a avaliação pelo Teste de Pacote de Larvas (TPL) e pelo Teste de Imersão de Adultos (TIA) sobre *R. microplus*.

2.6.2 Controle positivo

A partir do produto comercial (410 $mg.mL^{-1}$) a diluição 1:801 (v:v) (indicada na bula do Colosso Pulverização®) foi realizada em água destilada, obtendo-se a concentração de 0,5118 $mg.mL^{-1}$ (0,0124, 0,1873 e 0,3121 $mg.mL^{-1}$ de citronelal, cipermetrina e clorpirifós, respectivamente) (Tabela 3). A partir dessa, foram realizadas diluições seriadas para a avaliação pelo TPL e pelo TIA sobre *R. microplus*.

Tabela 3. Composição e concentração dos princípios ativos nas formulações de Nanopartículas de Zeína (NZ) após a diluição para os testes sobre *Rhipicephalus microplus*, em comparação com o produto comercial.

Formulações de zeína após a diluição 1:11 (v:v) (0,466 mg.mL^{-1})				
Formulações	**cipermetrina**	**clorpirifós**	**composto vegetal**	
NZ-1 - NZ	0,170 mg.mL^{-1}	0,284 mg.mL^{-1}	**citral**	0,011 mg.mL^{-1}
NZ-2 - NZ	0,170 mg.mL^{-1}	0,284 mg.mL^{-1}	**mentol**	0,011 mg.mL^{-1}
NZ-3 - NZ	0,170 mg.mL^{-1}	0,284 mg.mL^{-1}	**limoneno**	0,011 mg.mL^{-1}
Produto comercial após diluição 1:801 (v:v) (0,512 mg.mL^{-1})				
	cipermetrina	**clorpirifós**	**citronelal**	
Colosso®	0,187 mg.mL^{-1}	0,312 mg.mL^{-1}	0,012 mg.mL^{-1}	

2.7 Testes *in vitro* com as nanoformulações sobre *Rhipicephalus microplus*

2.7.1 Teste de Pacote de Larvas (TPL)

Papéis filtro (2 cm × 2 cm – JP41, faixa preta, 12.5 cm de raio, poros de 28 µm) foram impregnados com 1 mL de cada formulação em diferentes concentrações: 0,004, 0,007, 0,014, 0,029, 0,058, 0,116, 0,233 e 0,466 mg.mL^{-1}. Posteriormente, 100 larvas foram depositadas em um desses papéis, cobertas com outro e em seguida foram depositados em um papel filtro maior (7,5 x 8,5 cm) que foi dobrado, vedado com clipes e mantido em incubadora (±27°C; UR > 80%) por 24 horas (FAO, 1971). As contagens do número de larvas vivas e mortas foram realizadas, com o auxílio de bomba de vácuo com ponteira descartável com filtro (1000 µL) acoplada à mangueira. Os experimentos foram realizados em triplicatas para cada concentração. Avaliou-se, ainda, NZ (sem princípios ativos), controle negativo composto por água destilada e o controle positivo Colosso Pulverização® na concentração de 0,004, 0,008, 0,016, 0,032, 0,064, 0,128, 0,256 e 0,512 mg.mL^{-1}.

2.7.2 Atividade residual verificada por TPL

Os mesmos procedimentos do item anterior foram realizados para a maior concentração das formulações (0,466 mg.mL^{-1}) e do Colosso Pulverização® (0,512

mg.mL^{-1}), em triplicata. Após a quantificação de larvas vivas e mortas em 24 horas, os papéis filtro (2 cm × 2 cm) foram reutilizados: receberam 1 mL de água destilada e ±100 larvas novas, e tiveram nova leitura realizada em 24h. O mesmo procedimento foi realizado em 3, 7, 14, 42 e 49 dias.

2.7.3 Teste de Imersão de Adultos (TIA)

Fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram coletadas de bovinos infestados artificalmente, higienizadas com água corrente, secas com papel absorvente e selecionadas pela integridade morfológica e ausência de tegumento no aparelho bucal. Em seguida, foram distribuídas em grupos homogêneos (n = 10) que foram pesados em balança analítica (precisão de 0,001 g) e submetidas à imersão nas formulações por 5 minutos nas concentrações de 0,466 e 0,233 mg.mL^{-1}, em triplicata. Da mesma forma, avaliou-se NZ (sem princípios ativos), controle negativo composto por água destilada e controle positivo Colosso Pulverização® na concentração de 0,512 mg.mL^{-1}. Após imersão, o excesso do produto foi retirado com papel absorvente e os grupos foram acondicionado em placas de Petri individuais e mantidos em incubadora (27°C; UR > 80%) por 15 dias para ovipostura (Drummond et al., 1973). Após esse período, os ovos foram pesados e colocados em seringas adaptadas, vedadas com algodão hidrófilo e novamente incubados por mais 15 dias. Posteriormente, a porcentagem de eclosão das larvas foi realizada pela quantificação por amostragem (Figueiredo et al., 2018). O índice de oviposição, eclosão estimada, índice de eficiência reprodutiva e eficácia das nanoformulações foram avaliados de acordo com Drummond et al. (1973).

2.8 Análises estatísticas

Os resultados das medidas de caracterização, estabilidade e pH das formulações, assim como os TPLs para verificação da atividade residual foram submetidos a análises estatísticas de variância (ANOVA), com o teste de Tukey-Kramer, utilizando-se o programa GraphPad Prism v.7®. Os resultados do TPL e TIA foram submetidos ao ANOVA-One-Way e comparação múltipla pelo teste de Tukey. A determinação das concentrações letais (CL) das formulações foi realizada por meio

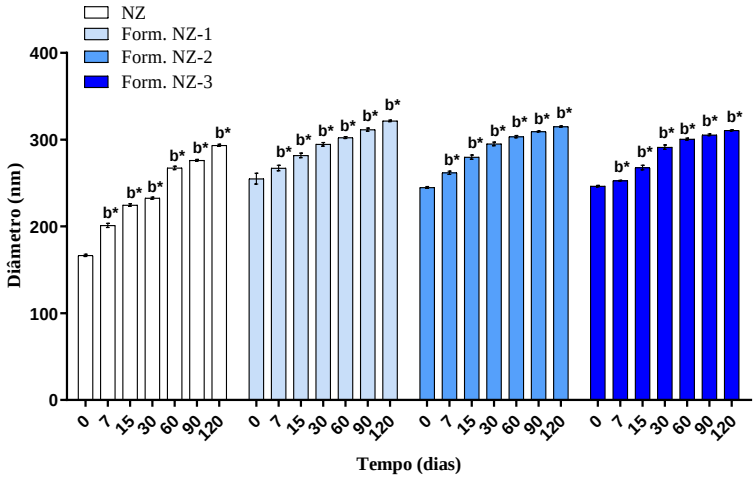
da regressão linear Probit, utilizando a distribuição normal, e o modelo linear generalizado foi utilizado para dados binários (regressão logística), com estimativas dos parâmetros dessas equações por máxima verossimilhança. CL_{50} e CL_{90} foram estimadas. Os dados foram analisados pelo pacote estatístico do SAS® (2002/2010).

3. Resultados

3.1 Caracterização e estabilidade das formulações de nanopartículas de zeína

Os resultados obtidos por meio das regressões lineares das curvas de calibração para cipermetrina, clorpirifós, citral, mentol e limoneno, apresentaram LD de: 1,05, 0,37, 12,58, 12,94 e 2,59 $\mu g.mL^{-1}$ e LQ de: 3,49, 1,23, 41,95, 43,14 e 9,64 $\mu g.mL^{-1}$, respectivamente. As curvas analíticas para cada formulação obtiveram coeficiente de correlação superiores a (r) 0,99. As médias de porcentagem da Eficiência de Encapsulação de todos os princípios ativos, durante o período de estudo, foram de: 96,48 ± 0,20%, 96,77 ± 0,21%, 97,44 ± 0,49%, 97,33 ± 0,48% e 97,34 ± 0,50%, para cipermetrina, clorpirifós, citral, mentol e limoneno, respectivamente.

Na Figura 1 estão as médias de diâmetro obtidos para as nanopartículas de cada formulação.

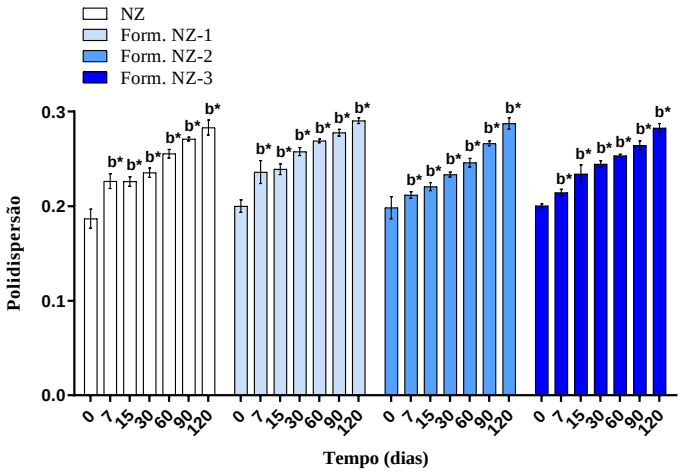


a* representa variações não significativas entre NZ ou mesma formulação, em função do tempo, em comparação com o tempo inicial (0); b* representa variações significativas entre NZ ou mesma formulação, em função do tempo, em comparação com o tempo inicial (0) (Teste de Tukey, p<0,05).

Figura 1. Diâmetro médio das NZ e das formulações NZ-1 (NZ+cip+clo+citral), NZ-2 (NZ+cip+clo+mentol) e NZ-3 (NZ+cip+clo+limoneno) obtido por DLS. NZ = Nanopartículas de zeína; cip = cipermetrina (1,875 $mg.mL^{-1}$); clo = clorpirifós (3,125 $mg.mL^{-1}$); citral, mentol, limoneno (0,125 $mg.mL^{-1}$).

Conforme pode ser observado na Figura 1, no tempo inicial (0), todas as partículas apresentaram diâmetros médios abaixo de 300 nm. A média para NZ foi de: 237,46 nm, enquanto para as formulações NZ-1, NZ-2 e NZ-3 foi de 290,64, 287,12 e 282,18 nm, respectivamente. Variações significativas foram observadas para as formulações a partir do dia 7.

A Figura 2 mostra as médias de polidispersão obtidas a partir de cada formulação.

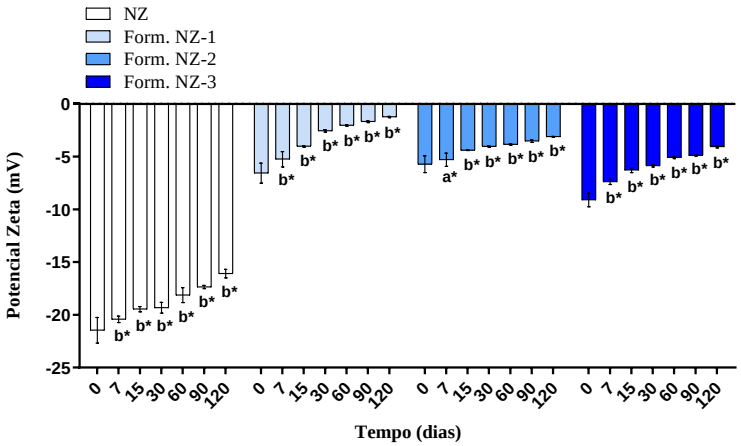


a* representa variações não significativas entre NZ ou mesma formulação, em função do tempo, em comparação com o tempo inicial (0); b* representa variações significativas entre NZ ou mesma formulação, em função do tempo, em comparação com o tempo inicial (0) (Teste de Tukey, p<0,05).

Figura 2. Polidispersão média das NZ e das formulações NZ-1 (NZ+cip+clo+citral), NZ-2 (NZ+cip+clo+mentol) e NZ-3 (NZ+cip+clo+limoneno). NZ = Nanopartículas de zeína; cip = cipermetrina (1,875 mg.mL^{-1}); clo = clorpirifós (3,125 mg.mL^{-1}); citral, mentol, limoneno (0,125 mg.mL^{-1}).

Conforme Figura 2, é possível observar que no tempo inicial (0) as NZ apresentaram polidispersão média abaixo de 0,2 e variaram entre 0,2 e 0,3 durante o período avaliado. A média para NZ foi de: 0,24, enquanto para as formulações NZ-1, NZ-2 e NZ-3 foi de 0,25, 0,24 e 0,24, respectivamente. Variações significativas foram observadas para as formulações a partir do dia 7.

Na Figura 3 encontram-se as médias de potencial zeta obtidas para cada formulação.

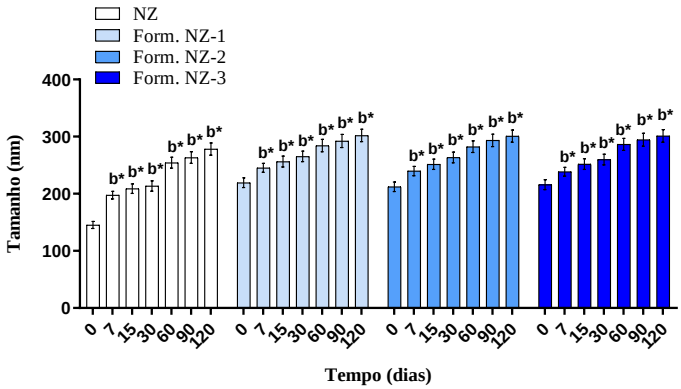


a* representa variações não significativas entre NZ ou mesma formulação, em função do tempo, em comparação com o tempo inicial (0); b* representa variações significativas entre NZ ou mesma formulação, em função do tempo, em comparação com o tempo inicial (0) (Teste de Tukey, p<0,05).

Figura 3. Potencial Zeta médio das NZ e das formulações NZ-1 (NZ+cip+clo+citral), NZ-2 (NZ+cip+clo+mentol) e NZ-3 (NZ+cip+clo+limoneno). NZ = Nanopartículas de zeína; cip = cipermetrina (1,875 mg.mL^{-1}); clo = clorpirifós (3,125 mg.mL^{-1}); citral, mentol, limoneno (0,125 mg.mL^{-1}).

Conforme Figura 3, as médias de potencial zeta das NZ apresentaram aumento no decorrer do tempo, variando entre -16,10 e -21,47 mV para NZ e entre -1 e -9 mV para as formulações. A média para NZ foi de -18,9 mV, enquanto para as formulações NZ-1, NZ-2 e NZ-3 foi de -3,35, -4,28 e -6,10 mV, respectivamente. NZ-1 e NZ-3 apresentaram variações significativas a partir do dia 7, e NZ-2 a partir do dia 15.

A Figura 4 apresenta as médias de distribuição de tamanho das NZ.

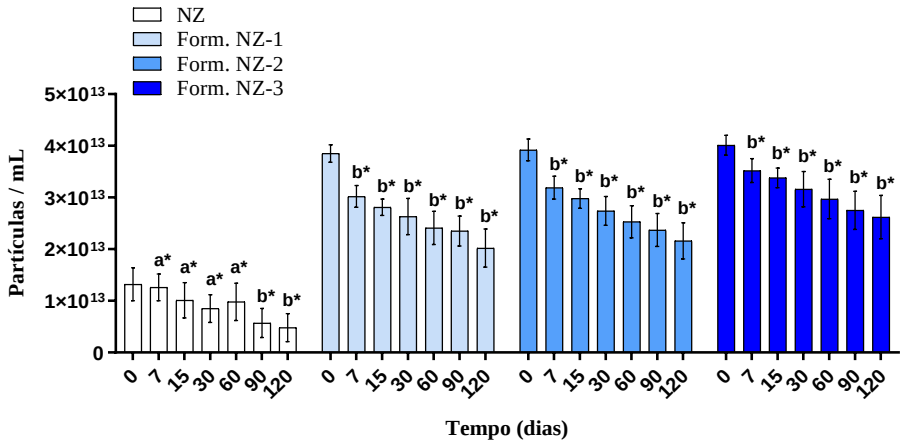


a* representa variações não significativas entre NZ ou mesma formulação, em função do tempo, em comparação com o tempo inicial (0); b* representa variações significativas entre NZ ou mesma formulação, em função do tempo, em comparação com o tempo inicial (0) (Teste de Tukey, p<0,05).

Figura 4. Distribuição de tamanho médio das NZ e das formulações NZ-1 (NZ+cip+clo+citral), NZ-2 (NZ+cip+clo+mentol) e NZ-3 (NZ+cip+clo+limoneno). NZ = Nanopartículas de zeína; cip = cipermetrina (1,875 mg.mL^{-1}); clo = clorpirifós (3,125 mg.mL^{-1}); citral, mentol, limoneno (0,125 mg.mL^{-1}).

Conforme Figura 4, é possível notar que no tempo inicial (0) as médias de distribuição de tamanho das NZ exibiram valores abaixo de 300 nm. As NZ obtiveram a média de 223 nm e as formulações NZ-1, NZ-2 e NZ-3 médias de: 266, 263 e 264 nm, respectivamente. Variações significativas foram observadas para as formulações a partir do dia 7.

A Figura 5 mostra a concentração das NZ durante o período avaliado.

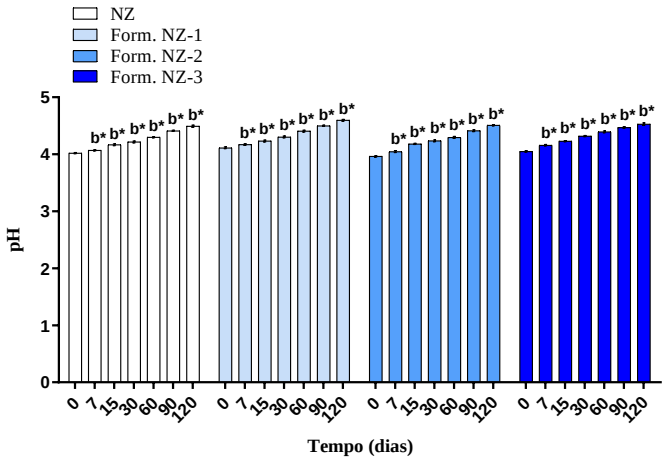


a* representa variações não significativas entre NZ ou mesma formulação, em função do tempo, em comparação com o tempo inicial (0); b* representa variações significativas entre NZ ou mesma formulação, em função do tempo, em comparação com o tempo inicial (0) (Teste de Tukey, p<0,05).

Figura 5. Concentração média das NZ e das formulações NZ-1 (NZ+cip+clo+citral), NZ-2 (NZ+cip+clo+mentol) e NZ-3 (NZ+cip+clo+limoneno). NZ = Nanopartículas de zeína; cip = cipermetrina (1,875 mg.mL^{-1}); clo = clorpirifós (3,125 mg.mL^{-1}); citral, mentol, limoneno (0,125 mg.mL^{-1}).

Conforme Figura 5, a média das NZ foi de 4,63 ± 3,00 x 10^{13} partículas/mL, enquanto para NZ-1, NZ-2 e NZ-3 foi de 2,73 ± 2,67 x 10^{13}, 2,84 ± 2,68 x 10^{13} e 3,20 ± 3,03 x 10^{13} partículas/mL, respectivamente. As formulações NZ-1, NZ-2 e NZ-3 começaram a apresentar variações significativas a partir do dia 7, e em 120 dias apresentaram médias de 2,02 ± 3,70 x 10^{13}, 2,16 ± 3,50 x 10^{13} e 2,62 ± 4,20 x 10^{13} partículas/mL, respectivamente.

A Figura 6 mostra os valores médios de pH obtidos para cada formulação.



a* representa variações não significativas entre NZ ou mesma formulação, em função do tempo, em comparação com o tempo inicial (0); b* representa variações significativas entre NZ ou mesma formulação, em função do tempo, em comparação com o tempo inicial (0) (Teste de Tukey, p<0,05).

Figura 6. Valores médios de pH das NZ e das formulações NZ-1 (NZ+cip+clo+citral), NZ-2 (NZ+cip+clo+mentol) e NZ-3 (NZ+cip+clo+limoneno). NZ = Nanopartículas de zeína; cip = cipermetrina (1,875 mg.mL^{-1}); clo = clorpirifós (3,125 mg.mL^{-1}); citral, mentol, limoneno (0,125 mg.mL^{-1}).

Conforme Figura 6, é possível observar que durante o período avaliado as médias de pH permaneceram abaixo de 5,0. O valor médio obtido para as formulações NZ-1, NZ-2 e NZ-3 foi de: 4,3, 4,2 e 4,3, respectivamente, e variações significativas foram observadas a partir do dia 7.

3.2 Teste de Pacote de Larvas (TPL)

Na Tabela 4 estão dispostas as médias de mortalidade obtidas pelo TPL para as formulações de zeína e controles negativo e positivo.

Tabela 4. Médias de eficácia das formulações de Nanopartículas de Zeína (NZ) e do controle positivo em relação às mortalidades de larvas de *Rhipicephalus microplus* em 24 horas pelo Teste de Pacote de Larvas (TPL).

Concentração (mg.mL^{-1})	**NZ-1**	**NZ-2**	**NZ-3**	**Concentração** (mg.mL^{-1})	**Colosso®**
0,466	100 ± 0,0 ^{Af}	100 ± 0,0 ^{Ac}	100 ± 0,0 ^{Ac}	**0,512**	100 ± 0,0 ^{Ae}
0,233	100 ± 0,0 ^{Af}	100 ± 0,0 ^{Ac}	100 ± 0,0 ^{Ac}	**0,256**	100 ± 0,0 ^{Ae}
0,116	98,2 ± 1,8 ^{Af}	100 ± 0,0 ^{Ac}	100 ± 0,0 ^{Ac}	**0,128**	92,2 ± 0,0 ^{Ae}
0,058	99,6 ± 0,4 ^{Af}	98,3 ± 1,7 ^{Ac}	100 ± 0,0 ^{Ac}	**0,064**	71,9 ± 0,0 ^{Bd}
0,029	82,6 ± 5,6 ^{Be}	82,8 ± 7,2 ^{Bc}	91,8 ± 0,4 ^{Ac}	**0,032**	58 ± 0,0 ^{Cc}
0,014	66,1 ± 16,2 ^{Cd}	47,1 ± 5,7 ^{Cb}	54,6 ± 8,8 ^{Bb}	**0,016**	28,8 ± 0,0 ^{Db}
0,007	13,3 ± 4,6 ^{Dc}	38,2 ± 5,4 ^{Db}	16,9 ± 2,8 ^{Ca}	**0,008**	0,0 ± 0,0 ^{Ea}
0,004	5,7 ± 2,5 ^{Eb}	13,7 ± 3,3 ^{Ea}	12,4 ± 2,0 ^{CDa}	**0,004**	0,0 ± 0,0 ^{Ea}
NZ	0,0 ± 0,0 ^{Fa}	0,0 ± 0,0 ^{Fa}	0,0 ± 0,0 ^{Da}	-	0,0 ± 0,0 ^{Ea}
Controle Negativo	0,0 ± 0,0 ^{Fa}	0,0 ± 0,0 ^{Fa}	0,0 ± 0,0 ^{Da}	-	0,0 ± 0,0 ^{Ea}

*Letras maiúsculas comparam os valores médios nas colunas (diferentes concentrações) e letras minúsculas comparam os valores médios nas linhas (diferentes formulações). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo ANOVA e teste de Tukey ($p \geq 0.05$). NZ = Nanopartículas de zeína; cip = cipermetrina; clo = clorpirifós; NZ-1 (NZ+cip+clo+citral); NZ-2 (NZ+cip+clo+mentol); NZ-3 (NZ+cip+clo+limoneno).

Conforme Tabela 4, observa-se que o controle negativo (água destilada) e as Nanopartículas de Zeína (NZ) sem princípios ativos não causaram efeito deletério sobre as larvas de *R. microplus*. O controle positivo Colosso® (avaliado de 0,004 a 0,512 mg.mL^{-1}) também não causou mortalidade sobre as larvas nas concentrações 0,004 e 0,008 mg.mL^{-1}.

O controle positivo resultou em 100% de mortalidade de larvas nas duas maiores concentrações (0,256 e 0,512 mg.mL^{-1}), e resultou em mortalidade de larvas > 71,9% na concentração de 0,064 mg.mL^{-1}, enquanto as formulações de zeína NZ-1, NZ-2 e NZ-3 (avaliadas de 0,004 a 0,466 mg.mL^{-1}) causaram 100% de mortalidade de larvas a partir das concentrações de 0,233, 0,116 e 0,058 mg.mL^{-1}, respectivamente, e ocasionaram mortalidade > 80,0 % na concentração de 0,029 mg.mL^{-1}.

Mesmo em menores concentrações, as nanoformulações mantiveram efeito larvicida. Na concentração de 0,014 mg.mL^{-1}, NZ-1, NZ-2 e NZ-3 resultaram em 66,1, 47,1 e 54,6% de mortalidade das larvas, respectivamente, enquanto o controle positivo a 0,016 mg.mL^{-1} causou 28,8% de mortalidade.

É possível observar que quando o controle positivo deixou de ter efeito larvicida, as formulações NZ-1, NZ-2 e NZ-3, ainda que em baixas porcentagens,

continuaram causando mortalidade sobre as larvas nas concentrações 0,004 e 0,007 mg.mL^{-1}: 5,7 e 13,3; 13,7 e 38,2; 12,4 e 16,9%, respectivamente. De maneira geral, as formulações obtiveram resultados superiores aos obtidos pelo controle positivo, destacando-se a formulação NZ-3, a qual atingiu tal eficácia com a menor concentração de princípios ativos.

As CL_{50} e CL_{90} determinadas para as nanoformulações (avaliadas na concentração de 0,004 a 0,466 mg.mL^{-1}) foram de: 0,0136 (0,0108 – 0,0171) e 0,0352 (0,0266 – 0,0538); 0,0115 (0,0098 – 0,0133) e 0,0386 (0,0314 – 0,0501); 0,0117 (0,0104 – 0,0132) e 0,0301 (0,0256 – 0,0369) mg.mL^{-1} para NZ-1, NZ-2 e NZ-3, respectivamente, e de 0,0319 (0,0274 – 0,0373) e 0,1028 (0,0827 – 0,1368) mg.mL^{-1}, respectivamente, para o controle positivo (avaliado de 0,004 a 0,512 mg.mL^{-1}).

3.3 Atividade residual verificada por Teste de Pacote de Larvas (TPL)

A Figura 7 mostra a atividade residual das formulações (0,466 mg.mL^{-1}) e do controle positivo (0,512 mg.mL^{-1}), avaliados no decorrer do tempo, a partir de TPL.

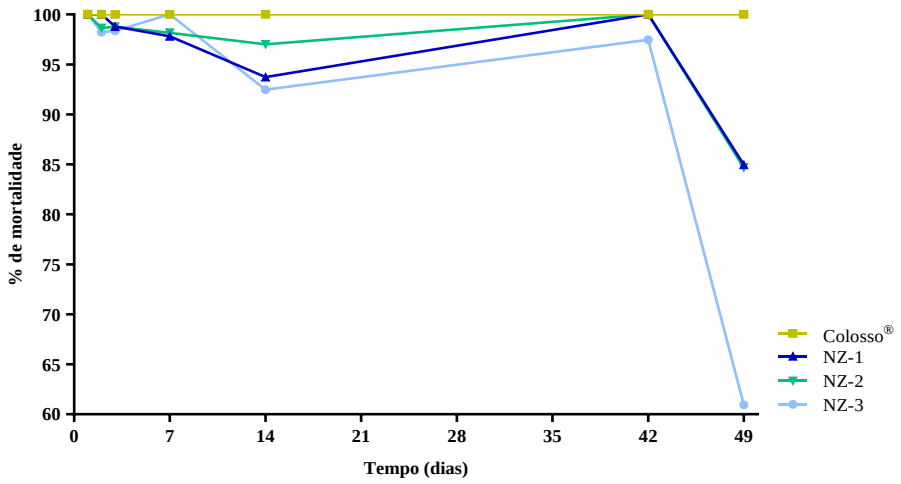


Figura 7. Atividade residual, a partir das médias de mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* obtidas por TPL realizado em 1, 2, 3, 7, 14, 42 e 49 dias após o primeiro tratamento dos papéis filtro, indicando a persistência de atividade. NZ = Nanopartículas de zeína; cip = cipermetrina; clo = clorpirifós. Formulações NZ-1 (NZ+cip+clo+citral), NZ-2 (NZ+cip+clo+mentol) e NZ-3 (NZ+cip+clo+limoneno) avaliadas a 0,466 mg.mL^{-1} (0,125, 1,875 e 3,125 mg.mL^{-1} de composto vegetal, cip e clo, respectivamente); Colosso® avaliado a 0,512 mg.mL^{-1} (0,012, 0,187 e 0,312 mg.mL^{-1} de citronelal, cip e clo, respectivamente).

O controle negativo (água destilada) e as NZ sem princípios ativos não causaram mortalidade sobre as larvas (dados não exibidos).

As formulações de zeína apresentaram uma alta atividade residual, embora menor do que a do controle positivo. Colosso® a 0,512 mg.mL^{-1} ocasionou 100% de eficácia em todo o período avaliado. Da mesma forma, todas as formulações causaram 100% de mortalidade das larvas em 24 horas, e > 98,2%, 98,4% e 97,8% em 2, 3 e 7 dias, respectivamente.

Na Figura 7 observa-se, ainda, que no dia 14 as nanoformulações continuaram tendo elevada eficácia sobre a mortalidade das larvas: 93,7%, 97,0% e 92,5% para NZ-1, NZ-2 e NZ-3, respectivamente. Contudo, é possível notar que no dia 42 as mesmas tiveram sua eficácia elevada: 100%, 100% e 97,5% e posteriormente (no dia 49) houve uma queda na atividade sobre as larvas, resultando em: 85%, 84,7% e 60,9%, respectivamente.

3.4 Teste de Imersão de Adultos (TIA)

Na Tabela 5 estão dispostos os resultados médios obtidos pelo TIA para as formulações de zeína e controles negativo e positivo.

Tabela 5. Médias de peso das fêmeas ingurgitadas (PF), peso dos ovos (PO), % de eclosão das larvas de *Rhipicephalus microplus*, Índice de Eficiência Reprodutiva (IER) e Eficácia das formulações de Nanopartículas de Zeína (NZ) e do controle positivo pelo Teste de Imersão de Adultos (TIA).

Tratamentos (mg.mL^{-1})		PF (g)	PO (g)	% de eclosão	IER	Eficácia (%)
Controle Negativo		2,03 ± 0,0a	1,02 ± 0,0a	95 ± 1,7a	95,3 ± 8,1a	-
NZ		2,03 ± 0,0a	0,96 ± 0,1ab	89,3 ± 5,7ab	84,8 ± 15,5ab	5,6 ± 11ab
NZ-1	**0,466**	2,04 ± 0,0a	0,68 ± 0,1cd	70,7 ± 8,3abc	47,4 ± 16,6cd	50,2 ± 13,3bc
	0,233	2,01 ± 0,0a	0,88 ± 0,1abcd	89,7 ± 2,9ab	78,4 ± 9,7abc	17,8 ± 7,8ab
NZ-2	**0,466**	2,02 ± 0,0a	0,78 ± 0,0abcd	73,7 ± 10,5abc	56,7 ± 11,3bcd	40,5 ± 8abc
	0,233	2,03 ± 0,0a	0,89 ± 0,1abcd	87,3 ± 3,1ab	76,6 ± 6,0abc	19,7 ± 4,6ab
NZ-3	**0,466**	2,03 ± 0,0a	0,63 ± 0,0d	61 ± 17,3c	38,1 ± 11,5d	60,1 ± 8,9c
	0,233	2,03 ± 0,0a	0,90 ± 0,1abc	92,7 ± 4,9ab	82,6 ± 11,4abc	13,3 ± 8,3ab
Colosso® (0,512 mg.mL^{-1})		2,03 ± 0,0a	0,71 ± 0,1bcd	82,3 ± 7,8abc	57,8 ± 16,9bcd	39,4 ± 12,54abc

*Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa (Teste de Tukey, p<0,05). NZ = Nanopartículas de zeína; cip = cipermetrina; clo = clorpirifós; NZ-1 (NZ+cip+clo+citral); NZ-2 (NZ+cip+clo+mentol); NZ-3 (NZ+cip+clo+limoneno).

De acordo com a Tabela 5, é possível observar que o controle negativo (água destilada) não causou efeito deletério sobre as fêmeas ingurgitadas, resultando em alto Índice de Eficiência Reprodutiva (IER): 95,31%. Da mesma forma, NZ apresentou IER de 84,79% e eficácia de 5,56%, porém, sem diferença estatística significativa quando comparadas ao grupo controle negativo.

Na maior concentração avaliada (0,466 $mg.mL^{-1}$), as formulações NZ-1, NZ-2 e NZ-3 apresentaram eficácia de 50,2, 40,5 e 60,1%, respectivamente, e na concentração de 0,233 $mg.mL^{-1}$ eficácia de 17,8, 19,7 e 13,1%, respectivamente. As formulações apresentaram efeito tanto na inibição da postura das fêmeas, quanto na inibição da eclosão das larvas, enquanto o Colosso® atingiu apenas 39,4% de eficácia sobre as fêmeas ingurgitadas a 0,512 $mg.mL^{-1}$.

4. Discussão

Esse estudo demonstrou que foi possível encapsular três princípios ativos simultaneamente nas formulações. A possibilidade de encapsulamento de diferentes princípios ativos em NZ já havia sido relatada na literatura (Bilenler et al., 2015; Chen e Zhong, 2015; Rosa et al., 2015; Dai et al., 2018; Oliveira et al., 2018; 2019; 2020; Pascoli et al., 2020).

Quando se utiliza nanopartículas como sistema carreador de compostos bioativos, é importante considerar possíveis interações entre os componentes do revestimento e os princípios ativos (Pascoli et al., 2018). Dessa forma, as medidas de caracterização e estabilidade aplicadas às formulações nanocarreadoras forneceram parâmetros importantes para a avaliação dessas interações entre os princípios ativos.

Para cada formulação, as curvas de calibração obtiveram coeficiente de correlação superiores a (r) 0,99, o que indica ótima correlação e demonstra que os métodos analíticos utilizados apresentaram alta linearidade, possibilitando quantificar a porcentagem de retenção dos princípios ativos não encapsulados e livres no ultrafiltrado, por meio da equação utilizada. Além disso, as nanoformulações apresentaram EE > 96% para todos os princípios ativos, o que corrobora os resultados relatados por Oliveira et al. (2018; 2019), que obtiveram EE acima de 90% para formulações contendo compostos vegetais encapsulados, reforçando a promissora capacidade da zeína como nanocarreador.

Os diâmetros médios das NZ no tempo inicial (0), na presença ou ausência de princípios ativos, foram < 300 nm, entretanto, as médias de diâmetro obtidas por DLS (que avalia as partículas em conjunto) foram superiores quando comparadas às médias de distribuição de tamanho obtidas por NTA (que avalia individualmente cada uma das partículas). Pascoli et al. (2020) observaram resultado semelhante. Além disso, por meio das duas técnicas, observou-se aumento significativo de valores médios tanto para NZ quanto para as nanoformulações, em função do tempo (especialmente em 120 dias), o que indica uma agregação gradual das partículas (Oliveira et al., 2019).

As NZ apresentaram menores médias tanto para diâmetro quanto para distribuição de tamanho de partículas, em comparação aos valores médios obtidos pelas nanoformulações. Esses resultados vão de encontro com os de Parris et al. (2005), cuja avaliação da distribuição do tamanho indicou que as nanoesferas de zeína sem princípio ativo apresentaram menores diâmetros médios em relação aos diâmetros das partículas encapsuladas com óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*). Isso diverge dos resultados de Oliveira et al. (2018; 2019), cujos valores médios de NZ foram superiores em comparação às formulações, o que pode estar relacionado à quantidade e às características dos princípios ativos encapsulados, uma vez que o presente estudo encapsulou três princípios ativos simultaneamente.

As médias de polidispersão das NZ apresentaram valores entre 0,2 e 0,3. Esses resultados foram semelhantes (entre 0,1 e 0,3) aos relatados por Rosa et al. (2015) e próximos (entre 0,3 e 0,5) aos obtidos por Oliveira et al. (2018), demonstrando boa estabilidade do sistema de nanopartículas.

Oliveira et al. (2018), que também obtiveram médias baixas de potencial zeta (entre -12 e -25 mV), afirmaram que apesar de baixos esses valores não indicam, necessariamente, falta de estabilidade do sistema, uma vez que o tensoativo Pluronic F68 (utilizado no preparo das formulações de zeína) é o que proporciona impedimento estérico, sendo o principal responsável pela estabilização do sistema. Assim, mesmo frente aos baixos valores encontrados no presente estudo (entre -1,25 e -21,47 mV), o tensoativo Pluronic F68 foi o que garantiu a estabilização das formulações.

As médias de concentração (partículas/mL) foram menores para NZ quando comparadas às das nanoformulações. Oliveira et al. (2018) obtiveram dados

semelhantes, atribuindo a isso uma possível falta de estabilidade em relação às formulações. O presente estudo parece confirmar essa possibilidade, pois observou-se uma maior concentração de NZ a qual não apresentou variações significativas durante 90 dias, demonstrando estabilidade. Apesar da consequente diminuição de partículas/mL das formulações durante todo o período de estocagem, as nanoformulações foram capazes de proteger os princípios ativos contra a degradação em solução, o que também é uma característica de estabilidade visada para formulações carrapaticidas.

Solventes e tensoativos em extratos vegetais, óleos essenciais ou em formulações carrapaticidas têm como principal finalidade solubilizar o princípio ativo e promover distribuição homogênea em toda a cutícula do carrapato, ampliando sua área de ação. Ao mesmo tempo, devem se comportar como excipientes, tendo pouco ou nenhum efeito, de modo que os resultados reflitam a real atividade acaricida da substância testada (Chagas et al., 2003; Resende et al., 2012). Assim, uma vez que adjuvantes podem interferir na eficácia de determinado princípio ativo e gerar resultados não confiáveis, o presente estudo avaliou a NZ e verificou que essa não apresentou ação sobre larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, assim como o controle negativo.

Por outro lado, a eficácia determinada pelas nanoformulações sobre *R. microplus* já era esperada, visto que a cipermetrina e o clorpirifós têm sido utilizados de forma associada em acaricidas comerciais, com o objetivo de aumentar o desempenho desses sobre os carrapatos de bovinos (Mendes et al., 2013; Machado et al., 2014). Rodrigues et al. (2018) avaliaram o Colosso® (cip+clo+citronelal) e o Colosso FC-30® (cip+clo+fention) sobre *R. microplus* pelo TPL na concentração recomendada pelo fabricante (0,512 $mg.mL^{-1}$), e obtiveram > 95% de eficácia sobre larvas para ambos os produtos. No presente estudo, resultado semelhante foi observado para o Colosso® na concentração de 0,512 $mg.mL^{-1}$ (contendo 0,012, 0,187 e 0,312 $mg.mL^{-1}$ de citronelal, cip e clo, respectivamente), a qual foi 100% eficaz causando mortalidade de larvas mesmo em concentrações baixas. Da mesma forma, as nanoformulações na concentração de 0,466 $mg.mL^{-1}$ (0,011, 0,170 e 0,284 $mg.mL^{-1}$ de composto vegetal, cip e clo, respectivamente) foram 100% eficazes nas maiores concentrações avaliadas e exibiram altas taxas de mortalidade em menores

concentrações. As nanoformulações continham menor concentração de princípios ativos em relação ao Colosso® e a outros produtos comerciais.

Pelo TIA, os mesmos autores (Rodrigues et al., 2018) obtiveram 100% de eficácia sobre fêmeas ingurgitadas para ambos os produtos Colosso® e Colosso FC-30® a 0,512 $mg.mL^{-1}$. No presente estudo, o desempenho do Colosso® sobre fêmeas ingurgitadas foi inferior, resultando em apenas 39,4% de eficácia na concentração correspondente, o que evidenciou a resistência da cepa de *R. microplus* utilizada frente aos princípios ativos que compõem esse acaricida. Apesar disso, as nanoformulações obtiveram eficácias superiores às do Colosso®, sendo possível considerar que as NZ potencializaram a capacidade carrapaticida dos princípios ativos, corroborando com as informações relacionadas às vantagens dos nanocarreadores, tais como aumento da solubilidade e biodisponibilidade (Fricker et al., 2010; Kah e Hofmann, 2014). Tais aspectos podem estar relacionados à combinação dos princípios ativos, maior absorção desses no organismo alvo, bem como à uma maior proteção contra fatores abióticos e bióticos promovida pelo sistema carreador, o que pode ter proporcionado maior performance. No entanto, cabe destacar que tais hipóteses precisam ainda ser validadas.

Compostos vegetais, mesmo em baixas proporções, podem contribuir, de forma sinérgica ou aumentando o potencial repelente de óleos essenciais (Nerio et al., 2010; Da Silva Lima et al., 2016). Citral, mentol e limoneno estão presentes em vários óleos essenciais de plantas com eficácia comprovada sobre larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* (Cruz et al., 2013; Chagas et al., 2016; Da Silva Lima et al., 2016; Vinturelle et al., 2017). Dessa forma, a ação acaricida observada nas formulações de zeína promovida pela cipermetrina e pelo clorpirifós também pode ter recebido a contribuição dos compostos vegetais, ainda que em menores concentrações.

As nanoformulações demonstraram uma alta atividade residual, embora tenha sido menor do que a observada para o Colosso® no decorrer do tempo. O fato das formulações terem apresentado atividade superior em 42 dias, em relação à observada em 14 dias, pode estar relacionado ao tempo de degradação natural das NZ. Ou seja, nesse período, possivelmente houve degradação das nanopartículas, liberando os princípios ativos que agiram sobre as larvas, os quais tiveram queda no

seu potencial de ação posteriormente. Isso proporcionaria uma vida maior para o produto: ação imediata e ação posterior, por meio da degradação das NZ liberando os ativos, o que seria uma vantagem para a elaboração de novos carrapaticidas que buscam controle de *R. microplus* mais seguro.

Conclusões

O presente estudo demonstrou que foi possível encapsular os princípios ativos em NZ, apesar da consequente diminuição de partículas/mL das formulações no decorrer da estocagem. As nanopartículas de zeína foram capazes de proteger os princípios ativos contra a degradação em solução, o que também é uma característica de estabilidade visada para formulações carrapaticidas. As formulações evidenciaram alto potencial larvicida sobre *R. microplus* no TPL, causando altas taxas de mortalidade. A formulação NZ-3 foi a que mais se destacou no TPL e a que demonstrou o maior efeito sobre fêmeas ingurgitadas no TIA. As três formulações demonstraram alta atividade residual com uma queda de potencial de ação no decorrer do tempo. Isso sugere a ocorrência de biodegradação das NZ.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Processo n°: 2017/13249-8 e 2017/21004-5), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Processo n°: 169777/2017-0), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (Processo n°: 88882.434504/2019-01), à Ipanema Ltda., à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP (Campus Jaboticabal e Sorocaba), e à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Pecuária Sudeste (Processo n°: 20.18.03.017.00-02).

Referências

Anderson W, Kozak D, Coleman VA, Jämting ÅK, Trau M (2013) A comparative study of submicron particle sizing platforms: Accuracy, precision and resolution analysis of polydisperse particle size distributions. **Journal of Colloid and Interface Science** 405:322-330.

Andreotti R, Koller WW, Garcia MV (2016) **Carrapatos: protocolos e técnicas para estudo**. 1.ed. Brasília, DF: Embrapa, 240 p. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1041177/1/Carrapatosprotocolosetecnicas.pdf>.

Bilenler T, Gokbulut I, Sislioglu K, Karabulut I (2015) Antioxidant and antimicrobial properties of thyme essential oil encapsulated in zein particles. **Flavour and Fragrance Journal** 30:392-398.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução nº 899**, Brasília, 2003.

Calvano MPCA, Brumatti RC, Garcia MV, Barros JC, Andreotti R (2019) Economic efficiency of *Rhipicephalus microplus* control and efect on beef cattle performance in the Brazilian Cerrado. **Experimental and Applied Acarology** 79:459-471.

Chagas ACS, Leite RC, Furlong J, Prates HT, Passos WM (2003) Sensibilidade do carrapato *Boophilus microplus* a solventes. **Ciência Rural** 33:109-114.

Chagas ACS, Domingues LF, Fantatto RR, Giglioti R, Oliveira MCS, Oliveira DH, Mano RA, Jacob RG (2014) *In vitro* and *in vivo* acaricide action of juvenoid analogs produced from the chemical modification of *Cymbopogon* spp. and *Corymbia citriodora* essential oil on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology** 205:277-284.

Chagas ACS (2015) Medicinal plant extracts and nematode control. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources** 10:1-8.

Chagas ACS, Oliveira MCS, Giglioti R, Santana RCM, Bizzo HR, Gama PE, Chaves FCM (2016) Efficacy of 11 Brazilian essential oils on lethality of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Ticks and Tick-borne Diseases** 7:427-432.

Chen H, Zhong Q (2015) A novel method of preparing stable zein nanoparticle dispersions for encapsulation of peppermint oil. **Food Hydrocolloids** 43:593-602.

Corrêa JCR, Salgado HRN (2011) Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais** 13:500-506.

Cruz EMO, Costa-Junior LM, Pinto JAO, Santos DA, Araujo SA, Arrigoni-Blank MF, Bacci L, Alves PB, Cavalcanti SCH, Blank AF (2013) Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology** 195:198-202.

Dai L, Li R, Wei Y, Sun C, Mao L, Gao Y (2018) Fabrication of zein and rhamnolipid complex nanoparticles to enhance the stability and *in vitro* release of curcumin. **Food Hydrocolloids** 77:617-628.

Da Silva Lima A, De Carvalho JF, Peixoto MG, Blank AF, Borges LMF, Costa Junior LM (2016) Assessment of the repellent effect of *Lippia alba* essential oil and major monoterpenes on the cattle tick *Rhipicephalus microplus.* **Medical and Veterinary Entomology** 30:73-77.

De La Fuente J, Estrada-Pena A, Venzal JM, Kocan KM, Sonenshine DE (2008) Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. **Frontiers in Bioscience** 13:6938-6946.

Drummond RO, Ernest SE, Trevino JL, Gladney WJ, Graham OH (1973) *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory tests for insecticides. **Journal of Economic Entomology** 66:130-133.

Fagnani R, Battaglini APP, Tamanini R, Seixas FN, Beloti V (2011) Análise de risco de praguicidas em leite cru e caracterização do uso em propriedades leiteiras. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes** 383:20-26.

FAO (1971) Recommended method for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides: tentative methods for larvae of cattle tick *Boophilus* spp. **Plant Protection Bulletin** 19:15-18.

Figueiredo A, Nascimento LM, Lopes LG, Giglioti R, Albuquerque RDGG, Santos MG, Falcão DQ, Nogueira JAP, Rocha L, Chagas ACS (2018) First report of the effect of *Ocotea elegans* essential oil on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus.* **Veterinary Parasitology** 252:131-136.

Fricker G, Kromp T, Wendel A, Blume A, Zirkel J, Rebmann H, Setzer C, Quinkert RO, Martin F, Müller-Goymann C (2010) Phospholipids and lipid-based formulations in oral drug delivery. **Pharmaceutical Research** 27:1469-1486.

Gamisans F, Lacoulonche F, Chauvet A, Espina M, Garcia ML, Egea MA (1999) Flurbiprofen-loaded nanospheres: analysis of the matrix structure by thermal methods. **International Journal of Pharmaceutics** 179:37-48.

Govender T, Stolnik S, Garnett MC, Illum L, Davis SS (1999) PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. **Journal of Controlled Release** 57:171-185.

Graf JF, Gogolewski R, Leach BN (2004) Tick control: an industry point of view. **Parasitology** 129:S427-S442.

Grisi L, Leite RC, Martins JRS, Barros ATM, Andreotti R, Cançado PHD, Perez de León AA, Pereira JB, Villela HS (2014) Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 23:150-156.

Hu K, Mcclements DJ (2015) Fabrication of biopolymer nanoparticles by antisolvent precipitation and electrostatic deposition: Zein-alginate core/shell nanoparticles. **Food Hydrocolloids** 44:101-108.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **Orientação sobre validação de métodos analíticos** - DOC CGRE-008, Brasília, 2011. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf>.

Kah M, Hofmann T (2014) Nanopesticide research: Current trends and future priorities. **Environment International** 63:224-235.

Kilic AC, Capan Y, Vural I, Gursoy RN, Dalkara T, Cuine A, Hincal AA (2005) Preparation and characterization of PLGA nanospheres for the targeted delivery of NR2B-specific antisense oligonucleotides to the NMDA receptors in the brain. **Journal of Microencapsulation** 22:633-641.

Klafke G, Webster A, Agnol BD, Pradel E, Silva J, de La Canal LH, Becker M, Osório MF, Mansson M, Barreto R, Scheffer R, Souza UA, Corassini VB, Santos J, Reck J, Martins JR (2017) Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases** 8:73-80.

Machado FA, Pivoto FL, Ferreira MST, Gregorio FV, Vogel FSF, Sangioni LA (2014) *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in the western-central region of Rio Grande do Sul, Brazil: multiresistant tick. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 23:337-342.

Mendes MC, Duarte FC, Martins JR, Klafke GM, Fiorini LC, Barros ATM (2013) Characterization of the pyrethroid resistance profile of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* populations from the states of Rio Grande do Sul and Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 22:379-384.

Nerio LS, Olivero-Verbel J, Stashenko E (2010) Repellent activity of essential oils: a review. **Bioresource Technology** 101:372-378.

Oliveira JL, Campos EVR, Pereira AES, Pasquoto T, Lima R, Grillo R, Andrade DJ, Santos FAD, Fraceto LF (2018) Zein nanoparticles as eco-friendly carrier systems for botanical repellents aiming sustainable agriculture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 66:1330-1340.

Oliveira JL, Campos EVR, Germano-Costa T, Lima R, Della Vechia JFD, Soares ST, Andrade DJ, Gonçalves KC, Nascimento J, Polanczyk RA, Fraceto LF (2019) Association of zein nanoparticles with botanical compounds for effective pest control systems. **Pest Management Science** 75:1855-1865.

Oliveira JL, Campos EVR, Camara MC, Vechia JFD, Matos STS, Andrade DJ, Gonçalves KC, Nascimento J, Polanczyk RA, Araújo DR, Fraceto LF (2020) Hydrogels containing botanical repellents encapsulated in zein nanoparticles for crop protection. **ACS Applied Nano Materials** 3:207-217.

Parris N, Cooke PH, Hicks KB (2005) Encapsulation of essential oils in zein nanospherical particles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 53:4788-4792.

Pascoli M, Lima R, Fraceto LF (2018) Zein nanoparticles and strategies to improve colloidal stability: a mini-review. **Frontiers in Chemistry** 6:1-5.

Pascoli M, Albuquerque FP, Calzavara AK, Tinoco-Nunes B, Oliveira WHC, Gonçalves KC, Polanczyk RA, Vechia JFD, Matos STS, Andrade DJ, Oliveira HCO, Souza Neto JÁ, Lima R, Fraceto LF (2020) The potential of nanobiopesticide based on zein nanoparticles and neem oil for enhanced control of agricultural pests. **Journal of Pest Science** 93:793-806.

Pavela R, Benelli G (2016) Essential Oils as Ecofriendly Biopesticides? Challenges and Constraints. **Trends in Plant Science** 21:1000-1007.

Resende JD, Daemon E, Monteiro CM, Maturano R, Prata MC, Ferreira Rodrigues AF (2012) Toxicity of solvents and surfactants to *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae) larvae. **Experimental Parasitology** 131:139-142.

Rodrigues VS, Bonatte JrP, Garcia MV, Higa LOS, Piña FTB, Zimmermannd NP, Duarte PO, Barros JC, Andreotti R (2018) Efficacy profile of cypermethrin and chlorpyrifos based acaricides on *Rhipicephalus microplus* control on cattle in the rearing phase, naturally infested and exposed to tick fever agents in central Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports** 12:43-48.

Rodriguez-Vivas RI, Jonsson NN, Bhushan C (2018) Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. **Parasitology Research** 117:3-29.

Rosa CG, Maciel MVOB, Carvalho SM, Melo APZ, Jummes B, Silva T, Martelli SM, Villetti MA, Bertoldi FC, Barreto PLM (2015) Characterization and evaluation of physicochemical and antimicrobial properties of zein nanoparticles loaded with phenolics monoterpenes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects** 481:337-344.

Schaffazick SR, Guterres S, Freitas LL, Pohlmann AR (2003) Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova** 26:726-737.

Shukla R, Cheryan M (2001) Zein: the industrial protein from corn. **Industrial Crops and Products** 13:171-192.

Sozer N, Kokini JL (2009) Nanotechnology and its applications in the food sector. **Trends in Biotechnology** 27:82-89.

Venkatraman SS, Jie P, Min F, Freddy BYC, Leong-Huat G (2005) Micelle-like nanoparticles of PLA–PEG–PLA triblock copolymer as chemotherapeutic carrier. **International Journal of Pharmaceutics** 298:219-232.

Vilela VLR, Feitosa TF, Bezerra RA, Klafke GM, Riet-Correa F (2020) Multiple acaricide-resistant *Rhipicephalus microplus* in the semi-arid region of Paraíba State, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases** 11:101413.

Vinturelle R, Mattos C, Meloni J, Nogueira J, Nunes MJ, Vaz Jr IS, Rocha L, Lione V, Castro HC, Chagas EF (2017) *In vitro* evaluation of essential oils derived from *Piper nigrum* (Piperaceae) and *Citrus limonum* (Rutaceae) against the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Biochemistry Research International** 2017:1-9.

Wang Y, Kannan K (2018) Concentrations and dietary exposure to organophosphate esters in foodstuffs from Albany, New York, United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 26:13525-13532.

CAPÍTULO 4 - Considerações finais

O presente estudo demonstrou que a associação de nanocarreadores (lipídicos e proteicos) e princípios ativos com potencial carrapaticida pode ser uma alternativa para o controle das infestações por *Rhipicephalus microplus*. Apesar da consequente diminuição de partículas/mL das formulações durante o período de estocagem, as nanoformulações foram capazes de proteger os princípios ativos contra a degradação em solução, característica de estabilidade visada para formulações carrapaticidas.

As nanoformulações elaboradas com Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS), Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN) e Nanopartículas de Zeína (NZ) obtiveram resultados semelhantes aos encontrados para o produto comercial (cipermetrina + clorpirifós + citronelal), além de eficácias em menores concentrações.

Associados à cipermetrina + clorpirifós + composto vegetal (citral, mentol ou limoneno), nanocarreadores lipídicos demonstraram potencial contra as larvas, enquanto as NZ apresentaram eficácia sobre larvas e fêmeas ingurgitadas. As formulações contendo NZ evidenciaram ação superior em relação ao produto comercial, sobre os dois estádios de *R. microplus*. Demonstraram, ainda, alta atividade residual, indicando uma possível biodegradação em menor período de tempo quando comparado ao produto comercial.

Baseado nessas observações, sistemas carreadores aplicados à elaboração de novos carrapaticidas poderão ser um avanço para o setor agropecuário. Um fármaco com menor quantidade de princípios ativos, que garanta eficácia acaricida e ao mesmo tempo possua degradação mais rápida poderá revolucionar a forma de controle parasitária e impactar, de maneira positiva, a bovinocultura leiteira, caso viabilize menor descarte do leite dos animais tratados, assegurando menores perdas econômicas. As pespectivas futuras para a utilização de sistemas nanocarreadores no controle de *R. microplus* envolvem, ainda, a saúde humana e a sustentabilidade, uma vez que biocarrapaticidas elaborados a partir dessa nanotecnologia poderão ser mais seguros e resultar em menor possibilidade de presença de resíduos nos alimentos de origem animal, garantindo a segurança alimentar do consumidor, e possível contribuição para um menor impacto ambiental devido à sua melhor biodegradação no ambiente.