

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS E
BIOPROCESSOS
MESTRADO PROFISSIONAL

“DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES TÓPICAS A PARTIR DA
UTILIZAÇÃO DE NANOESTRUTURAS PARA A ENCAPSULAÇÃO DOS
FÁRMACOS AMITRAZ E FIPRONIL PARA USO VETERINÁRIO”

ROBERTO POPOLIM

ORIENTADOR: Prof. Dr. Fernando Lucas Primo

ARARAQUARA – SP

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**“DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES TÓPICAS A PARTIR DA
UTILIZAÇÃO DE NANOESTRUTURAS PARA A ENCAPSULAÇÃO DOS
FÁRMACOS AMITRAZ E FIPRONIL PARA USO VETERINÁRIO”**

ROBERTO POPOLIM

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos (Mestrado Profissional), Área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Fernando Lucas Primo

ARARAQUARA – SP

2019

P829d Popolim, Roberto.
Desenvolvimento de formulações tópicas a partir da utilização de nanoestruturas para a encapsulação dos fármacos amitraz e fipronil para uso veterinário / Roberto Popolim. – Araraquara: [S.n.], 2019.
63 f. : il.

Dissertação (Mestrado Profissional) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos. Área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos.

Orientador: Fernando Lucas Primo.

1. Amitraz. 2. Fipronil. 3. Nanoestruturas. 4. Espectroscopia de absorção. 5. Cromatografia líquida de alta eficiência. 6. Biocarapaticidograma. 7. Nanocápsula Polimérica. I. Primo, Fernando Lucas, orient. II. Título.

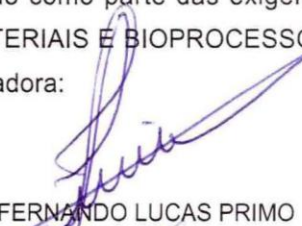
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

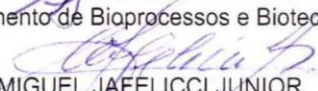
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES TÓPICAS A PARTIR DA UTILIZAÇÃO DE NANOESTRUTURAS PARA A ENCAPSULAÇÃO DOS FÁRMACOS AMITRAZ E FIPRONIL PARA USO VETERINÁRIO

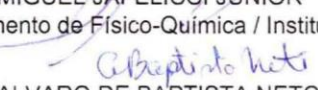
AUTOR: ROBERTO POPOLIM

ORIENTADOR: FERNANDO LUCAS PRIMO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS E BIOPROCESSOS, área: Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. FERNANDO LUCAS PRIMO
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. MIGUEL JAFELICCI JUNIOR
Departamento de Físico-Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. ALVARO DE BAPTISTA NETO
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Araraquara, 19 de dezembro de 2019

DEDICATÓRIA

Essa Dissertação é dedicada especialmente aos meus pais, Alcides e Maria, obrigado pelos ensinamentos e pelas oportunidades que me proporcionaram.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a Deus, por me proporcionar uma vida repleta de possibilidades e ensinamentos e por me direcionar por caminhos, os quais me tornaram o Homem que sou hoje.

Aos meus pais Alcides e Maria e aos meus irmãos Maria Elisabete, Silvana e Alcides por todo o apoio, incentivo e torcida em todas as etapas de minha vida.

Ao meu companheiro Alan Keller Gomes por todo suporte, paciência, compreensão, incentivo, torcida e orientação. Saiba que você foi um dos motivos e molas propulsoras desta jornada em minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Lucas Primo, agradeço pela oportunidade de desenvolver este projeto, pela orientação, dedicação, paciência e por todos ensinamentos durante este período de convivência e trabalho.

A minha grande amiga Paula Bueno, sem o seu incentivo e ajuda nada disto teria acontecido.

A Mariana Teixeira da Trindade, pela ajuda em uma das fases de desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço também a minha equipe de trabalho da empresa NOXON DO BRASIL QUÍMICA E FARMACÊUTICA LTDA., a qual sempre vibrou e torceu pelas minhas conquistas e não poderiam deixar de fazer diferente neste momento de minha vida. Agradeço ainda, de maneira muito especial, Daniela Miyasaka e Rodrigo G. Motta, Departamento Técnico NOXON, por acreditar e ajudar em alguns testes deste projeto.

A Camila Fernanda Amantino pela disponibilidade em sempre ajudar, ensinar e orientar nas atividades de laboratório e ao colega Rodrigo Passos Evangelista pelos ensinamentos iniciais deste projeto.

Ao Prof. Dr. Rodrigo F. C. Marques, Departamento de Físico-Química do Instituto de Química da UNESP de Araraquara por ceder o equipamento Zetasizer Nano ZS90.

Por fim, o meu muito obrigado a NOXON DO BRASIL QUÍMICA E FARMACÊUTICA LTDA., empresa a qual represento e que desde o primeiro momento da criação deste projeto procurou me apoiar e incentivar no desenvolvimento deste trabalho da melhor forma possível.

*“...se chorei ou se sorri, o importante
é que emoções eu vivi ...”*

(Roberto Carlos)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2. Objetivos Específicos	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 Principais enfermidades parasitárias que acometem bovinos	17
3.2 Fármacos Antiparasitários.....	18
3.3 Amitraz	18
3.4 Fipronil.....	20
3.5 Nanotecnologia	22
3.5.1 Nanoestruturas	22
3.5.2 Lipossomas/Micelas	22
3.5.3 Nanoemulsões.....	23
3.5.4 Nanopartículas Lipídicas.....	24
3.5.5 Dendrímeros.....	25
3.5.6 Nanotubos/Fulerenos	26
3.5.7 Óxidos nanoestruturados.....	27
3.5.8 Nanopartículas Poliméricas.....	28
3.6 Aplicações.....	30
3.6.1 Nanotecnologia Farmacêutica	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Materiais	31
4.2 Equipamentos	31
4.3 Métodos	32
4.3.1 Método para obtenção das nanocápsulas poliméricas de PLGA contendo os ativos Amitraz e Fipronil.....	32
4.3.2 Espectroscopia de Absorção no UV-Visível para o Amitraz e Fipronil Livres e Nanoencapsulados	33
4.3.3 Desenvolvimento de Método Espectro Analítico para Quantificação dos Ativos Amitraz e Fipronil Isolados e Associados as Nanopartículas	34
4.3.4 Determinação do Tamanho de Partículas, Índice de Polidispersidade e Potencial Zeta	34
4.3.5 Avaliação da Estabilidade Físico-Química das Nanoestruturas com Amitraz e Fipronil	35

4.3.6 Análise físico-química para identificação e quantificação dos ativos Amitraz e Fipronil livres (não encapsulados) e encapsulados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) ...	35
4.3.7 Quantificação e Teor de Encapsulação dos Ativos nas Formulações Isoladas e Mistas	37
4.3.8 Biocarrapaticidograma para a formulação de Amitraz e Fipronil em Nanocápsulas Poliméricas	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 Espectroscopia de Absorção no UV-Visível para Amitraz e Fipronil livres e nanoencapsulados	41
5.2 Desenvolvimento de Método Espectro-Analítico para Quantificação dos ativos Amitraz e Fipronil associados as Nanocápsulas Poliméricas	44
5.3 Determinação do Tamanho de Partículas, Índice de Polidispersidade e Potencial Zeta	46
5.4 Identificação e quantificação do teor dos ativos Amitraz e Fipronil nanoencapsulados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD)	51
5.5 Eficácia acaricida contra fêmeas de R. (B.) microplus ingurgitadas - TIA.....	53
6 CONCLUSÕES	54
7 REFERÊNCIAS	56

RESUMO

O Brasil apresenta índices de desenvolvimento agrícola acima da média mundial. Contudo, para manter estas perspectivas e continuar impactando positivamente na balança comercial do país, a cadeia do agronegócio necessita de tecnologias de ponta, principalmente no que tange o desenvolvimento de novos insumos veterinários e a aplicação de novas tecnologias, as quais propiciem produtos com maior qualidade, segurança e eficácia, bem como, estejam em consonância com os atuais preceitos de Saúde Única, que estabelecem o equilíbrio entre animais, humanos e o meio ambiente. Nesse cenário, é oportuno destacar, o uso da biotecnologia, mais particularmente a nanotecnologia aliada ao desenvolvimento de novas formulações cujas concentrações de ativos possam ser menores gerando assim menos resíduos em alimentos, por exemplo, bem como a liberação destes ativos possa ser sustentada, garantindo assim maior eficácia nos tratamentos realizados, já que as formulações convencionais, atualmente não apresentam a eficácia desejada, uma vez que os parasitos passaram por um processo de adaptação e criaram resistência a maioria dos ectoparasiticidas de uso comercial. Assim, o presente estudo desenvolveu um produto inovador a partir da associação de Amitraz (amidínico) e Fipronil (fenilpirazól), em nanocápsulas poliméricas. Também realizou a avaliação da estabilidade físico-química das formulações, tanto em formulações isoladas (nanocápsulas somente com Amitraz e somente com Fipronil) e associadas (nanocápsulas com Amitraz e Fipronil), através da avaliação do tamanho das nanoestruturas, bem como do potencial Zeta e do índice de polidispersidade. Foi estabelecido um método espectroanalítico para determinar as quantidades de ativos livres (aqueles que não foram incorporados às nanocápsulas) e nanoencapsulados, por espectroscopia de absorção e emissão no UV-Visível. Para tanto foi descrito um protocolo para a determinação da curva de correlação entre o máximo de emissão de absorção e emissão em função de diferentes concentrações dos ativos. O método foi determinado com um número de repetições (n) igual a 3 para ambos fármacos, sendo que para Amitraz a linearidade apresentou-se na faixa de 0,005 a 0,01 mg.mL⁻¹ e para Fipronil na faixa de 0,008 a 0,05 mg.mL⁻¹. Além disto, foi desenvolvido um método por cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação dos ativos nanoencapsulados. E por fim, para evidenciar a efetividade da formulação associada foi realizado o teste de Biocarrapaticidograma o qual demonstrou um aumento na atividade dos ativos após a nanoencapsulação em concentrações muito reduzidas.

Palavras-chave: Amitraz. Fipronil. Nanoestruturas. Espectroscopia de absorção. Cromatografia líquida de alta eficiência. Biocarrapaticidograma. Nanocápsula Polimérica.

ABSTRACT

Brazil has agricultural development rates above the world average. However, in order to maintain these perspectives and continue to positively impact the country's trade balance, the agribusiness chain needs cutting-edge technologies, especially with regard to the development of new veterinary inputs and the application of new technologies, which provide products with greater quality, safety, and effectiveness, as well as, are in line with the current single health precepts, which establish the balance between animals, humans and the environment. In this scenario, it is appropriate to highlight, the use of biotechnology, more particularly nanotechnology combined with the development of new formulations whose concentrations of assets may be lower generating fewer residues in food, for example, as well as the release of these assets can be sustained, thus ensuring greater efficacy in the treatments performed, since conventional formulations, nowadays do not present desired efficacy, since parasites have undergone an adaptation process and most ectoparasiticides have created resistance, such as Amitraz and Fipronil. Thus, the present study developed an innovative product from the association of Amitraz (amidine) and Fipronil (phenylpirazól), in nanocapsules. It also evaluated the physicochemical stability of the formulations, both in isolated formulations (nanocapsules only with Amitraz and only with Fipronil) and associated (nanocapsules with Amitraz and Fipronil), by evaluating the size of nanostructures, as well as the zeta potential and polydispersity index. A spectroanalytical method was established to determine the amounts of free assets (those that were not incorporated into nanocapsules) and nanoencapsulated, by UV-visible absorption and emission spectroscopy for this, a protocol was described for determining the correlation curve between the maximum emission of absorption and emission due to different concentrations of the assets. The method was determined with a number of repetitions (n) equal to three for both drugs, and for Amitraz, linearity was presented in the range of 0.005 to 0.01 mg.mL⁻¹ and for Fipronil in the range from 0.008 to 0.05 mg.mL⁻¹. In addition, a method was developed by liquid chromatography for the quantification of nanoencapsulation assets. Finally, to demonstrate the effectiveness of the associated formulation, the Biocarrapaticidogram test was performed, which demonstrated an increase in the activity of the assets after the nanoencapsulation in very low concentrations.

Keywords: Amitraz. Fipronil. Nanostructures. Absorption Spectroscopy. Liquid Chromatography. Biocarrapaticidogram. Polymer Nanocapsules.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do fármaco Amitraz e suas principais propriedades físico-químicas.....	19
Figura 2 - Estrutura química do fármaco Fipronil e suas principais propriedades físico-químicas.....	21
Figura 3 - 1) Estrutura dos lipossomos constituídos por fosfolipídeos. 2) Bicamadas lipídicas. 3) Lipossomos com modificações na superfície (peguilados, com carga e com anticorpos) 4) Tipos de lipossomos de acordo com o número de camadas	23
Figura 4 - Desenho esquemático dos sistemas nanoestruturados: (a) nanolipossoma; (b) nanoemulsão; (c) nanopartícula lipídica sólida; (d) carreador lipídico nanoestruturado; (e) nanocápsula e; (f) nanoesfera.	24
Figura 5 - Desenho esquemático dos sistemas de nanopartículas lipídicas: (a) nanolipossoma; (b) nanoemulsão; (c) nanopartícula lipídica sólida; (d) carreador lipídico nanoestruturado; (e) nanocápsula e; (f) nanoesfera.	25
Figura 6 - Estratégias potenciais para interações entre dendrímeros e moléculas de fármacos	26
Figura 7 - Formas alotrópicas do carbono: (a) grafite, (b) diamante, (c) fulereno e (d) nanotubos de carbono.	27
Figura 8 - Microscopia eletrônica de óxido de zinco nanoestruturado.....	28
Figura 9 - Estrutura das nanopartículas poliméricas: nanocápsulas e nanoesferas.	29
Figura 10 – Esquema representativo das etapas de síntese das nanocápsulas de PLGA contendo os ativos Fipronil e/ou Amitraz.	33
Figura 11 – Esquema representativo das etapas de extração do TPC e LPC.	37
Figura 12 - Espectro de absorção no UV/VIS de Amitraz/acetonitrila na concentração de 0,01mg.mL ⁻¹	42
Figura 13 - Espectro de absorção no UV/VIS de Fipronil/acetonitrila na concentração de 0,01 mg.mL ⁻¹	43
Figura 14 - Espectro de absorção normalizado no UV/VIS de Amitraz e Fipronil em ACN. .	43
Figura 15 - Conjunto de espectros de absorção no UV-VIS de Amitraz em Acetonitrila em diferentes concentrações (0,2 mg.mL ⁻¹ – 0,7 mg.mL ⁻¹).	44
Figura 16 - Conjunto de espectros de absorção no UV – VIS de Fipronil em acetonitrila em diferentes concentrações (0,02 mg.mL ⁻¹ – 0,08 mg.mL ⁻¹).	44
Figura 17 - Curva padrão de calibração por correlação entre absorção máxima em função da concentração de Amitraz na faixa de 0,005 mg.mL ⁻¹ – 0,01 mg.mL ⁻¹ (n = 3). $y = 136,93x - 0,2294$	45
Figura 18 - Curva de correlação padrão de calibração por absorção máxima em função da concentração de Fipronil na faixa de 0,008 mg.mL ⁻¹ – 0,050 mg.mL ⁻¹ (n = 3). $y = 8,9881x + 0,0075$	45
Figura 19 - Estudo de estabilidade físico-química em função do tempo para a formulação de nanocápsulas de PLGA na ausência dos princípios ativos: determinação de tamanho de partícula e PDI (A) e Potencial Zeta (B).	47
Figura 20 - Estudo de estabilidade físico-química em função do tempo para a formulação de nanocápsulas de PLGA com Amitraz na concentração de 0,05 %: determinação de tamanho de partícula, e PDI (A) e Potencial Zeta (B).....	48

Figura 21 - Estudo de estabilidade físico-química em função do tempo para a formulação de nanocápsulas de PLGA com Amitraz na concentração de 0,10 % determinação de tamanho de partícula e PDI (A) e Potencial Zeta (B).	49
Figura 22 - Estudo de estabilidade físico-química em função do tempo para a formulação de nanocápsulas de PLGA com Fipronil na concentração de 0,03 % determinação de tamanho de partícula e PDI (A) e Potencial Zeta (B).	50
Figura 23 - Curva de Calibração por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para Amitraz	51
Figura 24 - Curva de Calibração por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para Fipronil	51
Figura 25 - Cromatograma de análise de formulação mista Amitraz e Fipronil em ACN.....	52
Figura 26 - Cromatograma de análise de filtrado após centrifugação de formulação mista Amitraz e Fipronil.	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Padrões para obtenção da curva padrão de calibração por HPLC.....	36
Tabela 2 - Delineamento experimental realizado no TIA	40
Tabela 3 - Resultados obtidos na quantificação ativos Amitraz e Fipronil livres (não encapsulados) e encapsulados por CLAE- DAD.....	52
Tabela 4 - Mortalidade de fêmeas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> (Cepa RS), submetidas a ação das: Nanocápsulas de Amitraz (0,10 %) mais Fipronil (0,03 %) e Formulação de Amitraz 12,5%; diluídas ou não em água.	54

LISTA DE ABREVIATURAS

PIB – Produto Interno Bruno

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento

µg/mL – concentração em microgramas por mililitros

mg/mL – concentração em miligramas por mililitros

LD50 – dose letal para 50 % da população teste

MAPA – Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

LMR – Limite Máximo de Resíduo

nm – nanômetros

µL – volume em microlitros

PGLA – poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)

PDI – índice de polidispersidade

ACN – acetoneitrila

mV – potencial zeta

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência

DMSO – dimetilsulfóxido

TPC – teor total de ativo na formulação

LPC – teor de ativo presente no sobrenadante

TE – teor de encapsulação

mL – volume em mililitros

1 INTRODUÇÃO

Agronegócio, por definição, é toda relação comercial e industrial que envolve, de alguma forma, a cadeia produtiva agrícola ou pecuária, sendo compreendidos tanto os setores de produção como os de processamento do produto final (GUANZIROLI, 2006). Atualmente o Brasil ocupa uma posição de destaque no agronegócio mundial, sendo considerado por muitos como o celeiro do mundo (GASQUES; SILVA, 2009; CEPEA, 2019).

Os dados oficiais disponibilizados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, remetem ao agronegócio a movimentação de R\$ 570,31 bilhões em 2018 e R\$ 564,32 bilhões em 2019, divididos entre: Agricultura: R\$ 383,97 bilhões em 2018 e R\$ 372,07 bilhões em 2019, já a Pecuária isoladamente gerou R\$ 186,35 bilhões em 2018 e R\$ 192,24 bilhões em 2019 (MAPA, 2019).

Esse bom desempenho da cadeia do agronegócio, vem se firmando ao longo dos últimos 20 anos. Com a mesma área plantada, a produção de grãos passou de 51 milhões de toneladas na década de 80, para 100 milhões de toneladas em meados do ano 2000 (GUANZIROLI, 2006). Já as estimativas da Companhia Nacional de Abastecimento indicam que os agricultores brasileiros devem colher 241,3 milhões de toneladas de grãos durante a safra 2018/2019 (CONAB, 2019).

A criação de bovinos tem posição consolidada nesse cenário, é uma das principais atividades do país movimentando aproximadamente 2% a 4% do PIB (SCHLESINGER, 2010; CEPEA, 2019). Dentre seus principais produtos, pode-se destacar o leite e a carne. O leite se enquadra como dos produtos de origem animal mais impactantes e sinaliza para uma performance competitiva também para o mercado internacional, movimentando cerca de R\$ 32 bilhões no ano de 2019 (MAPA, 2019), com 1,1 milhão de produtores, sendo as regiões sul e sudeste as detentoras das maiores produções. Estudo recém divulgado pela Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) revelou que o país é responsável por cerca de 7% do leite produzido no mundo e é o quinto maior produtor mundial (CONAB, 2019). Assim, Minas Gerais é o maior estado produtor, com 27% da produção nacional, seguido dos estados do Rio Grande do Sul, Paraná, Goiás, Santa Catarina, São Paulo e Bahia, todos com média anual superior a um bilhão de litros (CONAB, 2019).

A pecuária de corte, tem sido o segmento que mais gerou números favoráveis para o setor do agronegócio. Entretanto, mesmo ocupando a segunda posição mundial em quantidade de animais, o rebanho bovino comercial Brasileiro é o maior, com cerca de 214,7 milhões de

cabeças (SCHLESINGER, 2010; ARAUJO *et al.*, 2012; CUNHA, 2012; CONAB, 2019). Antes de apresentar as projeções de carnes, procura-se ilustrar a atual distribuição no Brasil do rebanho bovino, no que se refere ao número de animais abatidos em 2018. Segundo a Conab (2019), foram abatidas 31,9 milhões de cabeças em todo o país. O Mato Grosso (16,4%), Mato Grosso do Sul (10,3%), Goiás (10,1%), São Paulo (9,5%), Minas Gerais (8,8), Pará (8,2), Rondônia (7,6%) e Rio Grande do Sul (6,7%), lideram os abates, com 77,5% dos abates no país.

Contudo, para continuar competitiva nacional e internacionalmente, a pecuária precisa acompanhar os avanços tecnológicos disponíveis e investir de modo contínuo em: nutrição animal, recursos genéticos, técnicas de manejo racional; manejo sanitário rigoroso e aplicação das biotécnicas da reprodução animal (OLIVEIRA *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2016).

No sentido contrário, aos índices produtivos, os prejuízos decorrentes por falhas no manejo sanitário dos rebanhos, destaca-se as parasitoses (JONSSON *et al.*, 2010; MENDES, 2011) e a mastite bovina, como as enfermidades que mais oneram os produtores (CAZOTO *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2011; SILVEIRA *et al.*, 2014).

No Brasil as perdas anuais decorrentes das enfermidades parasitárias foram estimadas por Grisi *et al.* (2014) considerando os efeitos negativos do parasitismo sobre a produtividade do gado em relação as perdas de rendimento em produção de leite e ganho de peso, incluindo os seguintes parasitos: nematoides gastrointestinais - US\$ 7,11 bilhões; *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* - US\$ 3,24 bilhões; *Haematobia irritans* - US\$ 2,56 bilhões; *Dermatobia hominis* - US\$ 0,38 bilhões, *Cochliomyia hominivorax* - US\$ 0,34 bilhões e *Stomoxys calcitrans* US\$ 0,34 bilhões, totalizando cerca de US\$ 13,96 bilhões.

Nesse cenário, é oportuno destacar, o uso da nanotecnologia aliada ao desenvolvimento de novas formulações ectoparasiticidas, principalmente aquelas em que há a associação de ativos para que se possa manter o controle e tratamento das infestações por ectoparasitos de ruminantes.

Assim, no presente trabalho foi desenvolvido uma formulação inovadora a partir da associação de Amitraz (amidínico) e Fipronil (fenilpirazól), em nanocápsulas, tendo em vista que formulações isoladas dos fármacos já não são tão eficientes, bem como quando colocadas em uma mesma formulação a estabilidade não se mantém. Possibilitando assim subsidiar os estudos pré-clínicos de desenvolvimento de um produto comercial, com tecnologia de ponta: uso reduzido de ativo com liberação sustentada no sítio alvo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi o desenvolvimento e a obtenção de nanopartículas poliméricas para encapsulação dos fármacos ectoparasiticidas Amitraz e Fipronil, as quais foram utilizadas para o desenvolvimento de um produto inovador e eficaz no controle e combate dos carrapatos.

2.2. Objetivos Específicos

Determinar o Tamanho de Partículas, Índice de Polidispersidade e Potencial Zeta das nanoestruturas.

Avaliar a Estabilidade Físico-Química das Nanoestruturas com Amitraz e Fipronil;

Desenvolver Método Espectro Analítico para Quantificação dos Ativos Amitraz e Fipronil associados as Nanoestruturas Poliméricas.

Desenvolver Método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para Quantificação dos ativos Amitraz e Fipronil associados as Nanoestruturas Poliméricas.

Quantificar e dosar o teor de Encapsulação dos Ativos nas Formulações Isoladas (apenas com Amitraz e apenas com Fipronil), bem como mistas (associação de Amitraz e Fipronil);

Realizar teste “in vitro” para sensibilidade e eficácia do produto teste frente carrapatos (biocarrapatidograma).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Principais enfermidades parasitárias que acometem bovinos

As parasitoses dos animais determinam um significativo entrave para a pecuária nacional, causando redução na produtividade, mortalidade, aumento dos custos de produção, além de gastos com as tentativas de controle (DOMINGUES, 2011, GRISI *et al.*, 2014). O berne (*Dermatobia hominis*), a mosca-do-chifre (*Haematobia irritans*) e o carrapato do boi (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) são considerados os mais importantes ectoparasitas da pecuária bovina brasileira a serem combatidos (SILVA *et al.*, 2010; DOMINGUES, 2011).

A *Dermatobia hominis*, popularmente conhecida como mosca do berne, é um dos ectoparasitos mais problemáticos para a bovinocultura nos países da América Latina (CAMPOS *et al.*, 2017), responsável por miíases furunculosas de bovinos e demais animais domésticos e selvagens, inclusive o homem. Em bovinos, as perdas ocasionadas pelas larvas de *Dermatobia hominis* são traduzidas pela diminuição da produção de leite e de carne e pelo baixo ganho de peso. O couro sofre a desvalorização comercial ou inadequação à industrialização, em decorrência da localização das larvas na região de maior valor industrial (PINTO *et al.*, 2002). Conforme Campos e colaboradores (2017) seu controle nos animais parasitados se dá unicamente através da aplicação de inseticidas.

Outro grande impacto negativo na economia das propriedades produtoras de bovinos é a popular mosca-do-chifre (*Haematobia irritans*), que além de gerar um alto estresse ao animal, reduz a produção de leite e carne, como também pode ser transmissora do Carbúnculo Hemático, Leucose, Anaplasmo e do helminto *Stephanofilaria* sp (TOGNOLLI *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2016). O controle químico ainda é a forma mais utilizada para controle desse ectoparasita (COSTA *et al.*, 2016), através do uso de inseticidas de diversos grupos químicos, aplicados sob a forma *pour on*, tópico local na forma de pó e/ou emulsões, banho de imersão, pulverização e aspersão, oral (bolus) e injetável (TOGNOLLI *et al.*, 2009).

O *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, comumente chamado de carrapato do boi, é a principal espécie de carrapato que compromete a saúde e a produtividade dos bovinos no Brasil (CID, 2012), tornando-se necessária a adoção de medidas de controle. Independente da raça, as infestações por esse parasita são importantes não apenas devido à sua ação espoliativa ou tóxica, como também pela transmissão dos agentes da “Tristeza Parasitária Bovina” (GOMES *et al.*, 2011). Tais danos levam a prejuízos como diminuição do ganho de peso e consequente queda

na produção de carne e leite, mortalidade e redução da qualidade do couro. Os produtos carrapaticidas aplicados por meio de pulverização, imersão, *pour on* ou injetável constituem a principal opção no combate ao carrapato (CID, 2012).

A mosca da bicheira (*Cochliomyia hominivorax*) causadora de miíase principalmente em bovinos, caprinos, ovinos, suínos e outros animais também é um importante ectoparasito patogênico encontrado no Brasil. Sua importância na pecuária de leite e de corte está relacionada em acarretar prejuízos à bovinocultura, principalmente como agente nas miíases umbilicais dos bezerros recém-nascidos, bem como menor rendimento de carcaça, desvalorização comercial do couro bovino, diminuição na produção de leite e nos índices de fertilidade, redução na taxa de conversão alimentar e ganho de peso, podendo levar à morte (MORAIS *et al.*, 2003; TEIXEIRA, 2013). Teixeira (2013) descreve, que tanto na pecuária como na agricultura, o uso de inseticidas é a estratégia convencional no controle da população de tal ectoparasito.

3.2 Fármacos Antiparasitários

Os métodos químicos, baseados prioritariamente na aplicação de ectoparasiticidas comerciais (piretróides, organofosforados, formamidinas, reguladores de crescimento de insetos, fenilpirazol e lactonas macrocíclicas), biológicos e de manejo têm sido utilizados como forma de controle dessas parasitoses (SILVA *et al.*, 2010; DOMINGUES, 2011). No entanto, no Brasil, o uso de inseticidas cresceu de maneira expressiva nos últimos anos, tornando o país um dos líderes mundiais no consumo dessas substâncias (CUNHA, 2014), também conhecidos como Fármacos Antiparasitários. O presente estudo, revisou de maneira pontual o Amitraz e o Fipronil, visto que, são os ativos presentes na formulação em teste.

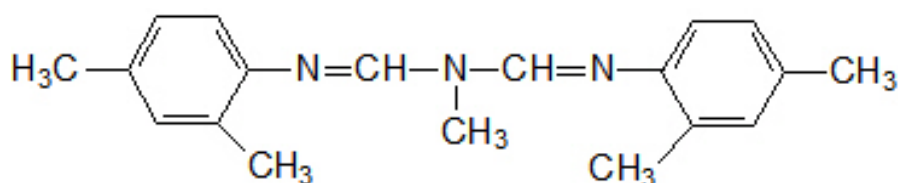
3.3 Amitraz

O Amitraz é uma substância proveniente da família das amidinas, tem ação acaricida e inseticida e é bastante utilizado na agropecuária, desde 1975, como um agente antiparasitário, no controle e combate do carrapato *B. microplus*. Embora ainda seja bastante empregado, atualmente esta molécula já não é tão efetiva, tendo em vista que os parasitos adquiriram resistência (BARRETO *et al.*, 2017). O ativo é utilizado em formulações farmacêutico-veterinárias em concentrações maiores do que aquelas inicialmente usadas, afim de que se possa

obter êxito na utilização do mesmo. A molécula atua inibindo a enzima monoaminoxidase, causando uma paralisia no parasito em questão, o qual se solta do hospedeiro (DEL PINO *et al.*, 2015).

Estrutura química (Figura 1) e principais características físico-químicas do Amitraz, PUBCHEN (2019):

Figura 1 - Estrutura química do fármaco Amitraz e suas principais propriedades físico-químicas.



- Nomenclatura química: N-metilis (2,4-xililiminometil) amina
- Massa Molar: 293,33 g.mol⁻¹
- Forma Física: sólido não cristalino
- Ponto de Fusão: 85°C
- Solubilidade em Água: 3 mg.mL⁻¹ a 30°C
- Solubilidade em outros solventes: acetona, tolueno e xileno
- Degradação: sofre rápida degradação em solos contendo oxigênio (meia-vida de 20 minutos a 1 dia).
- CAS: 33089-61-1

Fonte: PUBCHEN (2019).

Segundo a EPA (*Enviromental Protection Agency*) o Amitraz é classificado como classe III – levemente tóxico, se ingerido oralmente apresenta uma dose letal mediana LD50 (dose letal para 50% da população teste) de 523 a 800 mg.kg⁻¹ em ratos e acima de 1.600 mg.kg⁻¹ em camundongos. Já a exposição dérmica necessita de uma LD50 maior que 1.600 mg.kg⁻¹ em ratos e mais que 200 mg.kg⁻¹ em coelhos. A inalação do amitraz durante 6 horas por ratos, determinou que a concentração letal LC50 (concentração do ativo no ar ou líquido que leva metade da população teste à morte) é de 65 mg.L⁻¹. Irritações e sensibilização da derme não são observadas. Ratos machos e fêmeas tratados com 440 mg.kg⁻¹ e 365 mg.kg⁻¹ respectivamente mostraram sinais de intoxicação aguda como frieza ao toque, redução da atividade espontânea, agressividade e sinais de debilitação geral (DEL PINO *et al.*, 2015).

É oportuno destacar que os produtos veterinários estão passando por importantes mudanças em seu processo de farmacovigilância e regulamentação junto aos órgãos oficiais como MAPA e ANVISA, especialmente, no que se refere aos impactos dos resíduos tanto nas matrizes de origem animal, quanto, nos impactos diretos em saúde pública. Assim em recente reunião do setor, em consonância com o Codex Alimentarius estabeleceu-se como Limite Máximo de Resíduos (LMRs) para o ativo amitraz os seguintes valores: para as matrizes fígado, rim e gordura $200 \mu\text{g.Kg}^{-1}$, enquanto para o leite $10 \mu\text{g.L}^{-1}$. Ainda ficou estabelecido que a Ingestão Máxima Diária (IDA) para humanos deste ativo deve ficar entre 0 e $10 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ (CODEX, 2018).

3.4 Fipronil

O Fipronil é uma molécula de amplo espectro de ação, pertencente a classe dos fenilpirazóis. Ele é o primeiro praguicida com mecanismo de ação atuante especificadamente no Sistema Nervoso Central do inseto através do bloqueio dos canais de cloreto regulados pelos receptores do ácido gama aminobutírico (GABA), resultando em paralisia, convulsões e morte dos parasitos (BARROS *et al.*, 2012).

Embora o GABA seja importante na transmissão nervosa em animais vertebrados e invertebrados, e o Fipronil se ligue ao receptor GABA em vertebrados, a ligação é menos rígida do que nos invertebrados, fato que oferece um grau de seletividade maior para os receptores em invertebrados em relação aos vertebrados (TINGLE *et al.*, 2003).

O Fipronil tem uma ampla margem de segurança (DL50 cutânea em ratos = 2000 mg. Kg^{-1}) e, portanto, é considerado como uma toxicidade mais baixa quando é utilizado em aplicações veterinárias até cinco vezes a dose máxima em cães e gatos, no entanto, houve casos de irritação leve na pele e dos olhos após exposição à droga (VERGARA; DIB, 2015), porem esta irritação pode desaparecer em até 24 horas após a aplicação (JACKSON *et al.*, 2009).

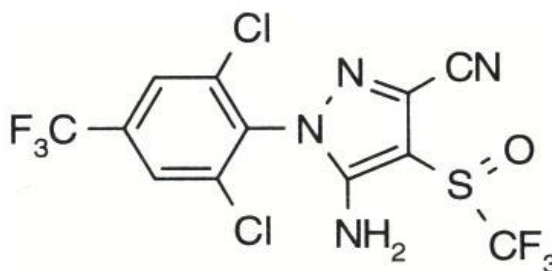
É relevante frisar que os produtos veterinários estão passando por significativas mudanças em seu processo de regulamentação junto aos órgãos oficiais como MAPA e ANVISA. Assim em recente reunião do setor, em consonância com o Codex Alimentarius estabeleceu-se como Limite Máximo de Resíduos (LMRs) para o ativo fipronil os seguintes valores: para as matrizes fígado, rim, gordura $10 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ e para o leite $10 \mu\text{g.L}^{-1}$. Ainda ficou estabelecido que a Ingestão Máxima Diária (IDA) para humanos deste ativo deve ficar entre 0 e $10 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ pelos próximos 2 anos (Comunicação Pessoal, ANVISA, 2019).

Este fármaco é considerado um antiparasitário relativamente seguro aos animais que recebem o produto, na administração tópica. Ela produz toxicidade em artrópodes e mamíferos pelo mesmo mecanismo, no entanto, como a ação sobre o receptor é seletiva, esta toxicidade é muito mais grave em artrópodes do que em mamíferos (VERGARA; DIB, 2015). Nenhum efeito nocivo do uso do Fipronil foi registrado a partir do uso generalizado em animais domésticos e animais de estimação (TINGLE et. al, 2003; PAIN et al., 2011).

Esta molécula, nos últimos anos, vem sendo empregada em formulações farmacêutico-veterinárias, para aplicação em bovinos, dada sua ação não somente no combate a carrapatos do gênero *Boophilus microplus*, larvas de *Dermatobia hominis*, *Haematobia irritans* e larvas de *Cochliomyia hominivorax*. O Fipronil danifica o sistema nervoso central levando o parasito à morte (PAIN et al., 2011).

Estrutura química (Figura 2) e principais características físico-químicas do Fipronil, conforme descrito por PUBCHEN (2019):

Figura 2 - Estrutura química do fármaco Fipronil e suas principais propriedades físico-químicas.



- Nomenclatura química: (RS)-5-amino-1-(2,6-dicloro- α,α,α -trifluoro-p-tolil)-4-trifluoro metil-sulfinilpirazola-3- carbonitrila.
- Massa Molar: 437,15 g.mol⁻¹
- Forma física: pó
- Ponto de fusão: 200,5°C
- Solubilidade em água: 0,02 g em 100 mL de água
- Solubilidade em outros solventes: 0,5 g em 100 mL de acetona
- Classe toxicológica: II
- CAS: 120068-37-3

Fonte: PUBCHEN (2019).

3.5 Nanotecnologia

A Nanotecnologia é definida como o ramo da ciência e engenharia envolvida no *design*, síntese, caracterização e aplicação de materiais e dispositivos em cuja menor organização funcional, em pelo menos uma dimensão, situa-se em escala nanométrica (SAHOO; MISRA; PARVEEN, 2017; CANCINO et al., 2014). Contempla, portanto, a aplicação de técnicas inovadoras, a partir das quais há a possibilidade de se manipular estruturas muito pequenas tendo como resultado a criação de estruturas funcionais, as quais não poderiam ser obtidas através da utilização de tecnologias convencionais (CANCINO et al., 2014).

Atualmente a Nanotecnologia tem importância surpreendente que há alguns anos não se esperava, haja visto os grandes benefícios que pode proporcionar bem como a multiplicidade de áreas que pode atuar (DURÁN; MARCATO; TEIXEIRA, 2011).

Neste contexto, a Nanotecnologia situa-se dentre as principais atividades dos setores de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação, sendo que o investimento anual de países mais desenvolvidos nesta área é da cifra de bilhões de dólares. Além disto, países como China, Brasil e Rússia tem investido significativamente neste setor nos últimos anos (ROSSI – BERGMANN, 2008; CANCINO et al., 2014).

3.5.1 Nanoestruturas

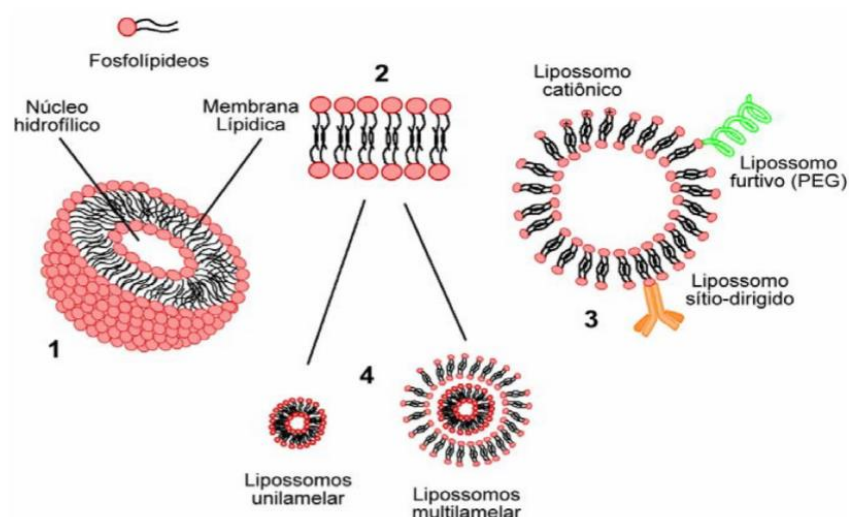
Os lipossomas são, dentre os nanocarreadores de moléculas ativas, os que vêm sendo estudados há mais tempo e, em seguida, foram desenvolvidos os nanocarreadores poliméricos e nanopartículas lipídicas sólidas entre outros (CANCINO et al., 2014). Algumas das nanoestruturas mais utilizadas na liberação sustentada de fármacos e princípios ativos são citadas abaixo:

3.5.2 Lipossomas/Micelas

São dispersões coloidais que apresentam de 5 – 100 nm formadas por moléculas anfifílicas como detergentes, lipídeos ou co-polímeros, possuindo uma ou mais camada dessas moléculas com núcleo lipofílico e casca hidrofílica. Diante disto, as moléculas a serem encapsuladas podem ser tanto lipofílicas, como hidrofílicas (Figura 3). Apresentam boa absorção à derme, pois são utilizados triglicerídeos e fosfolipídios na manufatura dos mesmos,

facilitando assim seu uso tópico. Infelizmente estes sistemas não apresentam boa estabilidade pois, durante a estocagem agregam-se facilmente, além de possuírem baixa resistência mecânica e baixa eficiência de encapsulamento (CASANOVA; SANTOS, 2016).

Figura 3 - 1) Estrutura dos lipossomos constituídos por fosfolípidos. 2) Bicamadas lipídicas. 3) Lipossomos com modificações na superfície (peguilados, com carga e com anticorpos) 4) Tipos de lipossomos de acordo com o número de camadas



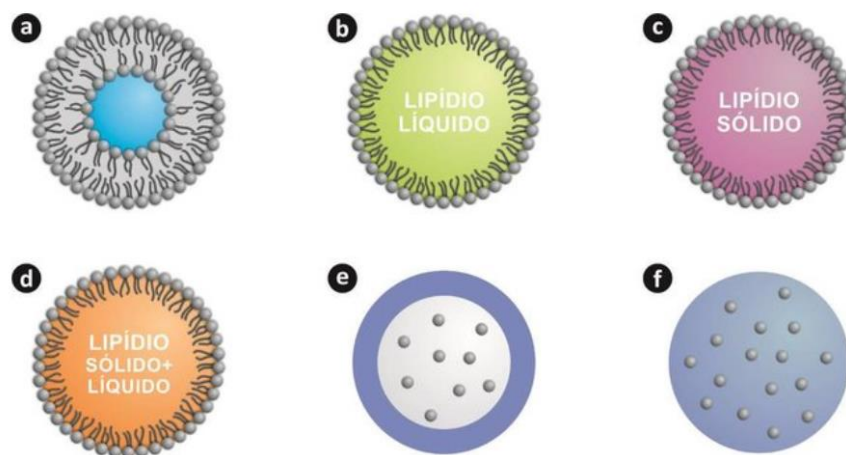
Fonte: Apolinário *et al.*, 2017.

3.5.3 Nanoemulsões

Apresentam tamanho de partículas variável de 20 – 200 nm. São emulsões constituídas de pequenas gotículas de água em óleo ou óleo em água, as quais são estabilizadas por tensoativos e polímeros (Figura 4), são bem aceitas pela maioria dos pesquisadores para a realização de estudos (MCCLEMENTS, 2012). São sistemas translúcidos que podem incorporar tanto ativo lipofílico quanto hidrofílico.

Por ser altamente biocompatível (HE, 2011), pode ser utilizado em várias áreas como a farmacêutica, médica, estética, alimentícia e agroquímica (MCCLEMENTS, 2012). No entanto, sua estabilidade ainda é um grande desafio já que pode variar de algumas horas até anos, dependendo da composição utilizada, além do tempo de liberação do ativo ser bem curto (DELMAS, 2011).

Figura 4 - Desenho esquemático dos sistemas nanoestruturados: (a) nanolipossoma; (b) nanoemulsão; (c) nanopartícula lipídica sólida; (d) carreador lipídico nanoestruturado; (e) nanocápsula e; (f) nanoesfera.



Fonte: Pohlmann *et al.*, 2015.

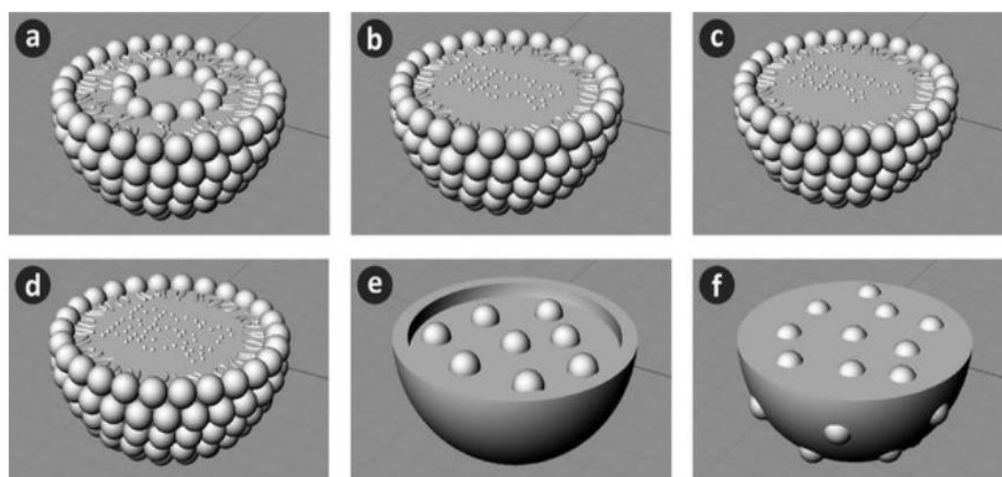
3.5.4 Nanopartículas Lipídicas

São partículas compostas por lipídios e tensoativos e podem ser classificadas em virtude de sua estrutura matricial e do estado físico dos componentes na formulação, sendo: nanopartículas lipídicas sólidas, carreador lipídico nanoestruturado e conjugado fármaco-lipídico (Figura 5). A opção de escolha dentre uma dessas estruturas é influenciada tanto no que se refere a eficiência de controle de liberação, bem como na diversidade de ativos que podem ser encapsulados (FANG; AL-SUWAYEH; FANG, 2013). As nanopartículas de conjugado fármaco-lipídico apresentam maior eficiência no armazenamento de ativos hidrofílicos em detrimento das demais estruturas podendo incorporar mais tais ativos. As nanopartículas de conjugado fármaco-lipídico podem ser obtidas de duas formas diferentes: pela dissolução do ativo e um lipídeo em solvente, seguida de evaporação do mesmo ou pela ligação covalente entre ativo e ácidos graxos formando conjugados, em geral é alcançado até 33% de eficiência na encapsulamento de ativos hidrofílicos (MARCATO, 2009).

Ainda que apresentem uma eficiência pequena comparada a outros sistemas como nanopartículas poliméricas, ainda assim há o interesse na utilização de nanopartículas lipídicas em virtude de sua baixa toxicidade, de 10 a 100 vezes menor que as próprias nanopartículas poliméricas. Além disto, há uma facilidade no escalonamento, bem como uma boa estabilidade

de estocagem. Pode-se citar como exemplos de ativos encapsulados em nanopartículas lipídicas o retinol, a vitamina E e a coenzima Q10 (MULLER, 2007).

Figura 5 - Desenho esquemático dos sistemas de nanopartículas lipídicas: (a) nanolipossoma; (b) nanoemulsão; (c) nanopartícula lipídica sólida; (d) carreador lipídico nanoestruturado; (e) nanocápsula e; (f) nanoesfera.



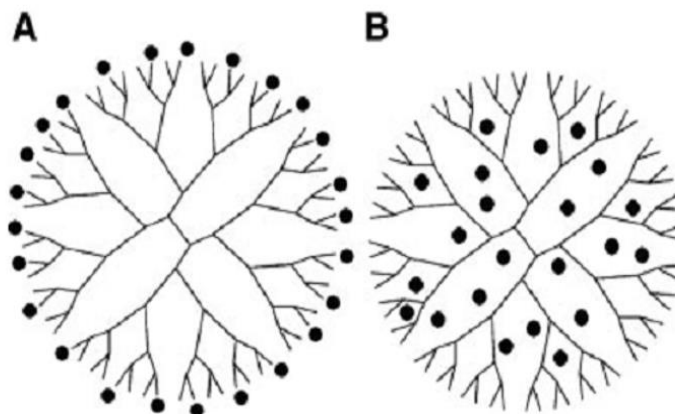
Fonte: Pohlmann *et al.*, 2015.

3.5.5 Dendrímeros

Apresentam tamanho de partícula que varia entre 1 – 100 nm. Possuem peso molecular bem definido e são altamente ramificados, sendo considerados intermediários entre moléculas convencionais e polímeros. Sua estrutura tem como base em uma conformação tridimensional com múltiplas ramificações com o núcleo geralmente composto por uma porção lipofílica e seu exterior por grupos hidrofílicos (HUYNH *et al.*, 2012).

Apresentam-se como nanopartículas promissoras devido ao seu alto controle na forma e tamanho, podendo também mimetizar algumas biomoléculas, o que confere uma compatibilidade biológica adequada, apesar da complexidade da sua síntese (CANCINO *et al.*, 2014).

Figura 6 - Estratégias potenciais para interações entre dendrímeros e moléculas de fármacos



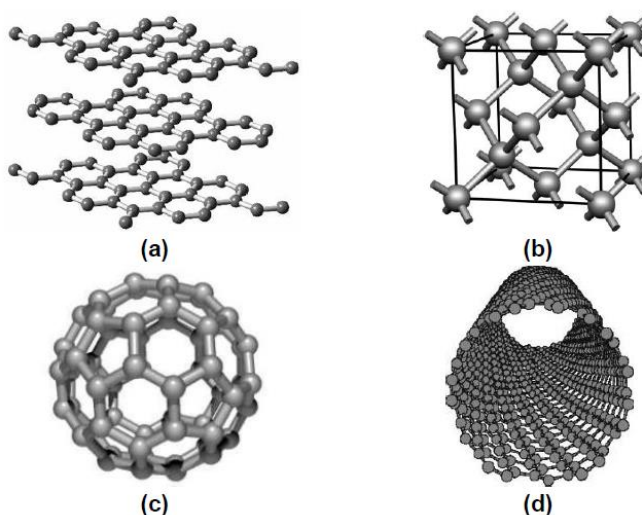
Fonte: Cheng *et al.*, 2008.

3.5.6 Nanotubos/Fulerenos

Podem apresentar-se de duas formas sendo uma estrutura cilíndrica aberta, nanotubo propriamente dito, ou fechada como é o caso dos fulerenos (Figura 7). Os nanotubos podem apresentar-se com parede única ou com multiparedes e podem ser utilizados em diversas áreas devido as suas propriedades térmicas, mecânicas, semi-condutoras e elétricas (CANCINO *et al.*, 2014).

O transporte dos ativos pode ser externo ou interno: externo por meio de funcionalização do nanotubo como foi feito no caso da anfotericina B, ou interna, na qual dependendo da estrutura utilizada teremos uma liberação sustentada e controlada em função do tempo (CHEN *et al.*, 2011).

Figura 7 - Formas alotrópicas do carbono: (a) grafite, (b) diamante, (c) fulereno e (d) nanotubos de carbono.



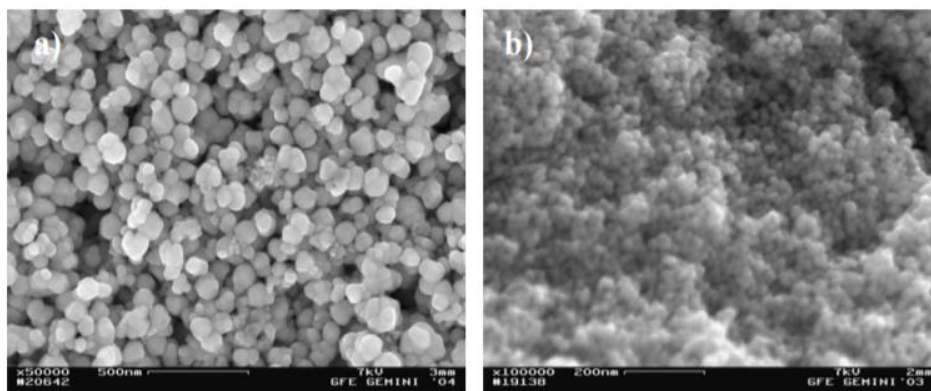
Fonte: Fagan, et al. (2006).

3.5.7 Óxidos nanoestruturados

São o óxido de zinco (ZnO), dióxido de titânio (TiO_2), óxidos de ferro (FeO_3 e FeO), dióxido de silício (SiO_2), podem ser nanoestruturados e algumas argilas, os quais são também conhecidos como nanopartículas cerâmicas (Figura 8). Podem ser obtidos de diversas formas, tamanhos e porosidades. Por apresentarem alta área superficial e uniformidade dos poros e nanopartículas, a utilização destes tipos de materiais vem sendo ampliada. Há vários trabalhos interessante com estas nanoestruturas, dentre os quais podem ser citados o uso de TiO_2 e SiO_2 para carrear moléculas com características lipofílicas tais como o carvedilol (JIANG *et al.*, 2012) e o telmisartan (ZHANG *et al.*, 2010), respectivamente.

No caso do carvedilol a capacidade de encapsulamento ficou acima de 20% massa/massa (m/m) (JIANG *et al.*, 2012). Já no caso do telmisartan a capacidade foi de 60% m/m (ZHANG *et al.*, 2010). Para as argilas há o destaque para o uso das montmorilonita, por apresentarem capacidades detoxificadora e mucoadesiva muito boas.

Figura 8 - Microscopia eletrônica de óxido de zinco nanoestruturado.



Fonte: Koplin et al. (2006).

3.5.8 Nanopartículas Poliméricas

São representadas pelas nanocápsulas e nanoesferas e apresentam tamanho de partícula variando de 10 – 300 nm. Por apresentarem baixa toxicidade devido ao uso de polímeros biodegradáveis, boa reprodutibilidade (Figura 9), e alta capacidade de encapsulamento de compostos lipofílicos, há bastante interesse na utilização destes sistemas (CAI; XU, 2011; PLAPIED *et al.*, 2011). As nanocápsulas tem estrutura constituída por uma membrana polimérica e um núcleo oleoso em que o fármaco pode ficar retido tanto na camada mais externa como no núcleo (SCHAFFAZICK *et al.*, 2005). O diazepam apresenta-se com mais de 80% de eficiência de encapsulamento (KREUTER, 2014) e a dexametasona com valores entre 80 e 90% (FRIEDRICH *et al.*, 2008). A eficiência de encapsulamento é dada pela porcentagem de ativo utilizado na síntese que realmente foi encapsulado (CANCINO *et al.*, 2014).

Já as nanoesferas, apresentam um núcleo sólido composto pela matriz polimérica utilizada. Os polímeros mais utilizados são o poliácido láctico (PLA), poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), poli(cianoacrilatos) (PCA), poli(vinilalcool) (PVA) e poli-ε-caprolactona (PCL) (PLAPIED *et al.*, 2011; SOLARO; CHIELLINI; BATTISTI, 2010).

O processo de síntese das nanopartículas poliméricas sólidas é amplo e pode ser dividido em dois grupos principais: polimerização *in-situ*, na qual são usados monômeros do polímero e o uso das cadeias poliméricas prontas, quando os polímeros são “precipitados” na solução formando as nanopartículas (PINTO REIS *et al.*, 2006; RAO; GECKELER, 2011). Tanto as nanocápsulas quanto as nanoesferas possuem um alto valor de eficiência de encapsulamento de ativos lipofílicos, dentre os exemplos o tyrphostin AG 1295 apresentou uma eficiência de 70%

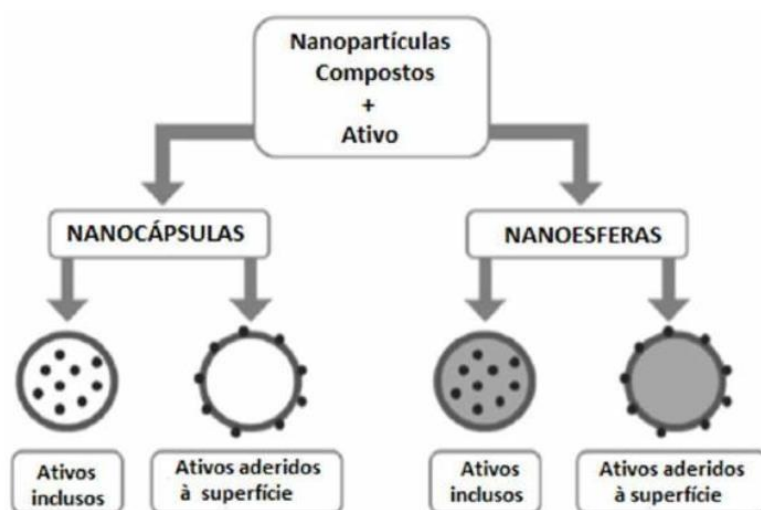
(CHORNY *et al.*, 2002) assim como também a dexametasona com 70% (LO; VAN TASSEL; SALTZMAN, 2010).

Dentre as diferentes nanoestruturas citadas acima, as nanopartículas poliméricas são consideradas como uma promissora estratégia nanotecnológica, em virtude de seus processos de produção simplificados, repetibilidade das nanopartículas, controle das propriedades físico-químicas, baixo custo de produção, alta estabilidade, bom poder de retenção e uma grande variedade de possibilidade de polímeros biodegradáveis a serem usados, já tendo o seu conhecimento muito bem fundamentado (VRIGNAUD; BENOIT; SAULNIER, 2011).

Diante de uma quantidade tão grande de sistemas para a liberação de moléculas ativas, bem como de ativos farmacêuticos disponíveis, aliado ao interesse de muitos países e empresas, os quais investem na pesquisa em nanotecnologia uma imensa quantidade de recursos é inevitável a disponibilidade de inúmeros produtos que contenham sistemas de liberação sustentada nanotecnológicos (CAI; XU, 2011).

No entanto, muitos produtos patenteados ainda não foram colocados no mercado já que os sistemas carreadores estão sempre ligados a fármacos ou moléculas ativas, as quais precisam de aprovações de órgãos competentes como ANVISA, FDA, EMA (Agência Europeia de Medicamentos) entre outras e inúmeros testes clínicos.

Figura 9 - Estrutura das nanopartículas poliméricas: nanocápsulas e nanoesferas.



Fonte: Ferreira et al. (2011).

3.6 Aplicações

3.6.1 Nanotecnologia Farmacêutica

A nanotecnologia farmacêutica é a área das Ciências Farmacêuticas envolvida no desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas terapêuticos em escala nanométrica ou micrométrica (RILLO SATO, 2015, CANCINO *et al.*, 2014).

O grande incentivador para o desenvolvimento de metodologias que se utilizem da nanotecnologia é a possibilidade de produzir moléculas inovadoras, diferentes e com propriedades físicas e químicas incomuns (ROSSI – BERGMANN, 2008, CANCINO *et al.*, 2014). Este desenvolvimento tem demonstrado uma grande possibilidade de aplicações nanotecnológicas multidisciplinares com o objetivo de se obter terapias mais seguras, eficazes, menos invasivas e menos tóxicas, sejam elas para uso humano ou veterinário.

Dentro da área farmacêutica muitos nanomateriais foram desenvolvidos, dentre eles os de liberação sustentada chamados como “Drug Delivery Systems”. Trata-se de fármacos de liberação sustentada, os quais quando comparados a outros de dosagem convencionais podem oferecer diversas vantagens (RILLO SATO, 2015).

Dentre elas a proteção do fármaco contra possíveis instabilidades, manutenção dos níveis plasmáticos, liberação controlada do fármaco, aumento da eficácia, redução de toxicidade, diminuição da instabilidade ou decomposição de fármacos sensíveis, possibilidade de direcionamento da molécula ao sítio alvo, diminuição das doses terapêuticas e do número de aplicações e incorporação de moléculas lipofílicas ou hidrofílicas no dispositivo nanotecnológico, dentre outras (RILLO SATO, 2015).

Ainda que o número de vantagens seja significativo, algumas desvantagens podem ocorrer, como por exemplo: possível toxicidade, incompatibilidade com os materiais utilizados e elevado custo de obtenção dos dispositivos comparados com as formulações convencionais (RAMOS; PASA, 2008).

Muitas são as possibilidades de aplicação de nanoestruturas em terapias e combate a patologias, como por exemplo na área biomédica em que nanopartículas magnéticas tem possibilitado o desenvolvimento de técnicas para o diagnóstico e tratamento de câncer (FALLEIROS, *et al.*, 2010). Por outro lado, na área veterinária, alguns trabalhos vêm sendo desenvolvidos no intuito de se obter novas formas de combate a dor (DOLFINI, *et al.*, 2018).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais

Foram utilizados: balões volumétricos de 10 mL, tubo do tipo Falcon, agitador eletromagnético, barras magnéticas para agitação, proveta de 50 mL, pipeta Pasteur, jaqueta de vidro para tubo do tipo Falcon, reator camisado para fase líquida, balões de fundo redondo, conectores de vidro para rotaevaporação, ponteiros para micropipetador de 1 mL e 5 mL e micropipetadores de 1000 μ L e 5000 μ L.

Todos os solventes utilizados possuíam alto grau de pureza analítica e os reagentes empregados não passaram por quaisquer tipos de tratamento prévio ou modificação química.

Para o preparo de todas as formulações foi utilizada água ultrapura obtida pelo sistema Milli-Q®. Foram utilizados também os seguintes reagentes químicos: Kolliphor P188 (Sigma-Aldrich), tensoativo; Lipoid S100 (Ludwigshafen, Alemanha), fosfatidilcolina para produção das micelas; PGLA 50:50 (Sigma-Aldrich), copolímero utilizado na formação das nanopartículas, acetona (Honeywell), óleo de soja (GAT).

Os ativos farmacêuticos utilizados foram:

- Amitraz: RELYBO PHARMACHEMICAL COMPANY LIMITED 100,0 %
- Fipronil: IPROCHEM COMPANY LIMITED 100,0 %

4.2 Equipamentos

Para a produção das nanocápsulas foi utilizado o rotaevaporador (BUCHI Rotavapor R-124 – Diaphragm Vacuum PL, modelo LGI-DVP-1 – BUCHI Waterbath B-481 – Banho Ultratermostático SL 152 - SOLAB), alocado no Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP.

Além disso, para a análise das características das nanocápsulas produzidas, tais como: tamanho (nm), índice de polidispersão e potencial Zeta foi utilizado o equipamento Zetasizer® modelo Nano ZS90, Malvern, UK do Departamento de Físico-Química do Instituto de Química da UNESP de Araraquara.

Para a determinação dos espectros de absorção foi utilizado o espectrofotômetro UV/Vis de feixe duplo Genesys 10s Thermo Scientific, EUA) também alocado no Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara- UNESP.

Por fim, para o desenvolvimento do método analítico por cromatografia líquida de Alta eficiência, foi utilizado o sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) Shimadzu®, modelo Prominence-i LC- 2030 Plus, conectado a detector de arranjo de diodos 228-65802-58 e injetor automático, controlado pelo Software Lab Solution Multi- PDA e microcentrífuga modelo Heraeus™ Fresco™ 17 – *Thermo Fischer Scientific*, ambos da empresa NOXON DO BRASIL QUÍMICA E FARMACÊUTICA LTDA.

4.3 Métodos

4.3.1 Método para obtenção das nanocápsulas poliméricas de PLGA contendo os ativos Amitraz e Fipronil

Os nanomateriais poliméricos foram preparados conforme o método de deposição interfacial de pré-polímero (Siqueira-Moura et. Al, 2013). Como princípios ativos foram utilizados os fármacos Amitraz e Fipronil de alta pureza. Para obtenção da melhor composição polimérica dos nanomateriais, foram realizados estudos de pré-formulação para escolha da dispersão coloidal mais estável, sendo esta utilizada na realização dos demais experimentos.

A vidraria limpa. A formulação foi preparada com controle de temperatura a 40 °C, para isso foi preciso montar um sistema utilizando banho de aquecimento, sistemas camisados específicos (jaqueta para tubo do tipo Falcon FP50 de fundo cônico e reatores camisados ~150 ml) para tal função e bases de agitação magnética.

O preparo da fase orgânica deu-se da seguinte maneira: dissolveu-se 0,075g de PLGA (50:50) em 5,0 mL de acetona em um balão volumétrico de 10 mL, sob agitação magnética moderada (velocidade de 250 rpm ou velocidade 5). Em um tubo Falcon de 50 mL inserido em uma jaqueta termostatizada com banho a 40°C dissolveu-se 0,175g de Lipoid S100 (fosfatidilcolina) em 9,0 mL de acetona sob agitação magnética moderada (com velocidade de 250 rpm). Após completa solubilização do Lipoid S100 adicionou-se o ativo na concentração indicada (previamente solubilizado em 1,0 mL de acetona) sob agitação e banho 40°C após a dissolução adicionou-se 250 µL de óleo de soja.

Em seguida, foi adicionado ao Falcon o PLGA (50:50) já dissolvido como descrito anteriormente (0,075 g em 5,0 mL de acetona). Aguardou-se a homogeneização por 20 minutos, mantendo-se as condições de agitação (250 rpm) e temperatura (40°C).

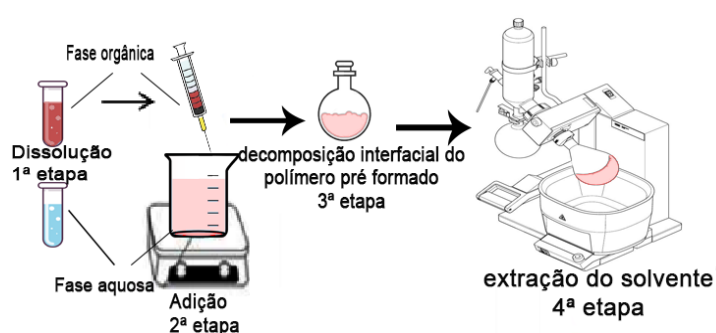
Para o preparo da fase aquosa, dissolveu-se 0,125 g de Kolliphor 188 em 30 mL de água ultrapura sob agitação magnética moderada a 250 rpm, diretamente no reator termostaticado a 40°C.

Após completa dissolução, adicionou-se sob gotejamento lento, com auxílio de pipeta de Pasteur, toda fase orgânica sobre a aquosa (1 gota por segundo, aproximadamente). Aguardou-se 20 minutos para fase de homogeneização, mantendo condições de temperatura e agitação anteriormente citadas. O produto final foi transferido para um balão de fundo redondo, o qual foi levado imediatamente para extração do solvente orgânico pelo processo de rotaevaporação.

Com o auxílio de um evaporador rotativo acoplado à um banho a 54 °C e rotação de 50 a 125 rpm, evaporou-se primeiramente a acetona e logo após a água residual, obtendo-se um volume final de 10 mL de formulação.

O armazenamento das formulações ocorreu em temperatura ambiente e em refrigerador (4-7°C) em frascos isolados de luz e fechados hermeticamente. As análises foram realizadas de maneira periódica afim de se determinar e avaliar suas propriedades físico-químicas, como tamanho de partícula, potencial Zeta, e índice de polidispersão (PDI).

Figura 10 – Esquema representativo das etapas de síntese das nanocápsulas de PLGA contendo os ativos Fipronil e/ou Amitraz.



Fonte: Amantino, (2019).

4.3.2 Espectroscopia de Absorção no UV-Visível para o Amitraz e Fipronil Livres e Nanoencapsulados

Os espectros de absorção de Amitraz e Fipronil em meio homogêneo de acetonitrila foram obtidos como parte da caracterização espectroscópica. Os espectros foram obtidos

utilizando-se cubetas de quartzo com 1,0 cm de caminho óptico e para as análises de absorção foi utilizado o espectrofotômetro UV/Vis de feixe duplo Genesys 10s da Thermo Scientific. O solvente utilizado foi acetonitrila e os comprimentos de onda para Amitraz e Fipronil foram obtidos na região de 200 a 800 nm.

4.3.3 Desenvolvimento de Método Espectro Analítico para Quantificação dos Ativos Amitraz e Fipronil Isolados e Associados as Nanopartículas

A linearidade é a capacidade do método de apresentar resultados diretamente proporcionais a concentração do analito presente na amostra.

Dessa forma as análises de regressão linear foram realizadas construindo um gráfico densidade óptica *versus* concentração do Amitraz e Fipronil em mg.mL^{-1} para a curva por espectroscopia de absorção no UV-visível.

Para obtenção da curva, foi preparada inicialmente uma solução estoque a partir de 0,005 g de Fipronil e de Amitraz, ambas em 10 mL de acetonitrila (ACN). Para o preparo das soluções de diferentes concentrações foi utilizado o método de diluições sucessivas, utilizando-se de cubeta de quartzo com 1,0 cm caminho óptico, contendo 2,0 mL de ACN, adicionando-se frações da solução estoque empregando-se uma micropipeta (*Eppendorf*) de 10 μL para obter as concentrações desejadas para o ativo Amitraz (0,20 a 0,70 mg.mL^{-1}) e para o ativo Fipronil (0,02 a 0,08 mg.mL^{-1})

Para estabelecer as linearidades dos métodos propostos foram construídas três curvas de calibração em seis níveis diferentes de concentrações, variando de 10 a 20 μL para Amitraz e 2 a 20 μL para Fipronil.

A análise estatística de regressão ou ajuste por mínimos quadrados foi feita para todos os dados obtidos em triplicata ($n = 3$).

4.3.4 Determinação do Tamanho de Partículas, Índice de Polidispersidade e Potencial Zeta

Para caracterização físico-química, foram avaliados o tamanho de partícula (diâmetro hidrodinâmico) e o potencial Zeta (mV) das nanocápsulas sem ativos (vazias) e na presença dos princípios ativos em formulação isolada e mista (Amitraz e Fipronil). Para a realização das análises foi utilizado o analisador Zetasizer. As amostras ($n=3$) foram preparadas diluindo 20

μL de formulação em 2 mL de água ultrapura diretamente em uma cubeta de poliestireno com 1,0 cm de caminho óptico. Para determinação do potencial Zeta foi utilizada uma célula eletrolítica específica modelo DTS1070 (Malvern Instruments).

4.3.5 Avaliação da Estabilidade Físico-Química das Nanoestruturas com Amitraz e Fipronil

A estabilidade físico-química da formulação foi avaliada periodicamente, através das avaliações da manutenção do tamanho de partícula, índice de polidispersão e do potencial Zeta das nanocápsulas por um período mínimo de 90 dias, em armazenamento na temperatura de 4 – 7 °C. Para as amostras a temperatura não foram realizadas análises tendo em vista que as mesmas não apresentaram estabilidade na primeira semana após formuladas.

4.3.6 Análise físico-química para identificação e quantificação dos ativos Amitraz e Fipronil livres (não encapsulados) e encapsulados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD)

Para a identificação e quantificação do método analítico (desenvolvido no Laboratório de Controle de Qualidade da Noxon do Brasil Química e Farmacêutica Ltda) a curva analítica foi construída através do preparo dos seguintes padrões:

- **Solução estoque de Fipronil - SM1 (1,25 mg.mL⁻¹ de Fipronil)**

Para um balão de 10 mL, foi transferido 12,5 mg do padrão de Fipronil e adicionou-se 5,0 mL de DMSO. Homogeneizou-se com o auxílio de um banho de ultrassom por 10 minutos ou até completa solubilização. Após a amostra atingir a temperatura ambiente, foi completado o volume do balão volumétrico com o mesmo solvente orgânico.

- **Solução estoque de Amitraz – SM2 (1,25 mg.mL⁻¹ de Amitraz)**

Para um balão de 10 mL, foi transferido 12,5 mg do padrão de Amitraz e adicionou-se 5,0 mL de DMSO. Homogeneizou-se com o auxílio de um banho de ultrassom por 10 minutos ou até completa solubilização. Após a amostra atingir a temperatura ambiente, foi completado o volume do balão volumétrico também com o mesmo solvente orgânico.

Em balão volumétrico de 10 mL, foi pipetado os seguintes volumes das soluções estoque (SM-01 e SM-02) indicados na tabela abaixo, e completando-se o volume do balão com DMSO.

Agitou-se com vórtex até total homogeneização, e consecutivamente foram realizadas as análises cromatográficas em HPLC.

Tabela 1- Padrões para obtenção da curva padrão de calibração por HPLC

Padrão	Proporções de soluções estoque	Concentração do ativo Fipronil ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração do ativo Amitraz ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Padrão 1	192 μL SM-01 + 640 μL SM-02/ 10 mL DMSO	24,00 de Fipronil	80,00 de Amitraz
Padrão 2	216 μL SM-01 + 720 μL SM-02/ 10 mL DMSO	27,00 de Fipronil	90,00 de Amitraz
Padrão 3	240 μL SM-01 + 800 μL SM-02/ 10 mL DMSO	30,00 de Fipronil	100,00 de Amitraz
Padrão 4	264 μL SM-01 + 880 μL SM-02/ 10 mL DMSO	33,00 de Fipronil	110,00 de Amitraz
Padrão 5	288 μL SM-01 + 960 μL SM-02/ 10 mL DMSO	36,00 de Fipronil	120,00 de Amitraz

O preparo das amostras foi realizado transferindo para um balão volumétrico de 10 mL 1000,0 mg da amostra e aproximadamente 5 mL de DMSO. A amostra foi homogeneizada com o auxílio de um banho de ultrassom por 10 minutos. Após a amostra atingir a temperatura ambiente, o volume do balão volumétrico foi completado com DMSO. Em seguida, a solução foi homogeneizada e filtrada em membrana de 0,45 μm e analisada por HPLC.

Para as análises foram utilizadas as seguintes condições cromatográficas:

- Fase Móvel: Acetonitrila:Água Ultrapurificada 80:20 (%v/v).
- Fase Estacionária: Gemini C18 (25 cm x 4,6 mm - 5,0 μm).
- Vazão: 1,3 mL.min^{-1} .
- Volume de Injeção: 20 μL .
- Detector de Ultra-Violeta (ou DAD).
- Comprimento de Onda: 285 nm.
- Temperatura da Coluna: 30 $^{\circ}\text{C}$.
- Tempo de retenção: 3,7 minutos para o ativo Fipronil e 11,0 minutos para o ativo Amitraz.
- Tempo de Corrida: 15,0 minutos.

4.3.7 Quantificação e Teor de Encapsulação dos Ativos nas Formulações Isoladas e Mistas

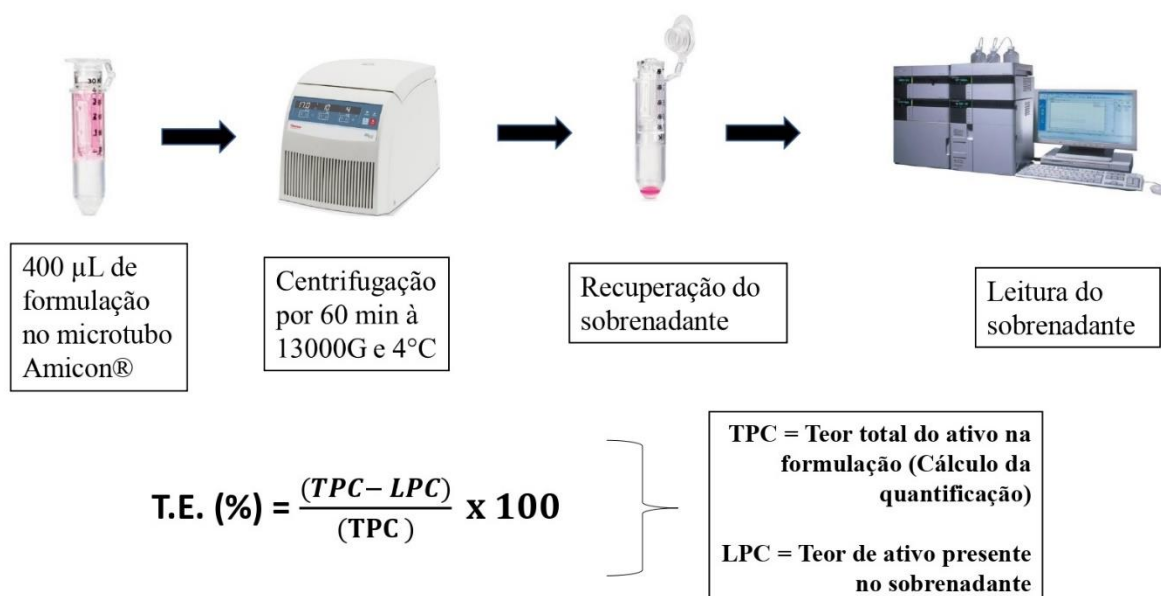
Para a quantificação e teor de encapsulação das nanocápsulas isoladas e mistas foi utilizado o método analítico desenvolvido no item 4.3.6 (CLAE-DAD), para identificação e quantificação dos ativos Amitraz e Fipronil livres (não encapsulados) e encapsulados.

Os teores de encapsulação (T.E.) dos ativos Amitraz e Fipronil, tanto não encapsulados e encapsulados, foram calculados mediante a correlação entre a quantidade total do ativo presente na formulação (cálculo de quantificação) e a concentração dosada no sobrenadante, de acordo com a Equação 1 demonstrada a seguir:

$$\text{T. E. (\%)} = \frac{(\text{TPC} - \text{LPC})}{(\text{TPC})} \times 100$$

Em que TPC representa a concentração total do ativo na formulação e LPC a concentração do ativo presente no sobrenadante da amostra, após submeter à centrifugação para total separação. Para tanto, foi utilizado um microtubo para centrifugação e microseparação, modelo Amicon® Ultra – 0,5 mL com filtro 30 kDa para reter as nanocápsulas, e permitir a passagem da fase aquosa externa para além do filtro, resgatando-a como sobrenadante no fundo do microtubo. A centrifugação ocorreu por 60 minutos a 13.000G (10.774 rpm) e 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi analisado pelo método analítico pré-estabelecido em HPLC.

Figura 11 – Esquema representativo das etapas de extração do TPC e LPC.



4.3.8 Biocarrapaticidograma para a formulação de Amitraz e Fipronil em Nanocápsulas Poliméricas

4.3.8.1 Local

Laboratório de Parasitologia da UNIFRAN
Dep. de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal
Av. Dr. Armando Salles Oliveira, 201 - Pq. Universitário
Franca -SP / CEP: 14404-600.

4.3.8.2 Normas e Procedimentos

Os valores obtidos pelos testes eficácia acaricida *in vitro* contra fêmeas ingurgitadas (Teste de Imersão de Adultas - TIA) de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* foram analisados com base os estudos descritos por DRUMMOND et al. (1973) e LEITE (1988).

4.3.8.3 Princípios Ativos

As concentrações de princípios ativos empregadas para obtenção do biocarrapaticidograma foram: 0,001 g.mL⁻¹ de Amitraz e 0,0003g.mL⁻¹ de Fipronil.

4.3.8.4 Carrapatos

Os carrapatos utilizados nos testes são oriundos de bovinos mestiços (*Bos indicus* x *Bos taurus*).

4.3.8.5 Parasitos testados

Foram utilizados exemplares de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* de uma mesma estirpe, provenientes de colônia isolada e mantida no Laboratório de Parasitologia da UNIFRAN – UNIVERSIDADE DE FRANCA e no sítio experimental do laboratório *Science Vet.*

4.3.8.6 Estudo *in vitro* para a determinação da eficácia acaricida contra fêmeas de R. (B.) microplus ingurgitadas - TIAN

Para a realização do estudo *in vitro* foram utilizadas fêmeas ingurgitadas, pertencentes a uma mesma estirpe de *R.(B.) microplus* isolada e mantida na UNIFRAN e no sítio experimental da *Science Vet*, cultivadas em bovinos.

As fêmeas ingurgitadas, após desprenderem-se de bovinos, foram recolhidas e lavadas em água destilada, secas em papel toalha, e selecionadas sem qualquer anomalia ou mutilação visível.

Para cada um dos grupos experimentais (grupos tratados com as formulações testadas) foram selecionadas 10 fêmeas, agrupadas pelo peso, sendo em seguida imersas em 10 mL contendo as formulações acaricidas (grupos tratados) e/ou água destilada (grupo controle), durante cinco minutos, utilizando-se copos de vidro estéreis.

Decorrido este tempo, os grupos de fêmeas ingurgitadas foram recolhidos e o excesso de solução retirado com papel toalha.

Posteriormente, as fêmeas foram fixadas com fita adesiva dupla face, em placa de Petri devidamente identificadas e mantidas em estufa B.O.D. em condições adequadas para a manutenção e ovoposição dos parasitos.

Para o cálculo da eficácia para adultas (TIA) foi determinado o percentual de mortalidade.

Para isto foram contadas carrapatos vivos e mortos após o tratamento com as diferentes fórmulas. Carrapatos sem capacidade de locomoção foram consideradas mortas (DRUMMOND *et al.*,1973).

4.3.8.7 Eficácia acaricida contra fêmeas e eficácia reprodutiva quanto eclosão de ovoposição de fêmeas de R.(B.) microplus ingurgitadas - TIA TIAN

Na Tabela 2 estão demonstrados os delineamentos experimentais realizado para cada uma das formulações testadas.

Tabela 2 - Delineamento experimental realizado no TIA

GRUPO DE TRATAMENTO	Amostra	Nº DE Teleóginas	Número de Repetições	Grupo
I	Água	10	3	CONTROLE (água destilada)
II	Nanocápsulas (Amitraz +Fipronil)	10	3	TRATADO
III	Amitraz livre* 12,5%	10	3	TRATADO

Fonte: Autores. *ativo não encapsulado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

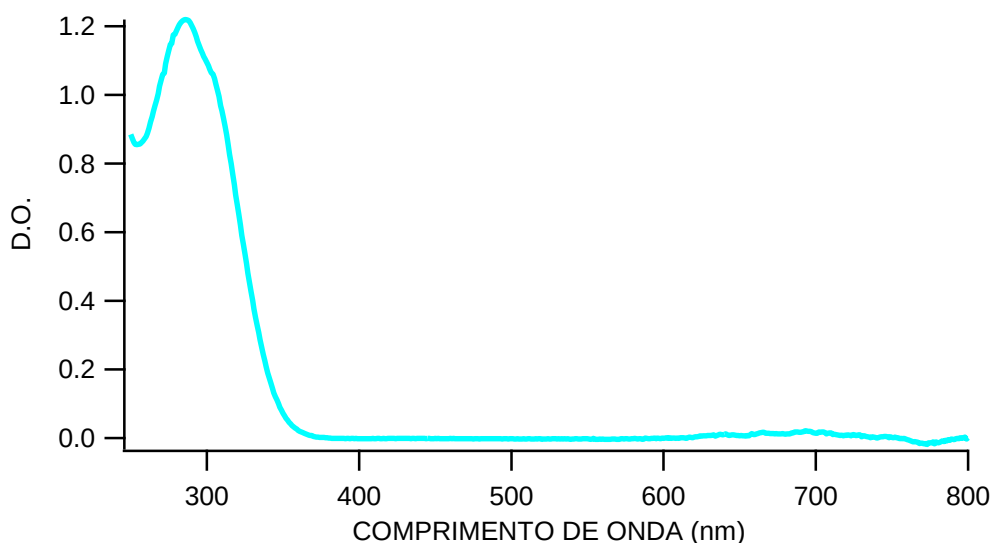
5.1 Espectroscopia de Absorção no UV-Visível para Amitraz e Fipronil livres e nanoencapsulados

Foram realizados os estudos de espectroscopia no estado estacionário para que fosse determinado o perfil do espectro de absorção de Amitraz e Fipronil livres. Os ensaios foram conduzidos utilizando-se a técnica de espectroscopia de absorção no UV-Visível, conforme Figuras 11 e 12.

Durante o desenvolvimento dos estudos foram utilizados vários solventes, dentre eles dimetil-sulfóxido, metanol, acetona e acetonitrila. O solvente escolhido para as análises foi a acetonitrila, pois além de promover uma fácil solubilização dos ativos não apresentou qualquer tipo de influência sobre o máximo de absorção.

A Figura 11 representa o perfil característico da banda de absorção do Amitraz em meio homogêneo, com máximo de absorção em 280 nm. Já a Figura 12 representa o espectro de absorção para o Fipronil, com máximo de absorção centrado em 286 nm. Ambos espectros estão localizados na região do UV-visível, como esperado para a classe de compostos em estudo. Portanto, a partir do estudo de espectroscopia UV-Vis foi possível avaliar o melhor ambiente químico para os compostos químicos, bem como elucidar suas bandas de absorção localizadas na região próxima do UV no espectro-eletromagnético.

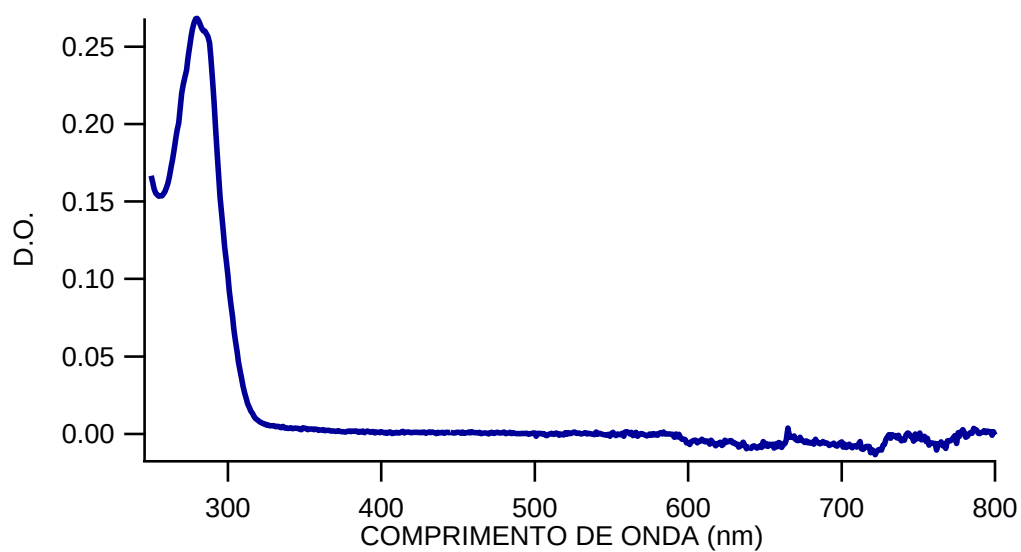
Figura 12 - Espectro de absorção no UV/VIS de Amitraz/acetonitrila na concentração de $0,01\text{mg.mL}^{-1}$.



Fonte: Autores.

Na Figura 13 temos os espectros de absorção para ambos os fármacos no solvente orgânico empregado no estudo espectroscópico. A normalização do gráfico auxilia na interpretação de possíveis efeitos de deslocamento de bandas devido efeitos do ambiente químico utilizado e também pode auxiliar na comparação entre os máximos de absorção de diferentes compostos. Pela Figura 7 temos a evidência da sobreposição de bandas de absorção na região do UV do espectro-eletromagnético o que sugere uma limitação quanto a possibilidade de aplicação da técnica para análise quantitativa para uma amostra contendo os ambos fármacos simultaneamente. Sendo assim, os estudos subsequentes de determinação de método espectro-analítico limitam-se a determinação dos ativos nanoencapsulados separadamente.

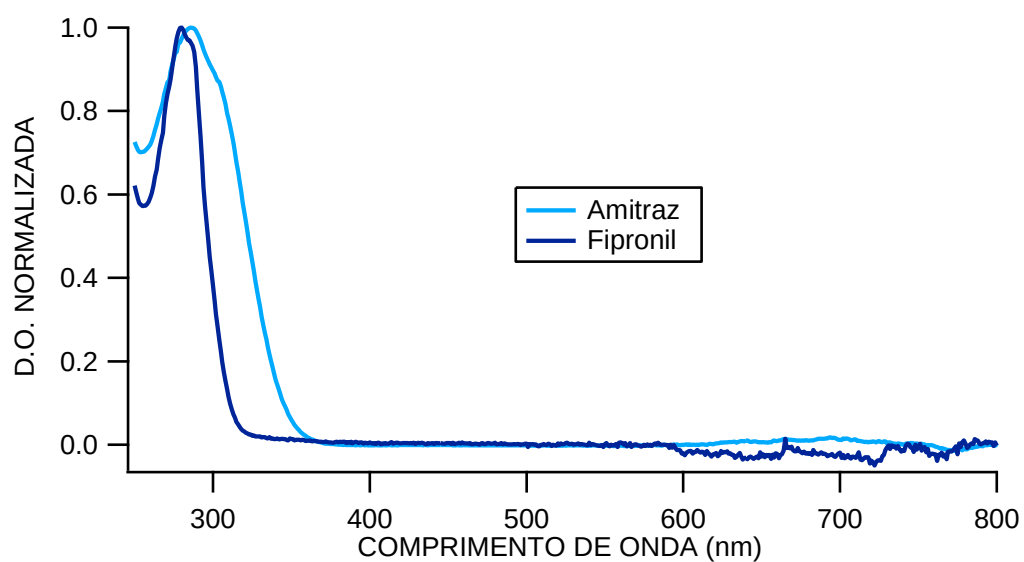
Figura 13 - Espectro de absorção no UV/VIS de Fipronil/acetonitrila na concentração de $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$.



D.O.: densidade óptica

Fonte: Autores.

Figura 14 - Espectro de absorção normalizado no UV/VIS de Amitraz e Fipronil em ACN.

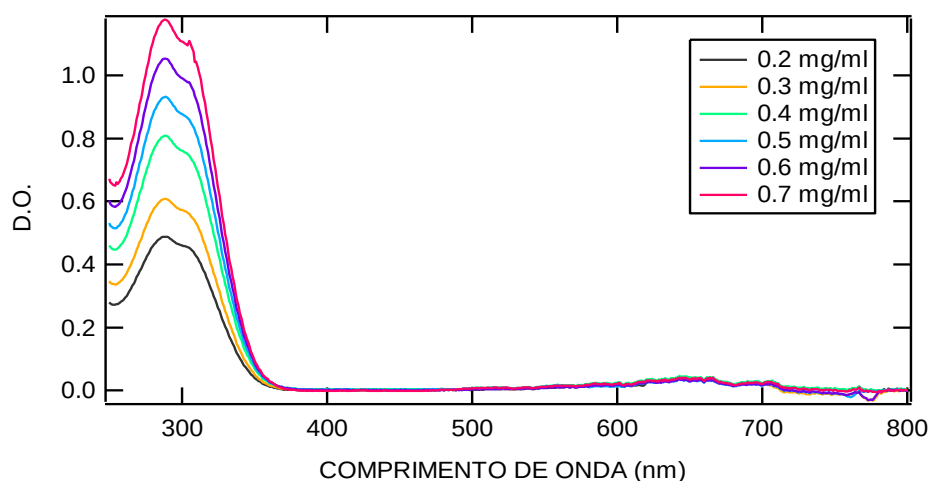


Fonte: Autores.

5.2 Desenvolvimento de Método Espectro-Analítico para Quantificação dos ativos Amitraz e Fipronil associados as Nanocápsulas Poliméricas

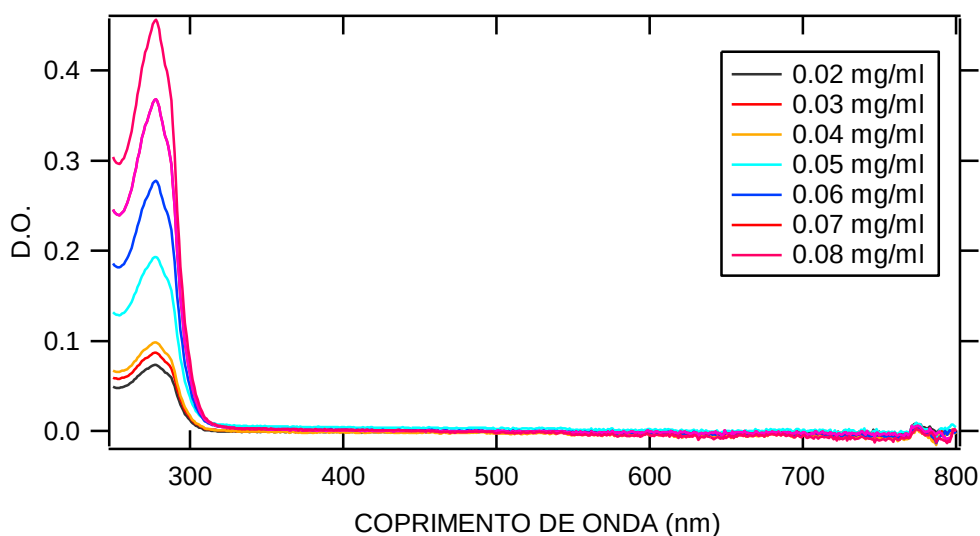
As análises de regressão linear foram realizadas correlacionando a absorbância em função de diferentes concentrações de Amitraz e Fipronil dissolvidos em ACN, conforme demonstrado nas Figuras 15 e 16, respectivamente que apresentam as bandas de absorção obtidas pela análise de varredura para cada concentração utilizada.

Figura 15 - Conjunto de espectros de absorção no UV-VIS de Amitraz em Acetonitrila em diferentes concentrações ($0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ – $0,7 \text{ mg.mL}^{-1}$).



Fonte: Autores.

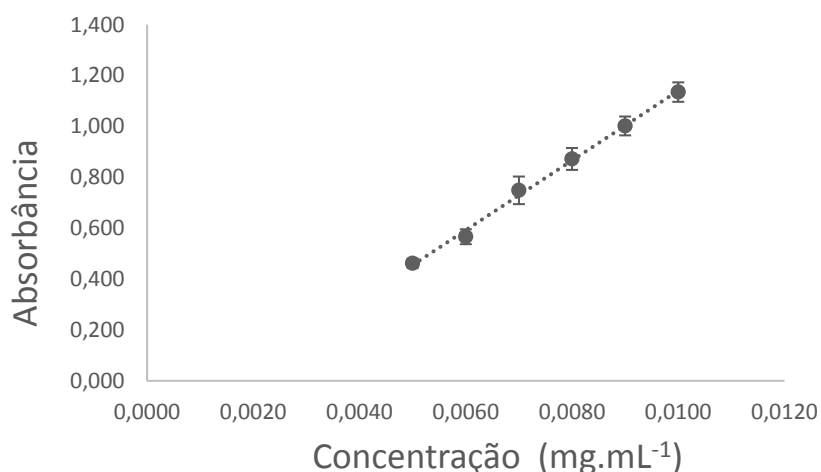
Figura 16 - Conjunto de espectros de absorção no UV – VIS de Fipronil em acetonitrila em diferentes concentrações ($0,02 \text{ mg.mL}^{-1}$ – $0,08 \text{ mg.mL}^{-1}$).



Fonte: Autores.

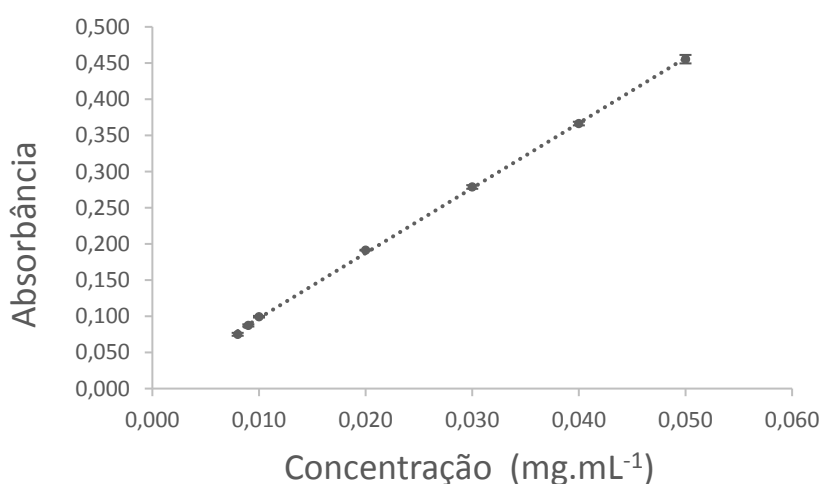
O ajuste por mínimos quadrados para o método espectrofotométrico revelou um excelente coeficiente de determinação (R^2), tanto para o Amitraz quanto para o Fipronil, conforme demonstrado nas Figuras 17 e 18 respectivamente.

Figura 17 - Curva padrão de calibração por correlação entre absorção máxima em função da concentração de Amitraz na faixa de $0,005 \text{ mg.mL}^{-1}$ – $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$ ($n = 3$). $y = 136,93x - 0,2294$.



Fonte: Autores.

Figura 18 - Curva de correlação padrão de calibração por absorção máxima em função da concentração de Fipronil na faixa de $0,008 \text{ mg.mL}^{-1}$ – $0,050 \text{ mg.mL}^{-1}$ ($n = 3$). $y = 8,9881x + 0,0075$.



Fonte: Autores.

Portanto, a partir dos resultados obtidos nos ensaios espectro-analíticos, foi possível determinar curvas padrão de calibração para quantificação dos fármacos em questão nanoencapsulados. Esta é uma vantagem interessante do ponto de vista analítico como proposta

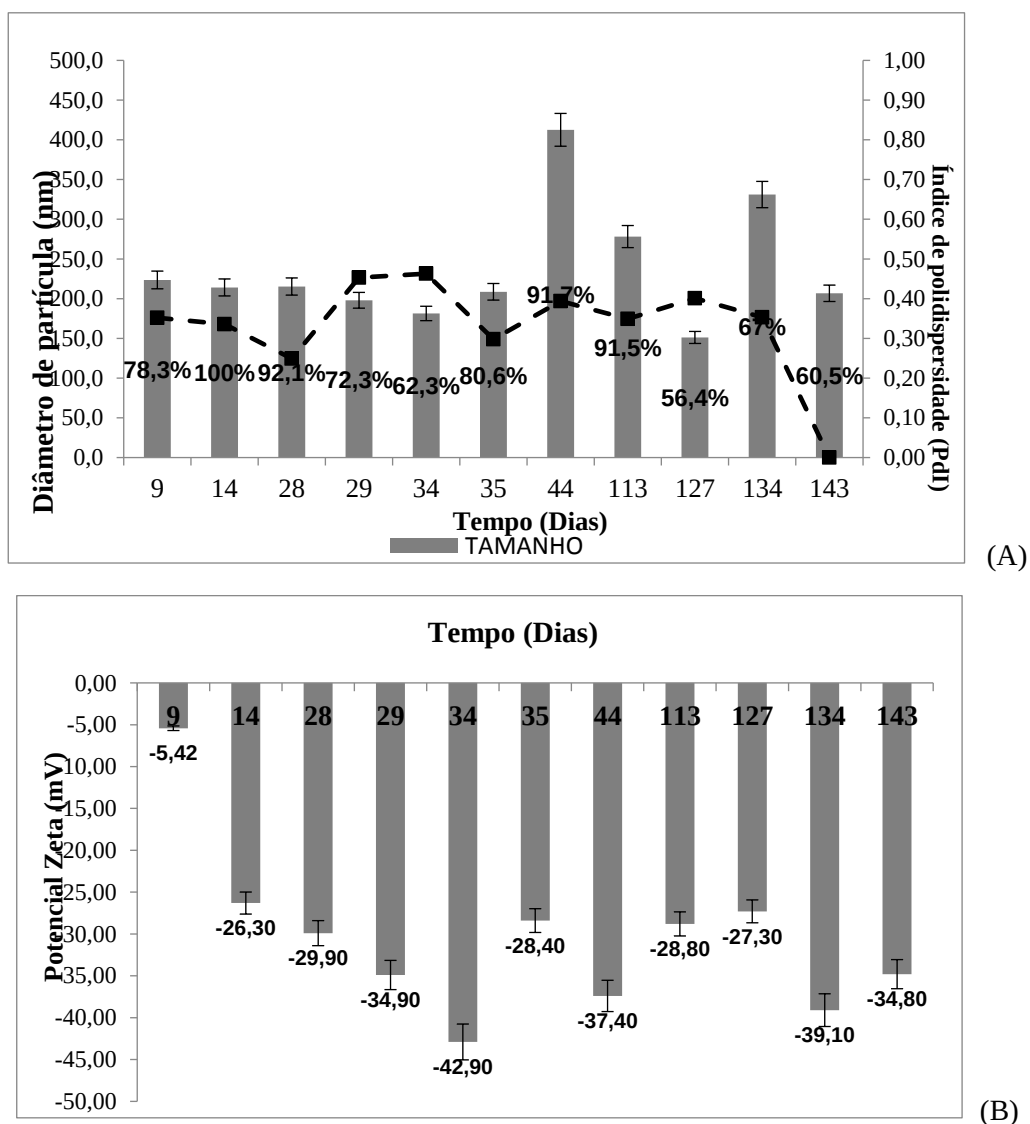
de método alternativo para possíveis ensaios de desenvolvimento de formulações farmacêuticas e aplicação no controle de qualidade na indústria de medicamentos. Além disso é possível prever a concentração real de cada ativo, previamente aos testes biológicos subsequentes, ponto de extrema importância e necessário no desenvolvimento de novos medicamentos.

5.3 Determinação do Tamanho de Partículas, Índice de Polidispersidade e Potencial Zeta

Periodicamente, por um período de até 150 dias, as formulações foram avaliadas e os resultados obtidos estão organizados nas Figuras 19, 20, 21 e 22 a seguir. Os dados referem-se as formulações armazenadas sob refrigeração (4 a 7° C).

Na figura 19, nanocápsulas sem ativo encapsulado, foi observada uma linha de tendência na distribuição dos tamanhos das partículas na faixa de 200 nm o que demonstrou que as mesmas apresentaram um perfil característico dos nanomateriais poliméricos. Já o índice de polidispersidade, o qual é um dado complementar, apresentou um valor médio entre 0,3 e 0,4, o que demonstra que as partículas estão mono dispersas, característica importante para os nanomateriais. Para os dados de Potencial Zeta, o qual indica a carga de superfície da partícula, apresentaram valores médios entre – 30 e – 40 mV, região que demonstra que a carga de superfície das partículas permanecem em uma região de maior estabilidade, Esta estabilidade favorece a não ocorrência de efeitos físicos como precipitação e agregação do material.

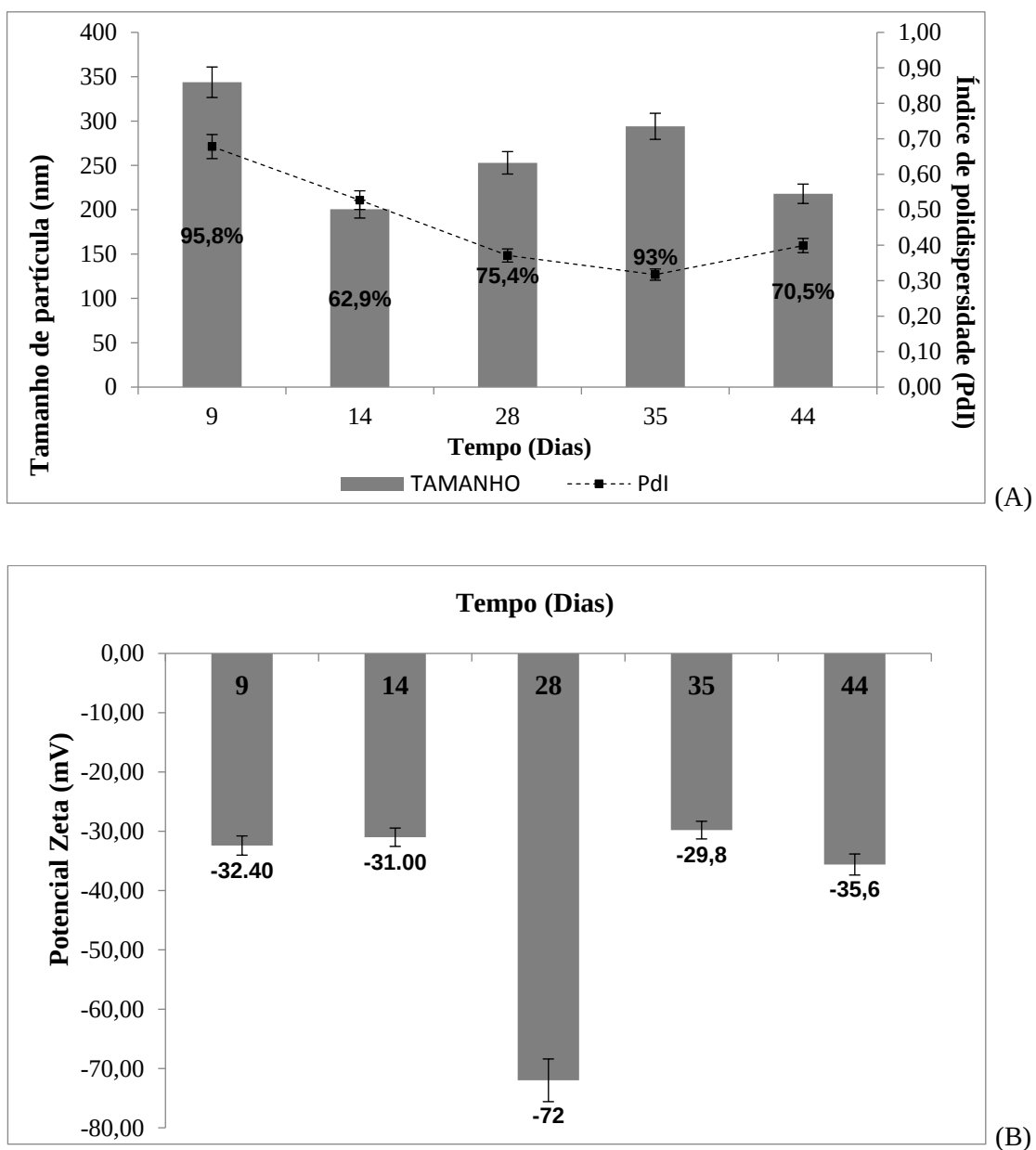
Figura 19 - Estudo de estabilidade físico-química em função do tempo para a formulação de nanocápsulas de PLGA na ausência dos princípios ativos: determinação de tamanho de partícula e PDI (A) e Potencial Zeta (B).



Fonte: Autores.

Para as nanocápsulas com ativo foi observado que a Figura 18, Amitraz a 0,05 %, o tamanho médio das partículas obtidas encontra-se dentro do padrão característico dos nanomateriais poliméricos. Já o índice de polidispersidade demonstrou uma distribuição adequada das partículas e o Potencial Zeta apresentou-se dentro da região de estabilidade do material.

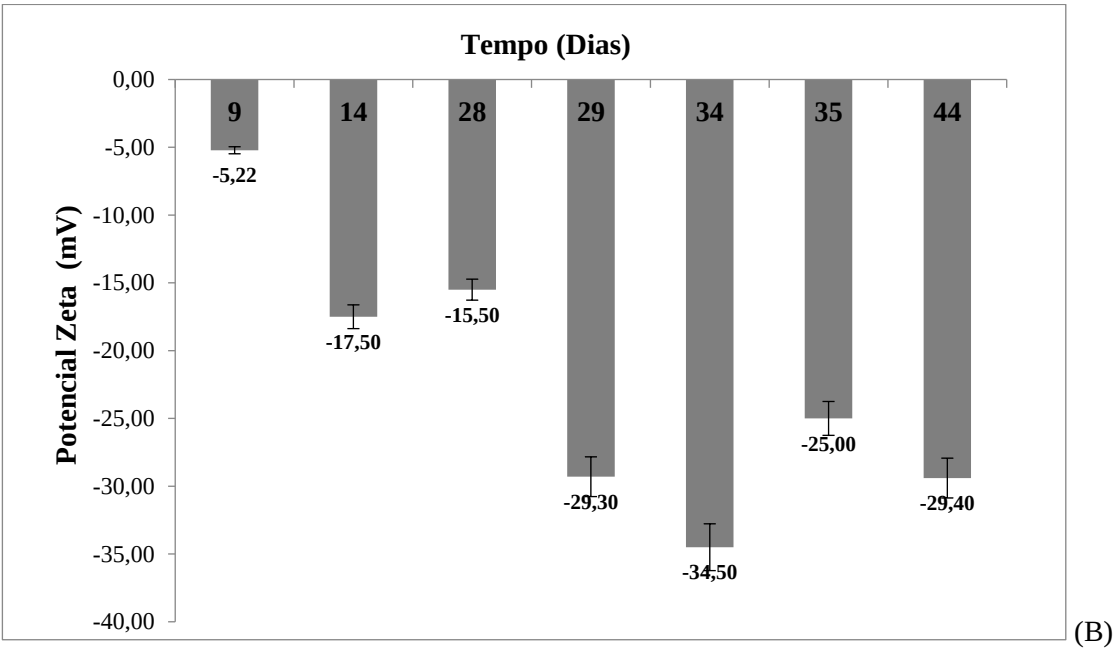
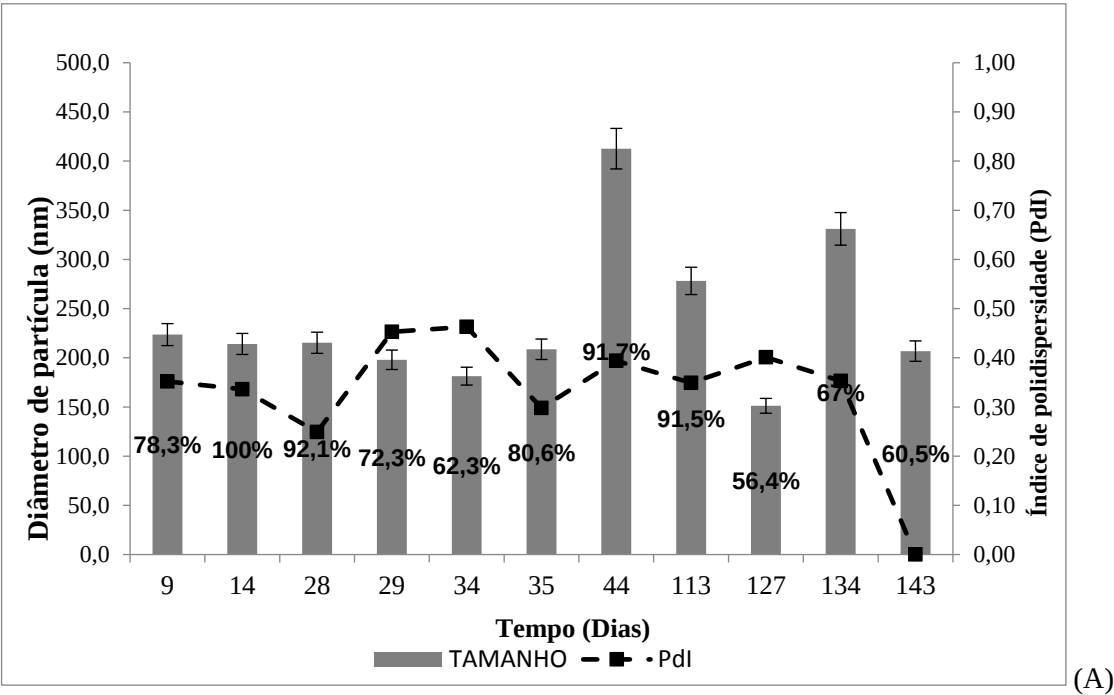
Figura 20 - Estudo de estabilidade físico-química em função do tempo para a formulação de nanocápsulas de PLGA com Amitraz na concentração de 0,05 %: determinação de tamanho de partícula, e PDI (A) e Potencial Zeta (B).



Fonte: Autores

Para avaliar a possibilidade de algum tipo de interferência na estabilidade dos nanomateriais foi produzida uma formulação com o dobro do ativo Amitraz (0,10 %), Figura 19, onde foi observado que as características das partículas se mantiveram estáveis.

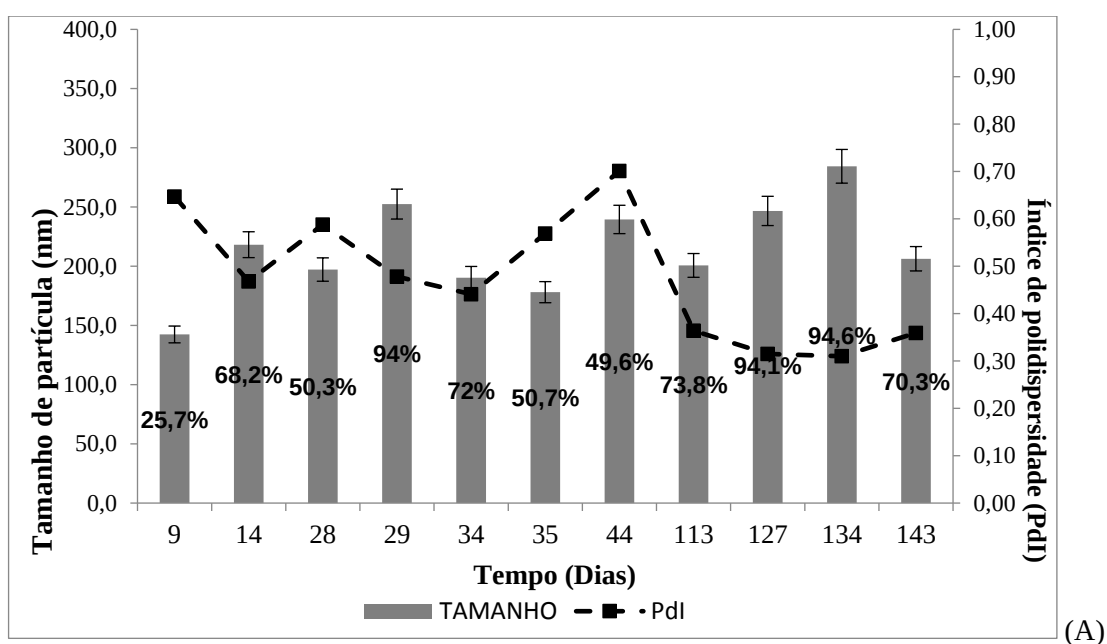
Figura 21 - Estudo de estabilidade físico-química em função do tempo para a formulação de nanocápsulas de PLGA com Amitraz na concentração de 0,10 % determinação de tamanho de partícula e PDI (A) e Potencial Zeta (B).



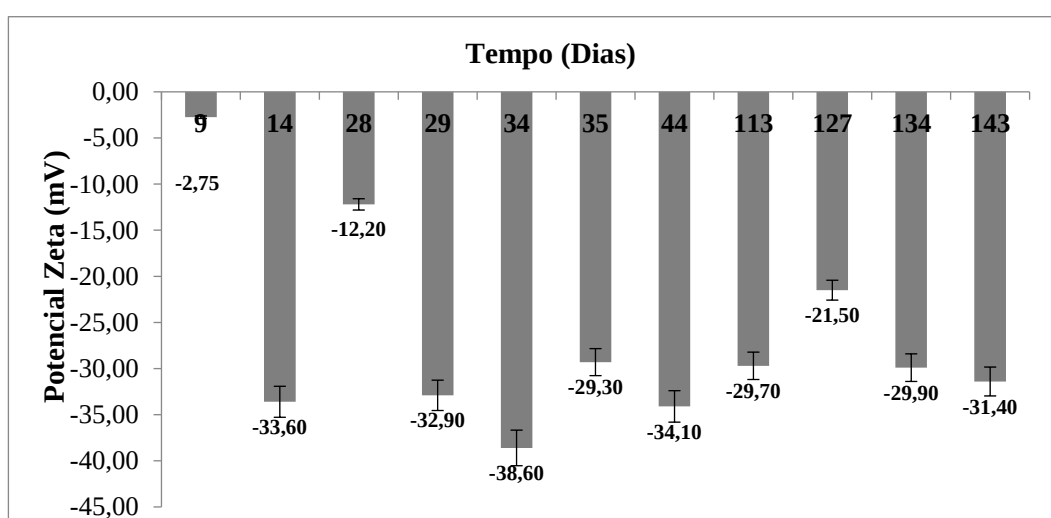
Fonte: Autores.

Por fim, para a encapsulação do ativo Fipronil, Figura 22, os resultados obtidos foram semelhantes às demais formulações, onde o valor médio do tamanho das partículas apresentou-se na faixa de 200 nm, com um baixo índice de polidispersidade, demonstrando que os nanomateriais estavam monodispersos, bem como demonstrou que o Potencial Zeta estava dentro de uma região de estabilidade de cargas, evitando assim a formação de precipitados.

Figura 22 - Estudo de estabilidade físico-química em função do tempo para a formulação de nanocápsulas de PLGA com Fipronil na concentração de 0,03 % determinação de tamanho de partícula e PDI (A) e Potencial Zeta (B).



(A)



(B)

Fonte: Autores

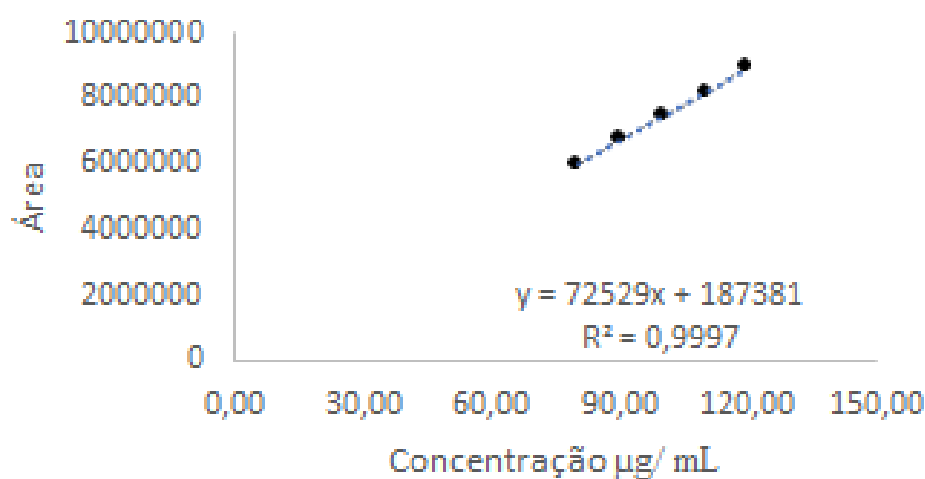
Portanto, a partir dos resultados obtidos no estudo de estabilidade cinética coloidal, pode-se sugerir que as amostras possuem características adequadas para serem utilizadas como

sistemas carreadores para os ativos em questão, considerando as concentrações de ativos empregadas, e na temperada de armazenamento sob refrigeração avaliada (4 a 7°C).

5.4 Identificação e quantificação do teor dos ativos Amitraz e Fipronil nanoencapsulados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD)

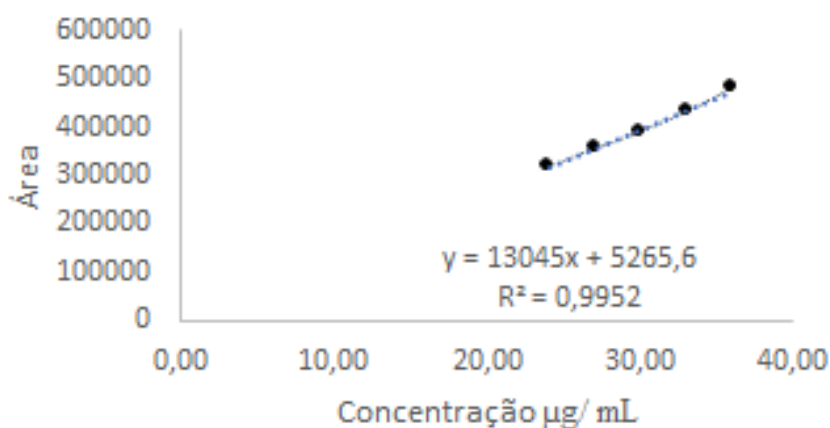
As curvas analíticas para a quantificação dos ativos Amitraz e Fipronil foram construídas através da relação dos valores das áreas dos picos e suas respectivas concentrações, representadas pelas Figuras 23 e 24.

Figura 23 - Curva de Calibração por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para Amitraz



Fonte: Autores

Figura 24 - Curva de Calibração por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para Fipronil



Fonte: Autores

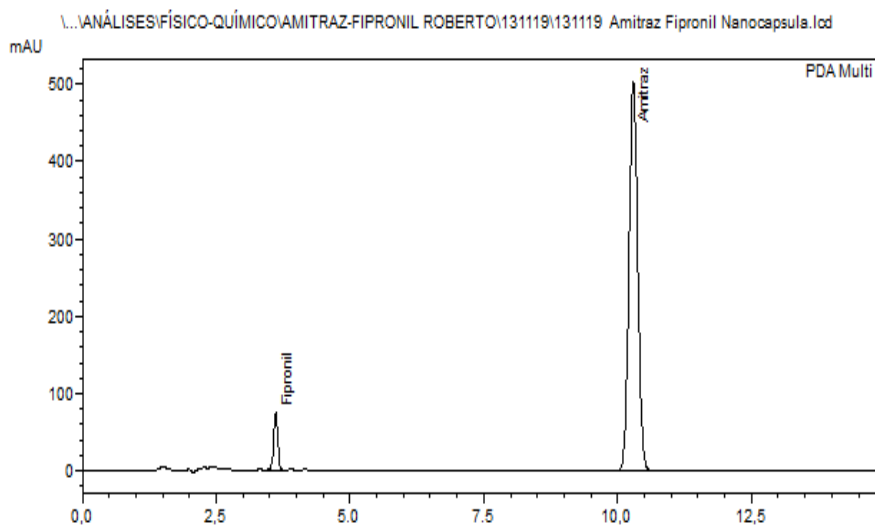
A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos na quantificação ativos Amitraz e Fipronil livres (não encapsulados) e encapsulados empregando-se o método de HPLC-DAD após micro-separação com tubos Amicon, conforme descrito na seção 4.3.6 e 4.37.

Tabela 3 - Resultados obtidos na quantificação ativos Amitraz e Fipronil livres (não encapsulados) e encapsulados por CLAE- DAD.

Amostra	Formulação	Filtrados pós Centrifugação
Solução Fipronil	0,03% (p/v)	0,00% (p/v)
Solução Amitraz	0,06% (p/v)	0,00% (p/v)
Solução Fipronil e Amitraz encapsulados	0,03% (p/v) Fipronil + 0,07% (p/v) Amitraz	0,00% (p/v) de Fipronil e 0,00% (p/v) de Amitraz

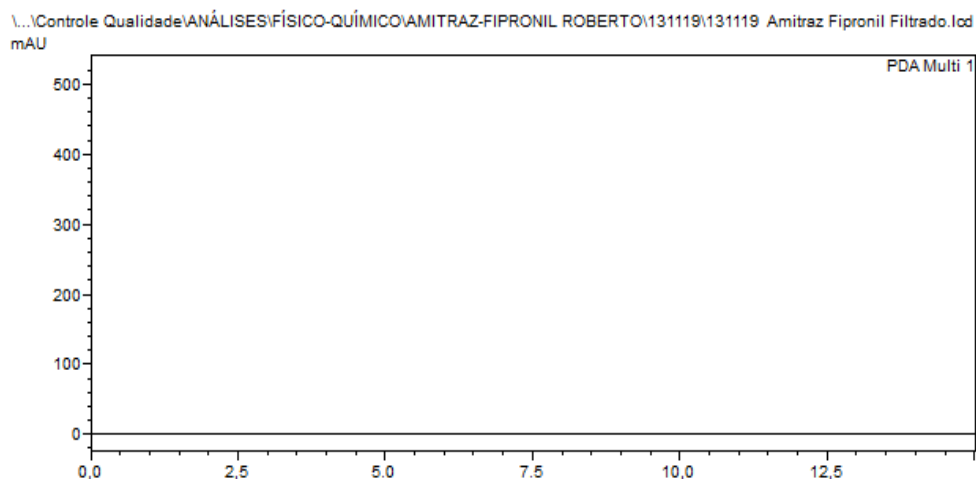
Fonte: Autores.

Figura 25 - Cromatograma de análise de formulação mista Amitraz e Fipronil em ACN.



Fonte: Autores.

Figura 26 - Cromatograma de análise de filtrado após centrifugação de formulação mista Amitraz e Fipronil.



Fonte: Autores.

A partir dos resultados obtidos na Tabela 3, conclui-se que tanto em formulações isoladas, de Amitraz ou de Fipronil, quanto em formulação mista Amitraz mais Fipronil os resultados foram praticamente iguais para as soluções que passaram pelo processo de digestão das nanoestruturas para posterior avaliação. Foi possível observar também que as amostras que não sofreram digestão e passaram pelo processo de centrifugação em tubos Amicon, demonstraram que o sobrenadante não apresentou qualquer possibilidade da presença de Amitraz e/ou Fipronil, tanto em formulações isoladas quanto mista possibilitando concluir que praticamente 100 % dos ativos foram encapsulados.

5.5 Eficácia acaricida contra fêmeas de *R. (B.) microplus* ingurgitadas - TIA

A metodologia utilizada para determinação do Teste de Imersão de Adultas (TIA) foi realizada de acordo com Drummond et al. (1973) e os resultados estão demonstrados na Tabela 4.

Para o cálculo da eficácia acaricida foram contadas as carrapatos vivas e as mortas após a exposição dos parasitas as diferentes formulações.

Verifica-se na Tabela 4 que das 10 fêmeas de carrapatos (Partenóginas) do grupo controle, que não foram expostas a nenhuma das formulações, nenhum parasita morreu nas triplicatas e com isso pode-se observar uma mortalidade nula.

Nota-se ainda na Tabela 4 que a formulação contendo AMITRAZ 12,5% no total morreram 22 fêmeas de carrapatos, sendo que 8 sobreviveram e iniciaram a ovipostura, mostrando uma mortalidade de 73,3%.

Já a formulação experimental Nanocápsulas de Amitraz a 0,10 % e Fipronil a 0,03 %, houve mortalidade de 83,33%, ou seja, 25 das fêmeas de carrapatos morreram e não conseguiram chegar ao ponto de oviposição.

Tabela 4 - Mortalidade de fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Cepa RS), submetidas a ação das: Nanocápsulas de Amitraz (0,10 %) mais Fipronil (0,03 %) e Formulação de Amitraz 12,5%; diluídas ou não em água.

Princípio ativo/ Produto	Grupo	Partenogina		TOTAL DE TELEÓGINAS VIVAS	Percentual (%) de Mortalidade Teleóginas
		Nº	Peso (g)		
CONTROLE	GIA	10	1,891	10,00	0,00
	GIB	10	1,905	10,00	
	GIC	10	2,172	10,00	
Média			1,99	30,00	
Formulação Amitraz + Fipronil	GIIA	10	1,880	1	83,33
	GIIB	10	1,927	1	
	GIIC	10	2,153	3	
Média			1,987	5,00	
Formulação AMITRAZ 12,5%	GIIA	10	1,990	2	73,33
	GIIB	10	1,841	3	
	GIIC	10	1,956	3	
Média			1,93	8,00	

Fonte: Autores.

6 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos foi possível o desenvolvimento e a obtenção de nanopartículas poliméricas para a encapsulação dos fármacos Amitraz e Fipronil.

Foi possível também observar que tanto as nanopartículas sem ativo quanto as com os ativos Amitraz e Fipronil apresentaram estabilidade físico-química, pois os valores dos parâmetros Tamanho das Partículas, Índice de Polidispersidade e Potencial Zeta, apresentaram-se dentro do esperado.

Além disto, foi possível concluir que os métodos espectroanalíticos desenvolvidos possuem linearidade satisfatória, pois os coeficientes de correlação de ambos ativos, de maneira isolada, apresentaram um coeficiente de correlação na ordem de 0,99 o que possibilita a

obtenção da concentração real dos ativos em formulações isoladas, no entanto, para o estudo em questão, desenvolvimento de uma formulação mista (Amitraz + Fipronil) isto não foi possível já que os comprimentos de onda são muito próximos dificultando a elucidação dos resultados das análises de quantificação das formulações desenvolvidas.

Sendo assim, com o desenvolvimento de método de análise realizado por cromatografia líquida de alta eficiência foi possível avaliar tanto as formulações de maneira isolada quanto mistas conforme item 5.4 deste trabalho. Bem como, foi possível verificar que a taxa de incorporação dos ativos foi de 100 %.

Por fim, pode-se constatar através do teste de Biocarrapaticidograma que as formulações desenvolvidas neste trabalho, de Fipronil/NC a 0,03 % e Amitraz/NC a 0,10 % apresentaram um resultado surpreendentemente superior à uma formulação comercial de Amitraz a 12,5 % demonstrando-se apta a continuidade dos estudos de campo, tais como: eficácia e segurança animal, buscando obtenção de um medicamento inovador para o mercado veterinário brasileiro e internacional.

7 REFERÊNCIAS

- AGENCIA BRASIL/CONAB– <http://agenciabrasil.ebc.com.br/economia/noticia/2019-08/conab-estima-safra-recorde-de-graos-para-safra-20182019>. Acesso 15/10/2019
- APOLINÁRIO, A. C.; VASCONCELOS, J. A. P.; PESSOA JR, A.; YAGUI, C. O. R. Polimerossomos versus lipossomos: A evolução da “bala mágica. **Química Nova**, v. 40, n. 7, p. 810-817, 2017.
- ARAÚJO, H.S. et al. Aspectos econômicos da produção de bovinos de corte. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 42, n. 1, p. 7, 2012.
- BARRETO, M. M. Amitraz: pharmacological and toxicological aspects in animals. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, Recife, v.11, n.3 (jul-set), p.185-191, 2017
- BARROS, A. L.; FORMAGIO, M.; KASSUYA, C. A. L. **Segurança do Uso do Neuroinseticida Fipronil**. In: 3 SIMPÓSIO DE NEUROCIÊNCIAS DA GRANDE DOURADOS – SINGraD, 2012, Universidade Federal de Grande Dourados – UFGD. **Anais...** Dourados.
- CAI, X.J.; XU, Y. Y. Nanomaterials in controlled drug release. **Cytotechnology**, v. 63, n. 4, p. 319-323, 2011.
- CAMPOS, D. R., et al. Eficácia da associação de cipermetrina, clorpirifós, butóxido de piperonila e fluazuron contra larvas de *Dermatobia hominis* em bovinos naturalmente infestados. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 39, n. 1, p. 28-32, 2017.
- CANCINO, J.; MARANGONI, V.S.; ZUCOLOTO, V. Nanotecnologia em medicina: aspectos fundamentais e principais preocupações. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 521-526, 2014.
- CASANOVA, Francisca; SANTOS, Lúcia. Encapsulation of cosmetic active ingredients for topical application—a review. **Journal of microencapsulation**, v. 33, n. 1, p. 1-17, 2016.
- CAZOTO, L.L. et al. Antibacterial activity of violacein against *Staphylococcus aureus* isolated from Bovine Mastitis. **Journal of Antibiotics**, v. 64, n. 5, p. 395-397, 2011.
- CEPEA- USP. Relatório PIB – Agro Brasil <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx>. Acesso em 15/10/19.
- CHEN, X.C., et al. Carbon-Nanotube-Based Stimuli-Responsive Controlled-Release System. **Chemistry-a European Journal**, v. 17, n. 16, p. 4454-4459, 2011.
- CHENG, Y. Y.; XU, T.W. The effect of dendrimers on the pharmacodynamic and pharmacokinetic behaviors of non-covalently or covalently attached drugs. **European Journal of Medicinal Chemistry**. V. 43, p. 2291-2297, 2008.
- CHORNY, M., et al. Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation: effect of formulation variables on size, drug recovery and release kinetics. **Journal of Controlled Release**, v. 83, n. 3, p. 389-400, 2002.

CID, Y. P. **Curva de concentração plasmática do fipronil por via subcutânea em bovinos e eficácia contra o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, um importante ectoparasito na pecuária brasileira e argentina.** 2012. 85 f. Tese (Doutorado em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

COSTA, E. G. L., et al. Controle de *Haematobia irritans* no Semiárido de Minas Gerais. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, ID 1385, p. 1-10, 2016.

CUNHA, A. F. **Avaliação dos efeitos tóxicos da exposição ao inseticida clorpirifós sobre as respostas cardiovasculares e comportamentais em animais experimentais.** 2014. 99 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Farmacologia) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.

CUNHA, L.F. Campanha Pecuária do Brasil vai mostrar um setor moderno e sustentável. **Revista Pecuária Corte**, v. 1, n. 3, p. 27, 2012.

DEL PINO, J.; MOYANO-CIRES, P.V.; ANADON, M.J.; DIAZ, M.J.; LOBO, M.; CAPO, M.A.; FREJO, M.T. Molecular Mechanisms of amitraz mammalian toxicity: a comprehensive review of existing data. **Chemical Research in Toxicology**, v. 28, n. 6, p. 1073-1094, 2015.

DELMAS, T., et al. How To Prepare and Stabilize Very Small Nanoemulsions. **Langmuir**, v. 27, n.5, p. 1683-1692, 2011.

DOLFINI, T.F.; MATHEUS, J.P.; DIETZE, W. Nanotecnologia na Terapia Antálgica. **Veterinária em Foco**, Canoas, v. 16, n. 1, pg. 3-10, 2018.

DOMINGUES, L. N. **Práticas de controle e perfil de suscetibilidade de *Haematobia irritans irritans* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae) e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) à cipermetrina e clorpirifós na mesorregião do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, MG, 2010.** 2011. 62 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

DRUMMOND, R.O.; ERNST, S.E.; TREVINO, J.L.; GLADNEY, W.J.; GRSHAM, O.H. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory tests of insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 66, p. 130-133, 1973.

DURÁN, N.; MARCATO, P. D.; TEIXEIRA, Z. **Nanotecnologia e nanobiotecnologia: conceitos básicos.** Disponível em: <http://www.cienciaviva.org.br/arquivo/cdebate/012nano/Nanotecnologia_e_Nanobiotecnologia.pdf>. Acesso em 21/01/2018

FAGAN, S. et al. Ab initio study of covalently functionalized carbon nanotubes; **Chemical Physics Letters**, v. 430, n. 1-3, pp. 71-74, 2006.

FALLEIROS, et al. Aplicações da Nanotecnologia no diagnóstico e tratamento de cancer. **Nucleus**, ISSN-e 1982-2278, v. 8, n. 1, p. 1-20, 2011.

FANG, Chia-Lang; A AL-SUWAYEH, Saleh; FANG, Jia-You. Nanostructured lipid carriers (NLCs) for drug delivery and targeting. **Recent patents on nanotechnology**, v. 7, n. 1, p. 41-55, 2013.

FERREIRA D.C. et al. Nanopartículas Lipídicas. In: LOPES C.M., SOUTO E.B. **Novas formas farmacêuticas para administração de fármacos**. Porto: Universidade Fernando Pessoa, 2011. p. 297-324.

FRIEDRICH, R.B., et al. Development and physicochemical characterization of dexamethasone-loaded polymeric nanocapsule suspensions. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1131-1136, 2008.

GASQUES, J.G.B.; DA SILVA, L. F. **Projeções do Agronegócio - Brasil - 2008/09 a 2018/19**. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Brasília: Assessoria de Gestão Estratégica – AGE, 2009.

GOMES, A.; KOLLER, W. W.; BARROS, A. T. M. Suscetibilidade de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a carrapaticidas em Mato Grosso do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 41, n. 8, p. 1447-1452, 2011.

GRISI, L. et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.

GUANZIROLI, C.E. **Agronegócio no Brasil: perspectivas e limitações**, Niterói: Universidade Federal Fluminense, 2006. p. 59.

HE, W., et al. Food protein-stabilized nanoemulsions as potential delivery systems for poorly water-soluble drugs: preparation, in vitro characterization, and pharmacokinetics in rats. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, n. 1, p. 521-533, 2011.

HUYNH, L., et al. Computational approaches to the rational design of nanoemulsions, polymeric micelles, and dendrimers for drug delivery. **Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine**, v. 8, n. 1, p. 20-36, 2012.

JACKSON, D., et al. **Fipronil Technical Fact Sheet**. 2009. National Pesticide Information Center, Oregon State University Extension Services. Disponível em: <http://npic.orst.edu/factsheets/fiptech.pdf>. Acesso em: 15/10/2019.

JIANG, H.T., et al. Development of an amorphous mesoporous TiO₂ nanosphere as a novel carrier for poorly water-soluble drugs: Effect of different crystal forms of TiO₂ carriers on drug loading and release behaviors. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 153, n. 1, p. 124-130, 2012.

JONSSON, N.N., et al. Rotation of treatments between spinosad and amitraz for the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* populations with amitraz resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 169, n. 1-2, p. 157-164, 2010.

KOPLIN, T. J., et al., Workflow for High Throughput Screening of Gas Sensing Materials. **Sensors**, v.6, p. 298-307, 2006.

LEITE, R.C. **Boophilus microplus (Canestrini, 1987): susceptibilidade, uso atual e retrospectivo de carrapaticidas em propriedades das regiões fisiogeográficas da baixada Grande Rio e Rio de Janeiro, Uma abordagem epidemiológica**. 1988, 151 f. Tese (Doutorado) – Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, 1988.

MAPA - Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/agropecuaria-brasileira-em-numeros>. Acesso em: 15/10/2019.

MARCATO, P.D. Preparation, characterization and application in drugs and cosmetics of solid lipid nanoparticles. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n. 2, p. 01-37, 2009.

MCCLEMENTS, David Julian. Advances in fabrication of emulsions with enhanced functionality using structural design principles. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, n. 5, p. 235-245, 2012.

MENDES, E.C. **Resistência do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) a amitraz e alternativas de controle com extratos vegetais e fungos entomopatogênicos**. 2011. 74 f. Dissertação. (Mestrado em Biologia) - Instituto Biológico, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MORAIS, M. C., et al. Alterações clínicas em bovinos infestados experimentalmente com larvas de *Cochliomyia hominivorax* (COQUEREL, 1858) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 12, n. 4, p. 154-158, 2003.

MULLER, R. H., et al. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 6, p. 522-530, 2007.

OLIVEIRA, C. M. C., et al. Prevalence and etiology of bovine mastitis in the dairy region of Rondon do Para, state of Para. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 104-110, 2011.

OLIVEIRA, C. S. *et al.*, Biotécnicas da Reprodução em Bovinos. Cadernos Técnicos. **Embrapa Gado de Leite.**, v.1, p. 1-56, 2014.

PAIN, Fernanda et al . Selective control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in fipronil-treated cattle raised on natural pastures in Lages, State of Santa Catarina, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 20, n.1,p. 13-16, 2011.

PINTO REIS, C., et al. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 2, n. 1, p. 8-21, 2006.

PINTO, S. B., et al. Bioecologia de *Dermatobia hominis* (LINNAEUS Jr., 1781) em Palotina, Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v. 32, n. 5, p. 821-827, 2002.

PLAPIED, L., et al. Fate of polymeric nanocarriers for oral drug delivery. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 16, n. 3, p. 228-237, 2011.

POHLMANN, M et al. Drawing, virtual modeling and 3D print in the production of didactic models for the teaching-learning of visually impaired students: case study of nanostructured systems. **International Journal of Education and Research**, v. 3, n. 12, 2015. p. 453-466.

PUBCHEN. Amitraz. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Amitraz>. Acesso em: 15/10/2019.

PUBCHEN. Fipronil. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fipronil>. Acesso em: 15/10/2019.

RAMOS, B. G. Z.; PASA, T. B. C. O desenvolvimento da nanotecnologia: cenário mundial e nacional de investimentos. **Revista Brasileira de Farmácia**, n. 89, p. 95- 101, 2008.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 7, p. 887-913, 2011.

RILLO SATO, Mariana et al. Recent advances in nanoparticle carriers for coordination complexes. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 15, n. 4, p. 287-297, 2015.

ROSSI - BERGMANN, B. A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. **Ciências e Cultura**, v. 60, n.2, 2008.

SAHOO, Sanjeeb K.; MISRA, Ranjita; PARVEEN, Suphiya. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics, and imaging. *In: Nanomedicine in Cancer*. Pan Stanford, 2017. p. 73-124.

SCHAFFAZICK, S.R., et al. Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2005.

SCHLESINGER, S. **Pecuária Bovina no Brasil: Maior Produtividade com Menor Impacto Socioambiental**. 2010. Disponível em <http://www.agroambiente.org.br/arquivo/biblioteca/pecuaria_bovina_no_brasil_maior_produtividade_com_menor_impacto_socioambiental.icv>. Acesso em 20/07/2010.

SILVA, A. M., et al. Infestação natural de fêmeas bovinas de corte por ectoparasitas na Região Sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 7, p. 1477-1482, 2010.

SILVEIRA, W.H., et al. Medidas de controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*: uma breve revisão. **PUBVET**, Londrina, v. 8, n. 10, p. 259, 2014.

SIQUEIRA-MOURA, M. P.; PRIMO, F. L.; ESPREAFICO, E. M.; TEDESCO; A. C. Development, characterization, and photocytotoxicity assessment on human melanoma of chloroaluminum phthalocyanine nanocapsules. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 3, p. 1744-1752, 2013.

SOLARO, R.; CHIELLINI, F.; BATTISTI, A. Targeted Delivery of Protein Drugs by Nanocarriers. **Materials**, v. 3, n. 3, p. 1928-1980, 2010.

TEIXEIRA, D. G. *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858) (Diptera: Calliphoridae): características e importância na medicina veterinária. In: Seminário apresentado junto à disciplina Seminários Aplicados, do programa de pós-graduação em Ciência Animal, 2013, Universidade Federal de Goiás. **Anais...** Goiânia: Escola de veterinária e zootecnia. Disponível em: https://ppgca.evz.ufg.br/up/67/o/2013_Denise_Teixeira_2c.pdf. Acesso em: 01/08/18.

TINGLE, C. C. D., et al. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 176, p. 1-66, 2003.

TOGNOLLI, L.; CREPALDI, N.; MEDEIROS, F. *Haematobia irritans*: Revisão Literária. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 12, 2009.

VERGARA, C.; DIB, A. Uso Racional de Fipronil. **Revista Médica de Pequeños Animales**, v. 2, n. 1, 2015.

VRIGNAUD, S.; BENOIT, J. P; SAULNIER, P. Strategies for the nanoencapsulation of hydrophilic molecules in polymer-based nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, n. 33, p. 8593-8604, 2011.

ZHANG, Y., et al. Spherical mesoporous silica nanoparticles for loading and release of the poorly water-soluble drug telmisartan. **The Journal of Controlled Release**, v. 145, n. 3, p. 257-63, 2010.