

DIEGO FARIA COLA

**EFEITO DE NANOCARREADORES DE ZEÍNA CONTENDO ASSOCIAÇÃO
ENTRE ISOLADOS VEGETAIS E IVERMECTINA EM *Rhipicephalus microplus***

Sorocaba
2021

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO em

ciências
ambientais

DIEGO FARIA COLA

**EFEITO DE NANOCARREADORES DE ZEÍNA CONTENDO ASSOCIAÇÃO
ENTRE ISOLADOS VEGETAIS E IVERMECTINA EM *Rhipicephalus microplus***

Tese apresentada como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências Ambientais da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" na Área de Concentração Diagnóstico, Tratamento e Recuperação Ambiental

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto

Coorientador: Profa. Dra. Ana Carolina de Souza Chagas

Sorocaba
2021

C683e	<p>Cola, Diego Faria</p> <p>Efeito de nanocarreadores de zeína contendo associação entre isolados vegetais e ivermectina em <i>Rhipicephalus microplus</i> / Diego Faria Cola. – Sorocaba, 2021</p> <p>83 f. : il., tabs., fotos</p>
	<p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, Sorocaba</p> <p>Orientador: Leonardo Fernandes Fraceto</p> <p>Coorientadora: Ana Carolina de Souza Chagas</p>
	<p>1. Nanopartículas. 2. Carrapaticidas. 3. Ivermectina. 4. Isolados Vegetais. 5. Bovinos. I. Título.</p>

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Ciência e Tecnologia, Sorocaba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Sorocaba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Efeito de nanocarreadores de zeína contendo associação entre isolados vegetais e ivermectina em *Rhipicephalus microplus*

AUTOR: DIEGO FARIA COLA

ORIENTADOR: LEONARDO FERNANDES FRACETO

COORIENTADORA: ANA CAROLINA DE SOUZA CHAGAS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIAS AMBIENTAIS, área: Diagnóstico, Tratamento e Recuperação Ambiental pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. LEONARDO FERNANDES FRACETO (Participação Virtual)
Engenharia Ambiental / Unesp - ICT Sorocaba

Prof. Dr. GERSON ARAÚJO DE MEDEIROS (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia Ambiental / Instituto de Ciência e Tecnologia, Câmpus de Sorocaba, Unesp

Dr^a. CECÍLIA JOSÉ VERÍSSIMO (Participação Virtual)
Centro de Pesquisa de Genética e Reprodução Animal / Instituto de Zootecnia - Nova Odessa

Dr. RODRIGO GIGLIOTI (Participação Virtual)
Centro de Pesquisa de Genética e Reprodução Animal / Instituto de Zootecnia - Nova Odessa

Dr. JHONES LUIZ DE OLIVEIRA (Participação Virtual)
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) / Unesp - Campus de Jaboticabal

Sorocaba, 20 de maio de 2021

Aos meus pais, Luiz Antonio e Ivete,
pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas.

À minha namorada, Priscila,
pelo apoio incondicional e constante incentivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por mais uma vez ter me dado luz, força e serenidade para continuar mais uma etapa da minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto, pela confiança, paciência, incentivo, amizade e excelente orientação.

À Prof^a. Dr^a. Ana Carolina de Souza Chagas por participar desse projeto como coorientadora, pela prontidão, apoio e auxílio imensurável no desenvolvimento de toda essa pesquisa.

À Amanda Figueiredo por toda dedicação, apoio e auxílio com os experimentos com *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

À Prof^a. Dr^a. Daiana Silva Ávila pelos ensaios realizados com *Caenorhabditis elegans*, por toda prontidão e conhecimento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e à Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP) pela oportunidade e estrutura oferecidas para o desenvolvimento de meu trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 (Processo nº: 88882.434504/2019-01), pelo apoio através da bolsa de doutorado concedida para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro (FAPESP – 2017/21004-5).

À Ipanema Indústria de Produtos Veterinários pelo auxílio e apoio financeiro concedido para a realização da etapa inicial deste trabalho.

Aos meus pais pelo amor e dedicação e por me proporcionarem todas as condições em minhas buscas por meus objetivos pessoais e profissionais.

À minha família pelo apoio e estímulo na busca do sucesso.

À minha namorada, Priscila, pelo incentivo, apoio e compreensão pelos momentos de ausência.

Aos meus companheiros de grupo de pesquisa Nanotecnologia Ambiental pela convivência e pela troca de conhecimentos e informações no dia a dia.

Aos amigos de pós-graduação em Ciências Ambientais pelo respeito e amizade. Meus sinceros desejos de sucesso e realização a cada um de vocês.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que a realização deste trabalho fosse possível.

“Obstáculo é aquilo que você enxerga quando tira os olhos do seu objetivo.”

Henry Ford

COLA, D.F. Efeito de nanocarreadores de zeína contendo associação entre isolados vegetais e ivermectina em *Rhipicephalus microplus*. 2021. 83 f. Tese de Doutorado em Ciências Ambientais - Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Sorocaba, 2021.

RESUMO

O controle de ectoparasitas em bovinos é baseado no uso intensivo de acaricidas, desencadeando o desenvolvimento da resistência nos parasitas aos diversos compostos. Isso leva a problemas relacionados à biodisponibilidade, poluição ambiental, toxicidade para o hospedeiro e manejadores, e poder cumulativo de resíduo em produtos de origem animal. Nanotecnologia é utilizada para tentar diminuir e evitar estes problemas, possibilitando a confecção de nanopartículas que permitem o desenvolvimento de sistemas coloidais focados na entrega de nutrientes e fármacos. Deste modo, este estudo teve por objetivo preparar, caracterizar e desenvolver sistemas nanocarreadores a partir da zeína, associando ivermectina e isolados vegetais para otimizar o controle de carrapatos, produzindo formulações alternativas visando aplicações em veterinária. Nanopartículas de zeína foram desenvolvidas pelo método de precipitação com anti-solvente, sendo analisadas em função do tempo (0 a 120 dias), avaliando suas propriedades físico-químicas, como, pH, diâmetro hidrodinâmico, polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulação. Foram também realizados testes in vitro com *R. (B.) microplus* para determinar a eficácia carrapaticida, através de testes de pacote com larvas (TPL) e imersão de larvas (TIL) e adultos (TIA), além de avaliar a atividade residual das formulações desenvolvidas. Teste de toxicidade em *Caenorhabditis elegans* também foi realizado após constatação da ação carrapaticida. As formulações apresentaram diâmetro médio inicial por volta de 166 nm para nanopartículas sem ativos com potencial zeta de -21 mV. Ao se realizar a encapsulação, ocorreu aumento de tamanho médio para cerca de 203 nm e de potencial zeta para -14 mV. Todas as nanoformulações apresentaram inicialmente índice de polidispersão próximo a 0,2, e concentração de partículas entre 1,2 e 1,4 x 10¹³ partículas/mL. Durante o estudo as nanoformulações apresentaram aumento de tamanho e polidispersão, e diminuição na concentração de partículas. Os ensaios in vitro realizados sobre *R. (B.) microplus* demonstraram que a nanopartícula de zeína sem nenhum composto não apresenta efeito, porém ao adicionar os compostos ativos, todas as formulações apresentaram ação acaricida, obtendo-se no TPL mortalidade entre 74 e 100%, e atividade residual superior a 94% no período de 30 dias. Já para o TIA, a eficácia foi superior a 72% em concentrações entre 5 e 0,313 mg/mL, e no TIL as nanoformulações apresentaram eficácia de 100% em concentrações entre 5 e 0,625 mg/mL. No teste de toxicidade com *C. elegans* observou-se que as nanoformulações não ocasionaram alterações após a exposição. Assim, foi possível desenvolver nanoformulações estáveis, permitindo o desenvolvimento de novos nanocarrapaticidas empregando-se menor concentração de princípios ativos, mantendo a eficácia, diminuindo o risco de presença de resíduos, promovendo um controle parasitário mais seguro.

Palavras-chave: Nanopartículas. Carrapaticidas. Limoneno. Mentol. Citral. Ivermectina. Bovinos.

COLA, D.F. Effect of zein nanocarriers containing association between plant isolates and ivermectin on *Rhipicephalus microplus*. 2021. 83 f. Thesis (PhD Doctorate in Environmental Sciences - Institute of Science and Technology, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Sorocaba, 2021).

ABSTRACT

The control of ectoparasites in cattle is based on the intensive use of acaricides, triggering the development of resistance in parasites to various compounds. This leads to problems related to bioavailability, environmental pollution, toxicity to the host and managers, and the cumulative power of waste in products of animal origin. Nanotechnology is used to try to reduce and avoid these problems, making it possible to manufacture nanoparticles that allow the development of colloidal systems focused on the delivery of nutrients and drugs. Thus, this study aimed to prepare, characterize and develop nanocarrier systems based on zein, combining ivermectin and plant isolates to optimize the control of ticks, producing alternative formulations aimed at veterinary applications. Zein nanoparticles were developed by the anti-solvent precipitation method, being analyzed as a function of time (0 to 120 days), evaluating their physical-chemical properties, such as pH, hydrodynamic diameter, polydispersion, zeta potential and encapsulation efficiency. In vitro tests were also carried out with *R. (B.) microplus* to determine the tick effectiveness by using larval packet tests (TPL) and larval immersion (TIL) and adults (TIA), in addition to assessing the residual activity developed formulations. Toxicity test on *Caenorhabditis elegans* was also carried out after finding the tick action. The formulations showed an initial average diameter of around 166 nm for nanoparticles without assets with a zeta potential of -21 mV. Upon encapsulation, there was an increase in average size to about 203 nm and zeta potential to -14 mV. All nanoformulations initially presented a polydispersity index close to 0.2, and a particle concentration between 1.2 and 1.4 x 10¹³ particles/mL. During the study, nanoformulations showed an increase in size and polyspersion, and a decrease in the concentration of particles. The in vitro tests carried out on *R. (B.) microplus* demonstrated that the zein nanoparticle without any compound has no effect, however, when adding the active compounds, all formulations showed an acaricidal action, resulting in TPL mortality between 74 and 100 %, and residual activity greater than 94% in the 30-day period. As for TIA, the efficacy was greater than 72% in concentrations between 5 and 0.313 mg/mL, and in TIL, nanoformulations showed 100% efficacy in concentrations between 5 and 0.625 mg/mL. In the toxicity test with *C. elegans*, it was observed that the nanoformulations did not cause changes after exposure. Thus, it was possible to develop stable nanoformulations, allowing the development of new nanocarrapaticides using a lower concentration of active ingredients, maintaining efficiency, decreasing the risk of the presence of residues, promoting safer parasitic control.

Keywords: Nanoparticles. Carrapaticides. Limonene. Menthol. Citral. Ivermectin. Bovines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas químicas das substâncias homólogas que compõem a Ivermectina.....	19
Figura 2: Figura 2a: Estrutura química dos isolados vegetais: a) Limoneno, b) Citral, c) Mentol.....	22
Figura 3: Teste de Pacote com Larvas (TPL) de <i>R. (B.) microplus</i> com as formulações: a) Larvas coletadas com auxílio de alça de platina, b) Larvas colocadas em papel impregnado, c) Envelope de papéis impregnados envolvendo as larvas.....	42
Figura 4: Teste de Imersão de Adultos (TIA) de <i>R. (B.) microplus</i> com as formulações.....	43
Figura 5: Curva analítica obtida para os compostos: a) Ivermectina; b) Citral; c) Mentol; d) Limone. Valores representam a média de três experimentos realizados.....	44
Figura 6: Diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de zeína em função do tempo para o controle (NPZ) e para NPZ_IVM+CIT, NPZ_IVM+MEN e NPZ_IVM+LIM. b* diferença estatística $p < 0,05$ em relação ao tempo zero.....	46
Figura 7: Polidispersão média em função do tempo para as nanopartículas controle (NPZ) e para NPZ_IVM+CIT, NPZ_IVM+MEN e NPZ_IVM+LIM. b* diferença estatística $p < 0,05$ em relação ao tempo zero.....	47
Figura 8: Diâmetro médio pela técnica de NTA para nanopartículas de zeína em função do tempo de armazenamento para nanopartículas de zeína controle (NPZ) e para NPZ_IVM+CIT, NPZ_IVM+MEN e NPZ_IVM+LIM. b* representa variações significativas entre os grupos em função do tempo em relação ao tempo zero.....	49
Figura 9: Concentração de nanopartículas em função do tempo para as nanopartículas controle (NPZ) e NPZ_IVM+CIT, NPZ_IVM+MEN e NPZ_IVM+LIM. a* representa variações não significativas entre os grupos em função do tempo em relação ao controle no tempo zero; b* representa variações significativas entre os grupos em função do tempo em relação ao tempo zero.....	50

Figura 10: Potencial zeta das nanopartículas em função do tempo para o controle (NPZ) e para NPZ_IVM+CIT, NPZ_IVM+MEN e NPZ_IVM+LIM. a* representa variações não significativas entre os grupos em função do tempo em relação ao controle no tempo zero; b* representa variações significativas entre os grupos em função do tempo em relação ao tempo zero.....	51
Figura 11: Avaliação de alterações do pH das nanopartículas em função do tempo para o controle (NPZ) e para NPZ_IVM+CIT, NPZ_IVM+MEN e NPZ_IVM+LIM. a* representa variações não significativas entre os grupos em função do tempo em relação ao controle no tempo zero; b* representa variações significativas entre os grupos em função do tempo em relação ao tempo zero.....	52
Figura 12: Eficiência de encapsulação (%) dos ativos IVM, CIT, MEN e LIN em função do tempo. b* representa variações significativas entre os grupos em função do tempo em relação ao tempo zero.....	53
Figura 13: Eficiência de carregamento de droga (%) para IVM, CIT, MEN e LIM em função do tempo. b* representa variações significativas entre os grupos em função do tempo em relação ao tempo zero.....	54
Figura 14: Curva de sobrevivência de <i>C. elegans</i> para formulação comercial Ivomec®. Resultados foram comparados ao controle por ANOVA, seguido pelo post-hoc de Tukey. Foram considerados resultados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. * representa diferenças em relação ao controle com * $p < 0,05$	55
Figura 15: Curva de sobrevivência para controle, formulação comercial Ivomec® e nanoformulações. Os resultados foram comparados ao controle por ANOVA, seguido pelo post-hoc de Tukey. Foram considerados resultados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. a* representa diferenças em relação ao grupo controle, b* representa diferenças em relação ao Ivomec®.....	56
Figura 16: Alteração no tamanho corporal de <i>C. elegans</i> expostos à Ivomec® e nanoformulações em relação ao tamanho relativo (percentual) do controle. Os resultados foram comparados ao controle por ANOVA, seguido pelo post-hoc de Tukey. Foram considerados resultados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. a* representa diferenças em relação ao controle.....	57

Figura 17: Alteração percentual no tamanho da ninhada de *C.elegans* expostos à formulação comercial e nanoformulações em relação ao controle. Os resultados foram comparados ao controle por ANOVA, seguido pelo post-hoc de Tukey. Foram considerados resultados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. a* representa diferenças em relação ao controle.....58

Figura 18: Atividade residual sobre *R. (B.) microplus*, a partir das médias de mortalidade obtidas por TPL após 1, 2, 3, 7, 15, e 30 dias do tratamento inicial.....60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Produtos disponíveis no Brasil para uso em bovinos à base de ivermectina, concentração e método de aplicação e dose recomendada.....	20
Tabela 2: Produtos à base de nanotecnologia disponíveis no mercado mundial, composição, aplicação e país de origem.....	26
Tabela 3: Termos pesquisado, número de patente, detentores, inventores e usos indicados de patentes registradas.....	28
Tabela 4: Condições cromatográficas dos compostos estudados.....	35
Tabela 5: Coeficiente de correlação (r) obtido para cada composto.....	45
Tabela 6: Limite de detecção e limite de quantificação dos métodos analíticos para cada composto estudado.....	48
Tabela 7: Médias de mortalidade (%) de larvas de <i>R. (B.) microplus</i> verificadas pelas nanoformulações, em um intervalo de 24 h, pelo Teste de Pacote com Larvas (TPL).....	60
Tabela 8: Valores das médias dos pesos das fêmeas (PF), pesos das massas de ovos (PO), % de eclosão das larvas (E), índice de eficiência reprodutiva (REI) e eficácia das nanoformulações sobre fêmeas ingurgitadas de <i>R. (B.) microplus</i> (EP), avaliadas pelo Teste de Imersão de Adultos (TIA).....	61
Tabela 9: Porcentagem média de mortalidade (%) de larvas de <i>R. (B.) microplus</i> verificadas pelas nanoformulações de NPZ, em um intervalo de 48 h, pelo Teste de Imersão de Larvas (TIL).....	66

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

B.O.D.: Demanda Bioquímica de Oxignio

CIT: Citral

CLAE: Cromatografia Líquida de alta eficiência

DPR: Desvio padrão relativo

ECF: Espectroscopia de correlao de fótons

IVM: Ivermectina

LD: Limite de Deteco

LIM: Limoneno

LQ: Limite de Quantificao

MEN: Mentol

mg/mL: miligrama por mililitro

ng/mL: nanograma por mililitro

NGM: meio de crescimento para nematoides

NPZ: Nanopartícula de Zeína

NTA: Nanoparticle tracking analysis ou Rastreamento de Nanopartículas

p/v: peso/volume

PDI: ndice de polidispersão

pH: Potencial hidrogeniônico

TIA: Teste de imersão de adultos

TIL: Teste de imersão de larvas

TPB : Tristeza Parasitária Bovina

TPL: Teste de pacote com larvas

UR: Umidade Relativa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Pecuária brasileira e parasitismo	16
1.2. Compostos ativos utilizados no controle de ectoparasitas em veterinária	19
1.2.1. Ivermectina.....	19
1.2.2 Óleos essenciais e constituintes Isolados.....	21
1.2.3 Isolados vegetais.....	22
1.3 Nanotecnologia aplicada à veterinária	23
1.3.1 Produtos comercializados e patentes à base de nanotecnologia.....	26
1.3.2. Nanopartículas de zeína.....	31
2 OBJETIVOS	33
2.1 Objetivo geral	33
2.2 Objetivos específicos	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 Materiais	34
3.2 Metodologia analítica para quantificação dos compostos ativos	34
3.2.1 Validação da metodologia de quantificação dos compostos ativos.....	36
3.2.2 Seletividade.....	36
3.2.3 Linearidade.....	36
3.2.4 Limite de Detecção e Quantificação.....	36
3.3 Preparo de nanopartículas de zeína contendo ingredientes ativos	37
3.4 Estabilidade físico-química	37
3.4.1. Diâmetro hidrodinâmico e polidispersão.....	38
3.4.1.1. Espectroscopia de correlação de fótons.....	38
3.4.1.2 Rastreamento de nanopartículas.....	38
3.4.2. Potencial Zeta.....	38
3.4.3. Análises do pH.....	39
3.4.4 Eficiência de encapsulação dos ativos nas formulações e Eficiência de carregamento de droga (Drug Loading).....	39
3.5 Avaliação <i>in vitro</i> de toxicidade em organismo não-alvo	40
3.6 Ensaio <i>in vitro</i> com formulações para determinação da eficácia carrapaticida sobre <i>R. (B.) microplus</i>	41

3.6.1 Teste de Pacote com Larvas (TPL)	41
3.6.2 Atividade residual verificada por Teste de Pacote de Larvas (TPL).....	42
3.6.3 Teste de Imersão de Adultos (TIA).....	42
3.6.4 Teste de Imersão de Larvas (TIL)	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1 Desenvolvimento da metodologia analítica para quantificação dos ativos	44
4.1.1 Curvas de calibração e adequação de metodologia analítica.....	44
4.2 Caracterização e estudo de estabilidade físico-química das nanopartículas	46
4.2.1 Diâmetro hidrodinâmico e índice polidispersão.....	46
4.2.2 Concentração e tamanho das nanopartículas (Rastreamento de Nanopartículas).....	48
4.2.3 Potencial zeta.....	50
4.2.4 Avaliação de alterações do pH.....	52
4.2.5 Eficiência de encapsulação e Eficiência de carregamento de droga (Drug Loading).....	53
4.3 Avaliação <i>in vitro</i> de toxicidade em organismo não-alvo	54
4.4 Ensaio <i>in vitro</i> com formulações para determinação de eficácia carrapaticida	59
4.4.1 Teste de Pacote com Larvas (TPL)	59
4.4.2 Atividade residual verificada por Teste de Pacote com Larvas (TPL).....	60
4.4.3 Teste de Imersão de Adultos (TIA)	61
4.4.4 Teste de Imersão de Larvas (TIL)	62
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
6 CONCLUSÕES	65
7 REFERÊNCIAS	67
ANEXOS	83

1 INTRODUÇÃO

O crescimento populacional exige um maior esforço para atender ao aumento da demanda de alimentos. Segundo estimativas realizadas pelas Nações Unidas, prevê-se que a população mundial cresça de 7,7 bilhões em 2019 para 8,5 bilhões em 2030, para 9,7 bilhões em 2050 e para 10,9 bilhões em 2100. Este crescimento fará com que ocorra um aumento na demanda por produtos agrícolas em 35 a 50% até 2050, exercendo ainda mais pressão sobre os recursos naturais do mundo (FAO, 2019).

Atualmente, observa-se que após décadas de declínio constante, a tendência da fome no mundo reverteu a partir de 2015, permanecendo praticamente inalterada nos últimos três anos em um nível ligeiramente abaixo de 11%. Porém, o número de pessoas que sofrem de fome aumentou lentamente. Como resultado, mais de 820 milhões de pessoas no mundo passam fome hoje (FAO et al., 2019).

Conseqüentemente, existe uma pressão na área de produção agropecuária para que a produção de alimentos ocorra de forma crescente e constante, ressaltando-se a necessidade de produção cada vez mais sustentável. Nas últimas décadas, o consumo de carne assim como o de outros derivados de origem animal, como leite e ovos, triplicou em países de baixa ou média renda. Isso se deve a fatores como a urbanização e crescimento tanto populacional como da renda familiar (Steinfeld et al., 2006). Desta forma, o crescimento populacional resulta na exigência de uma maior eficiência produtiva, sendo que esta pode ser afetada por diferentes tipos de doenças, como as transmitidas por ectoparasitas.

1.1 Pecuária brasileira e parasitismo

O complexo pecuário é de grande importância para o progresso da economia de um país, sendo fundamental em processos que compreendem desde a disponibilização de alimentos de baixo custo à população até a formação de empregos, receita e mercado consumidor para bens industrializados. Em países como o Brasil, que apresentam condições naturais que propiciam benefícios relativos aos produtos agropecuários, ela apresenta outra função primordial, a de criar divisas para a aquisição de insumos e bens de capitais essenciais para o progresso da economia (Brasil, 2014a).

A pecuária bovina pode ser considerada como um dos mais relevantes setores do agronegócio brasileiro e, por conseguinte, da economia brasileira. O Brasil dispõe do maior rebanho comercial mundial com aproximadamente 215 milhões de cabeças de bovinos; é o maior exportador de carne bovina, sendo o segundo maior produtor de carne, atrás apenas dos Estados Unidos (ABIEC, 2019), e o quarto maior produtor de leite (Leite; Resende; Stock, 2019).

Segundo dados da Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (ABIEC, 2019), o Brasil terminou o ano de 2018 apresentando aumento no Produto Interno Bruto (PIB), alcançando cerca de R\$ 6,83 trilhões. No mesmo período, a pecuária apresentou um aumento de 8,3% em seu PIB, em relação ao ano anterior, somando cerca de R\$ 597 bilhões. Desta forma, a pecuária elevou seu PIB para 8,7% em relação a sua participação no PIB total brasileiro, sendo que este valor abrange desde os insumos empregados na produção do gado, investimento em genética, rendimento dos animais, até o total negociado por indústrias e varejos, apresentando o maior valor já obtido na última década (ABIEC, 2019).

Contudo, em virtude de requisitos sanitários e qualitativos do produto, o Brasil ainda não atinge mercados de produtos mais nobres. Outros fatores como a sustentabilidade ambiental do setor e os cuidados com o bem-estar animal também são considerados nas transações, podendo significar barreiras não tarifárias (Brasil, 2014a).

A criação animal é amparada por três principais pilares: sanidade, genética e nutrição. Em relação à sanidade, o controle parasitário em bovinos tem demandado intensos esforços, tanto pelos produtores rurais, como pelas indústrias farmacêuticas, com diminuição de alternativas de antiparasitários para serem lançadas no mercado, já que para se realizar o descobrimento de novas moléculas demanda tempo e recursos financeiros (Geary; Thompson, 2003).

Os carrapatos são ectoparasitos relevantes para a saúde pública e sanidade animal, por transmitirem agentes infecciosos e ocasionarem danos a seus hospedeiros no decorrer da hematofagia (Trees, 1999; Blagburn; Dryden, 2009; Andreotti, 2010), pois se alimentam do sangue de um grande número de hospedeiros vertebrados (Flechtmann, 1973). Como consequência de seu comportamento hematófago, os carrapatos contraem uma grande variedade de micro-organismos que são transmitidos para seus hospedeiros, tornando-os assim importantes vetores de vários patógenos, incluindo protozoários, vírus e bactérias (Sonenshine; Roe, 2014).

Grandes infestações por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, o carrapato bovino, apresentam relação direta com o baixo ganho de peso ou até mesmo com a perda de peso dos hospedeiros, variando de acordo com a susceptibilidade da raça bovina (Brizuela et al., 1996). O *R. (B.) microplus* realiza também a transmissão biológica da “tristeza parasitária bovina (TPB)”, um complexo de doenças causadas por infecções parasitárias não contagiosas, com diferentes agentes etiológicos, gerando perdas econômicas no desenvolvimento da pecuária (Silva et al., 2021). Devido às condições climáticas favoráveis do Brasil, as doenças parasitárias, principalmente as que envolvem este ectoparasita, acabam sendo endêmicas, demandando um cuidado especial no manejo sanitário (Martins, 2006). As doenças transmitidas por carrapatos bovinos resultam em grandes perdas, tanto para o gado leiteiro como também para o gado de corte, especialmente em climas tropicais e subtropicais (Costa et al., 2016).

Na atualidade, o combate de carrapatos é baseado no uso de acaricidas em larga escala, o que propicia a crescente resistência dos parasitas aos diversos princípios ativos, sem solução satisfatória (FAO, 2004). É essencial que seja detectada a resistência logo que ela surgir, buscando a implementação de novas estratégias para mitigá-la, como combinações de drogas, visando garantir que as poucas existentes persistam em funcionamento (Vercruyse et al., 2011).

Outros problemas causados pelo uso destes compostos são a poluição ambiental, toxicidade para o hospedeiro e manejadores, e poder acumulativo de resíduos em produtos provenientes de animais e seus derivados (carne, leite, queijos, couro, lã) (de Castro, 1997; Catto et al., 2010). Apesar disso, os acaricidas químicos ainda são a principal ferramenta utilizada no controle de carrapatos (Andreotti, 2010).

Outros métodos de prevenção e controle de carrapatos também incluem vacinas contra os patógenos vetorizados por carrapatos (de la Fuente et al., 1999; Willadsen et al., 1995; Willadsen, 2006); métodos de controle biológico (Samish; Rehacek, 1999; Benjamin et al. al., 2002); além de estratégias de manejo integrado de pragas (Ghosh et al., 2006, 2007), que incluem instrumentos de controle fundamentadas em feromônios (Sonenshine, 2006). Além disso, o uso de repelentes e acaricidas contra os ectoparasitas é um modo tradicional de controle e manejo de carrapatos que afetam pessoas e animais (Debboun; Strickman, 2013; Lupi et al., 2013; Abdel-Ghaffar et al., 2015; Benelli, 2016; Benelli et al., 2016).

A resistência dos carrapatos aos acaricidas sintéticos promoveram a necessidade de novas pesquisas para desenvolvimento de formas alternativas para

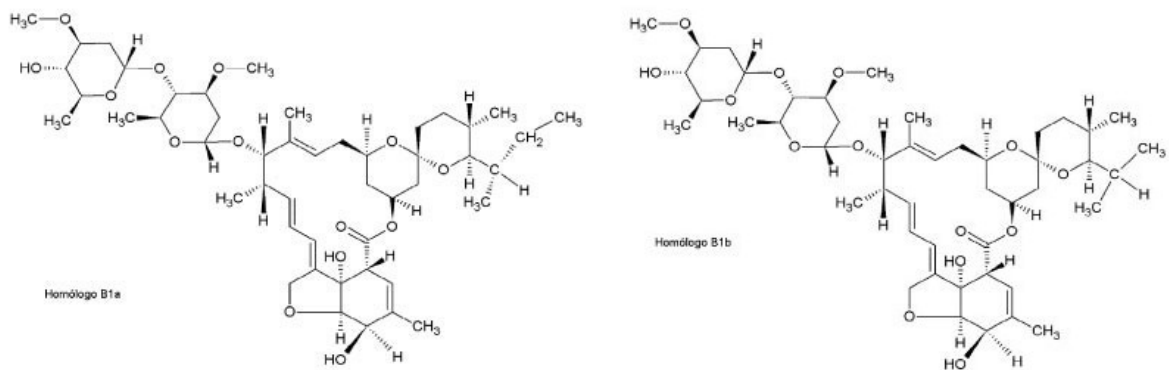
controle de carrapatos em bovinos. Uma alternativa que tem se mostrado promissora é o uso da nanobiotecnologia em formulações com bioativos acaricidas.

1.2. Compostos ativos utilizados no controle de ectoparasitas em veterinária

1.2.1. Ivermectina

A Ivermectina (IVM) (Figura 1) é um produto relativo ao grupo das lactonas macrocíclicas, desenvolvida inicialmente nos anos de 1970, no Japão, originário de fungos *Streptomyces avermitilis*, dando origem a uma nova classe, as avermectinas (Booth; McDonald, 1992). Seu mecanismo de atuação contra os parasitas acontece através do estímulo de liberação do neurotransmissor inibidor GABA (ácido gama-aminobutírico) na fenda sináptica entre interneurônios do cordão central e neurônios motores (McCall; Lindemann; Porter, 1996). A ivermectina é composta por uma mistura racêmica dos isômeros 22,23-di-hidroavermectina B1a e 22,23-di-hidroavermectina B1b.

Figura 1: Estruturas químicas das substâncias homólogas que compõem a Ivermectina



Deste modo, quanto mais elevada a liberação de GABA, mais elevada será a hiperpolarização do potencial de repouso normal das células pós-sinápticas, dificultando assim a neurotransmissão dos impulsos para os músculos periféricos (PIMPÃO et al., 2005). Assim sendo, perante a ação de uma quantidade mínima das avermectinas, os parasitas permanecem inertes, ocorrendo futuramente sua ejeção pelo organismo (Booth; McDonald, 1992).

A ivermectina vem sendo utilizada tanto no controle de vários endoparasitas e ectoparasitas, como na intervenção de infestações por sarnas sarcóptica, otodécica e demodécica (Booth; McDonald, 1992; Andrade; Rodrigues, 2002). As prováveis reações adversas ocasionadas pelo uso da Ivermectina são conhecidas e descritas em literatura médico-veterinária. Estas reações, quando a administração do fármaco ocorre por via oral, podem ser notadas em 24 horas, acarretando em: perda do controle motor provocando incapacidade de manter postura, membros cruzados e ataxia, fraqueza, letargia, perda de reflexos visuais, bradicardia, depressão respiratória, tremores, hipersalivação, midríase, coma e ocasionalmente a morte (Melo; Marques; Viana, 1995).

Atualmente há uma série de produtos desenvolvidos à base de ivermectina para o controle de parasitas externos e internos dos bovinos no Brasil, como se observa na Tabela 1.

Tabela 1: Produtos disponíveis no Brasil para uso em bovinos à base de ivermectina, concentração e método de aplicação e dose recomendada

Produto	Aplicação	Dose Recomendada
Ade Tec® 1%	Injetável	1 mL/50 Kg
Bimectin® 3,5%	Injetável	1 mL/50 Kg
Contratack® 3,15%	Injetável	1 mL/50 Kg
Evol® 0,8%	Injetável	1 mL/40 Kg
Fort Up® 1%	Injetável	1 mL/50 Kg
Ivergen® 1%	Injetável	1 mL/50 Kg
Ivermectina Of 1%	Injetável	1 mL/50 Kg
Ivomec® 1%	Injetável, Pour-On	1 mL/50 Kg
Longamectina® 3,5%	Injetável	1 mL/50 Kg
Master LP 4%	Injetável	1 mL/50 Kg
Mectimax® 2%	Injetável	1 mL/100 Kg
Megamectin® 1%	Injetável	1 mL/50 Kg
Puritec® 3,5%	Injetável	1 mL/50 Kg
Ranger® 1%	Injetável	1 mL/50 Kg
Supramec® 0,5%	Pour-On	1 mL/10 Kg

1.2.2 Óleos essenciais e seus constituintes

Os óleos essenciais são conhecidos por serem complexas substâncias voláteis e lipofílicas, comumente odoríferas e líquidas, originárias do metabolismo vegetal secundário (Millezi et al., 2013), sendo obtidos a partir de diferentes plantas aromáticas de áreas de clima temperado ou quente. Podem ser produzidos a partir de diferentes porções da planta, como brotos, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutos, raízes ou cascas, sendo acumulados em células secretoras, canais, cavidades, tricomas glandulares ou células epidérmicas (Bakkali et al., 2008).

Os óleos essenciais apresentam variações em sua composição química devido à influência de fatores diversos, tais como o período de coleta, as condições climáticas e de solo, a técnica de extração utilizada, e o órgão do vegetal do qual o óleo foi extraído (Rodrigues, 2010). Esses compostos são formados, essencialmente, por terpenos, ésteres e fenilpropanóides, além de outros elementos de menor peso molecular (Bakkali et al., 2008).

Os terpenos são compostos que apresentam múltiplas ações farmacológicas e biológicas, compostas por uma unidade básica nomeada de isopreno, que apresenta apenas em sua estrutura hidrogênio e carbono. Podem ser rotulados como monoterpenos, diterpenos, triterpenos, sesquiterpenos e sesterpenos, segundo a quantidade de átomos de carbono presentes na estrutura (Rodrigues, 2010). Estes compostos apresentam dentre suas diferentes atividades biológicas, a atividade repelente.

A aplicação de monoterpenos para o controle de insetos e pragas pode ocorrer pela carência de pesticidas menos danosos ambientalmente e que ofereçam menos impacto negativo à saúde comparados aos pesticidas sintéticos (Ibrahim *et al.*, 2001). Conforme Kelsey *et al.* (1984), as plantas produzem e exalam numerosos componentes voláteis a fim de se protegerem ou para atrair agentes de polinização. Diante disso, os óleos essenciais e seus constituintes são tidos como fontes potenciais de compostos biologicamente ativos, sobretudo contra micro-organismos, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos.

Devido aos problemas atuais relacionados com a resistência os produtos naturais podem ser alternativas viáveis e econômicas (Safaei-Cherehh et al., 2020). Óleos essenciais e extratos vegetais obtidos de diferentes partes de plantas têm apresentado efeitos promissores sobre os carrapatos, tanto efeito acaricida como de repelência (Nwanade et al., 2020). Esses produtos apresentam resultados que matam,

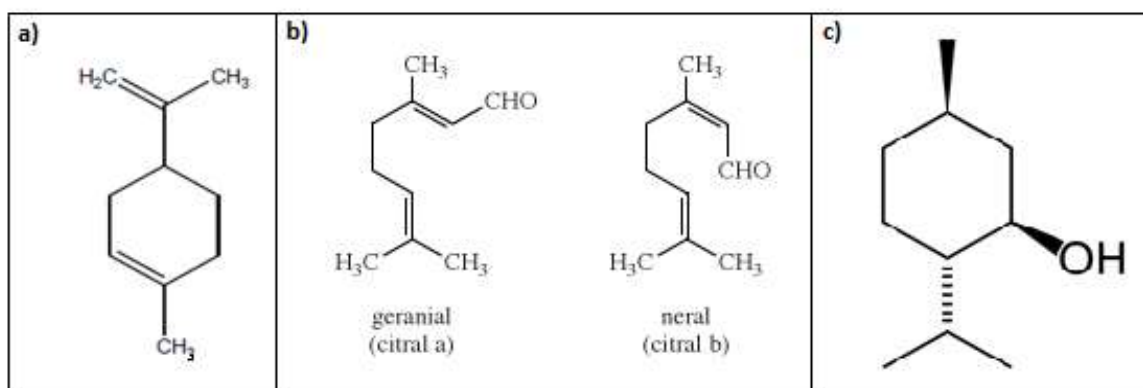
repelemr ou agem como inibidores da reprodução dos carrapatos (Nwanade et al., 2020). Desta forma, os acaricidas e repelentes botânicos se apresentam como uma alternativa de alto potencial aos acaricidas químicos para o controle de carrapatos.

1.2.3 Isolados vegetais

A partir de óleos essenciais é possível isolar compostos ativos como limoneno, citral e mentol, que possuem atividade acaricida e inseticida (Ibrahim *et al.*, 2001) e atividade antiparasitária (Rates, 2001), apresentando ação repelente contra larvas de carrapato, que não chegam a se estabelecerem no bovino, auxiliar no controle a ação hematófaga, transmissão da “tristeza parasitária bovina (TPB)” e danos no couro.

O Limoneno (LIM), 4-isoprenil-1-metil-ciclo-hexeno (Figura 2a), de fórmula molecular $C_{10}H_{16}$, é um monoterpreno monocíclico que compõe os óleos essenciais de diferentes espécies de plantas aromáticas, das quais destacam-se a *Lippia alba* e *Artemisia dracunculus*, além de poder também ser identificado em óleos essenciais de cítricos como laranja, limão e tangerina (Amaral, et al, 2007). Por apresentar odor cítrico característico, o Limoneno é amplamente utilizado como fragrância em sabonetes, perfumes, bebidas e alimentos (Sun, 2007). O Limoneno pode ser empregado como inseticida para o controle de ectoparasitas em animais, com ação contra ácaros, insetos e micro-organismos (Hollingsworth, 2005). O limoneno figura entre os óleos essenciais de frutas cítricas, revelando ação anti-inflamatória, antioxidante e antifúngica (Singh *et al.*, 2010).

Figura 2: Estrutura química dos isolados vegetais: a) Limoneno, b) Citral, c) Mentol



O Citral (CIT), 3,7-dimetil-2,6-octadienal (Figura 2b), de fórmula molecular $C_{10}H_{16}O$, é um monoterpenóide oriundo da mistura de 2 isômeros, o geranial (Citral A) e o neral (Citral B). Também conhecido como Lemonal, o Citral possui grande uso na indústria farmacêutica e podem servir de matéria de partida para produção de compostos relevantes como a vitamina A, iononas e metil-iononas (Prins *et al.*, 2008).

O Mentol (MEN), 5-metil-2-isopropilciclo-hexanol (Figura 2c), de fórmula molecular $C_{10}H_{20}O$, é um álcool terpênico cíclico, que apresenta ampla aplicação nas indústrias de cosméticos, farmacêutica e alimentícia (Sanganeria, 2005), além de apresentar atividade antimicrobiana e digestiva (Lorenzi; Mattos, 2008).

1.3 Nanotecnologia aplicada à veterinária

O emprego da nanotecnologia na área veterinária permite contribuir no progresso de uma nova geração de produtos veterinários, de modo a elevar a ação destes, além de diminuir prováveis efeitos tóxicos em animais e de diminuir a possibilidade de contaminação ambiental causada pela utilização ininterrupta destes compostos. O emprego da nanotecnologia possibilita o aumento do tempo de meia-vida dos medicamentos, permitindo que haja a melhoria da internalização dos mesmos, diminuindo sua degradação e sua eliminação, fornecendo mecanismos de liberação lenta dos medicamentos carregados (El-Sayed; Kamel, 2020).

Diversos benefícios advindos da associação de um composto bioativo a sistemas nanoestruturados podem ser destacados, como por exemplo, a aplicação racional destes compostos, visto que tanto o número de doses como a concentração podem ser diminuídos durante o tratamento. Além disso, existe a perspectiva de aplicação em novas vias de administração, a redução na produção de resíduos em produtos de origem animal, redução do estresse ocasionado pela aplicação medicamentosa, a diminuição de toxicidade e efeitos adversos, assim como a aplicação de novas moléculas na terapêutica animal (Brandão *et al.*, 2011).

Embora a nanotecnologia esteja em amplo avanço, é necessário o desenvolvimento de muitas pesquisas para que essa tecnologia se torne comum dentro da medicina veterinária. Os sistemas nanocarreadores de compostos bioativos, como as nanopartículas já permitem que a medicina veterinária reveja os métodos terapêuticos para as doenças que desafiam a ciência, utilizando uma abordagem diferente, aumentando seu armamento farmacêutico. A aplicação da nanotecnologia

à medicina veterinária propicia uma oportunidade de melhorar a administração de medicamentos, vitaminas, minerais e vacinas por métodos adequados para aplicação em massa, em sistemas de produção de animais. Também possibilita o uso de testes para diagnósticos rápidos e sensíveis para muitas doenças veterinárias *in situ*, oferecendo assim, maior potencial para melhorar o manejo e a produtividade do rebanho (Underwood; Van Epa, 2012).

O desenvolvimento de sistemas nanocarreadores auxilia os inseticidas naturais utilizados no controle de doenças em animais a superar limitações, como fotossensibilidade, termossensibilidade e degradação por micro-organismos. Quando estes sistemas são utilizados com produtos sintéticos, além de superar as limitações supracitadas, também podem ajudar a superar os problemas e efeitos colaterais causados no meio ambiente e à saúde do animal (Roy; Bajpai; Bajpai, 2009; Irache et al., 2011).

As nanopartículas utilizadas na biologia foram desenvolvidas para diversas aplicações na medicina, incluindo doenças infecciosas. O desenvolvimento de nanopartículas nessa área tem sido benéfico devido ao seu efeito antimicrobiano seletivo com baixa toxicidade contra o hospedeiro e sua capacidade de colocar sua ação em alvos específicos (Torres-Sangiao; Holban; Gestal, 2016). Os sistemas de transporte são utilizados focando na entrega e na estabilização de drogas bioativas e moléculas antimicrobianas, garantindo tanto sua especificidade, como também a liberação controlada (Holban; Gestal; Grumezescu, 2016). O revestimento de dispositivos médicos é uma grande vantagem no campo de doenças infecciosas, por exemplo, superfícies e dispositivos nanomodificados provaram ser muito eficientes para reduzir a fixação microbiana e a formação de biofilme (Holban; Gestal; Grumezescu, 2014; Lara et al., 2015).

A nanotecnologia também possibilita o desenvolvimento de veículos de entrega para antígenos de vacinas, apresentando vantagens, pois limitam os efeitos colaterais adversos, melhoram a estabilidade e também podem estimular a resposta imune, de forma que adjuvantes ou administração repetida não sejam necessários (Shams, 2005; Calderon-Nieva et al., 2017). Combinada à nanotecnologia, a imunização da mucosa sem agulha, utilizando-se a via nasal ou pulmonar, pode facilitar a vacinação, garantindo proteção suficiente contra doenças que podem causar sérias perdas econômicas ao produtor (Calderon-Nieva et al., 2017). A vacinação nasal e a pulmonar (via inalação) são atraentes em razão do fácil acesso, à alta vascularização

e permeabilidade e ao metabolismo limitado na cavidade nasal (Bitter; Suter-Zimmermann; Surber, 2011; Calderon-Nieva et al., 2017).

A pesquisa de nanopartículas apresenta grande interesse à ciência, pois pode ser usada em vários campos, como medicina, veterinária, indústria alimentícia, manufatura dentre outros. As nanopartículas estão se tornando mais atraentes à medida que novas utilizações, de diagnósticos médicos a veículos de terapia gênica, são descobertas.

As nanopartículas metálicas têm apresentado resultados promissores na busca de novas alternativas para o controle de doenças que acometem o gado. Demenev et al. (1996), mostraram pela primeira vez a possibilidade de usar partículas de ouro coloidal como parte de uma vacina antiviral como portadores do antígeno proteico da cápside do vírus da encefalite transmitida por carrapatos. Segundo os autores, a vacina experimental oferecida tinha propriedades protetoras mais altas que seus análogos comerciais, apesar do fato de a vacina não conter adjuvantes. A partir deste estudo, diferentes pesquisadores buscaram o desenvolvimento de novas vacinas para o combate de diferentes doenças ocasionadas por diferentes patógenos, onde antígenos e haptenos foram conjugados com nanopartículas de ouro para utilização na imunização de animais (Dykman; Khlebtsov, 2017). A eficácia dos produtos fitoterápicos pode ser melhorada, como o tratamento recente de nanopartículas de prata antiparasitas usando *Cissus quadrangularis* contra *Hippobosca aculata* e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Santhoshkumar et al., 2012).

Outro tipo de nanopartículas utilizadas são as peguiladas ou polyplex, que oferecem a possibilidade de promover o aumento da biodistribuição de compostos encapsulados. As nanopartículas podem ajudar a medicina veterinária no tratamento em massa de ectoparasitas, facilitando a interação fármaco-parasita (Cruz; Molento, 2015).

Assim, a pesquisa de nanopartículas apresenta grande interesse à ciência, pois pode ser usada em vários campos, como medicina, veterinária, indústria alimentícia, manufatura dentre outros. Esses materiais podem ser usados com propósitos benéficos, mantendo as propriedades e funções iniciais (Bhati-Kushwaha; Malik, 2014).

1.3.1 Produtos comercializados e patentes à base de nanotecnologia

O levantamento de produtos foi realizado usando o mecanismo de pesquisa Nanotechnology Products Database, que fornece estatísticas mais recentes sobre produtos à base de nanotecnologia disponíveis nos mercados de todo o mundo. O resultado está demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2: Produtos à base de nanotecnologia disponíveis nos mercados de todo o mundo, composição, aplicação e país de origem

Produto	Composição	Aplicação	País
MagicAgro®	Dióxido de titânio	Antimicrobiano e esterilizante	Irlanda
Nanonip®	Nanopartícula de prata	Antibacteriano e antifúngico	Irã
APA Ceftiofur S	Cloridrato de Ceftiofur	Antibiótico	Vietnã
APA Tylo do P	Tartarato de tilosina, e Hyclate de doxiciclina	Prevenção e tratamento de doenças respiratórias	Vietnã
APA Perin	Permetrina	Tratamento de ectoparasitas	Vietnã
APA Toltra 5 S	Toltrazuril	Antiparasitário	Vietnã
APA IVE NITRO I	Ivermectina e nitroxinil	Combate a nematoides intestinais e ectoparasitas	Vietnã
APA AMOX P	Amoxicilina tri-hidratada	Antibacteriano	Vietnã
APA CALCI BS S	Fosfato tricálcico, vitamina A, vitamina D3, vitamina E	Suplementação nutricional	Vietnã
TraumaPet® Gel Ag	Nanopartícula de prata	Antibacteriano e fungicida	República Checa
ASAP Pet Shield®	Nanopartícula de prata	Antibacteriano e fungicida	EUA

Neuna Forte®	Nanopartícula de prata	Suplementação nutricional	Índia
LifeTide® SW 5	Plasmídeo de DNA	Tratamento para aumentar o número de animais desmamados	EUA
Nanosept®	Nanopartícula de prata	Desinfetante	Hungria
ECS®	Nanopartícula de prata	Desinfetante	Malásia
DoxSorb®	Dióxido de silício	Desinfetante e antibacteriano	Taiwan
Diapreven®	Dióxido de silício	Desinfetante e antibacteriano	Taiwan
Doxvire®	Dióxido de silício	Desinfetante e antibacteriano	Taiwan
Doxfunina®	Dióxido de silício	Desinfetante e antibacteriano	Taiwan
Arcavit® L Forte	Complexo nanoencapsulado de vitaminas, aminoácidos e oligoelementos	Suplementação nutricional	Itália
Arcavit® WP	Complexo nanoencapsulado de vitaminas, aminoácidos, oligoelementos e extrato botânico	Suplementação nutricional	Itália
SomGuard®	Nanopartícula de prata	Desinfetante e biocida	Índia
Acurosil®	Nanopartícula de prata	Antibacteriano e desinfetante	Índia
Viroclean®	Dióxido de silício	Desinfetante	Taiwan
agpure®	Nanopartícula de prata	Antibacteriano e fungicida antialérgico	Alemanha

Fonte: Nanotechnology Products Database.

Realizou-se também um levantamento sobre as patentes existentes a partir de 2015, pertinentes ao uso da nanotecnologia relacionadas às ciências veterinárias. Utilizou-se a base de dados de pesquisa de patentes descrito por Derwent Innovations Index (Thomson Reuters, 2020). Os resultados são demonstrados na Tabela 3, onde se observa produtos destinado à nutrição, tratamento e diagnóstico, vacina, antiparasitário, fabricação de medicamentos e usos gerais em ciências e medicina veterinárias.

Tabela 3: Termos pesquisado, número de patente, detentores, inventores e usos indicados de patentes registradas

Termo pesquisado	Número de patente	Detentores	Inventores	Uso indicado
Veterinary nanotechnology	RU2708616-C1	KROLEVETS A.A.	KROLEVETS A.A.	Ciências Veterinárias
	RU2703269-C1	KROLEVETS A.A.	KROLEVETS A.A.	Ciências Veterinárias
	RU2699788-C1	KROLEVETS A.A.	KROLEVETS A.A.	Ciências Veterinárias
	RU2688146-C1	KROLEVETS A.A.	KROLEVETS A.A.	Medicina Veterinária
	RU2691391-C1	KROLEVETS A.A.	KROLEVETS A.A.	Ciências Veterinárias
	RU2688148-C1	KROLEVETS A.A.	KROLEVETS A.A.	Medicina Veterinária
	RU2666596-C1	KROLEVETS A.A.	KROLEVETS A.A.	Medicina Veterinária
	RU2644826-C1	RUSSIAN SCI RES AGRO - ENG CENT VIM	LYUBIMOV, V.E.; OSIPOV, V.I.; ROMANOV, D.V.; TSOI YU, A.	Medicina Veterinária

Animal nutrition and nanotechnology	RU2592202-C1	UNIV BELGOROD NAT RES	KROLEVETS A.A.; BOGACHEV I.A.; ANDREENK OV V.S.	Nutrição
Veterinary vaccines and nanoparticle	WO2019141814-A1	ETHERNA IMMUNOTHE RAPIES NV	DE KOKER, S.; BEVERS, S.; TOMME, P.	Vacina
	BE1022446-A1	UNIV YALE	BUCALA, R.; GEALL, A.	Antiparasitáriu
	WO2015144732-A2; WO2015144732-A3; EP3122774-A2;	UNIV YALE, GLAXOSMITH KLINE BIOLOGICALS SA	BUCALA, R.; GEALL, A.	Antiparasitáriu
	US2017106070-A1			
	WO2015017280-A1; EP3027205-A1; US2016166663-A1; EP3027205-A4; US10195257-B2	QANTU THERAPEUTICS INC	MARCIANI, D.J.	Vacina
Animal diagnosis and nanoparticle	WO2018033744-A1	GLOBALACORN LTD, UNIV TECHNICKA V LIBERCI, VU VETERINARNI HO LEKARSTVI, UNIV PALACKEHO V OLOMOUCHI	MASEK, J.; LUKAC, R.; RASKA, M.; KNOTIGOVA, P.T.; TURANEK, J.; LUBASOVA, D.; MILLER, A.D.	Diagnóstico

	US2018064347- A1; WO2018049172- A1	PENN STATE RES FOUND	ADAIR, J.H.; KNECHT, S.D.; BOYER, J.E.; TUTWILER, R.L.; CARR, C.; TANG, X.; ADAIR, B.M.; NEUBERGER, T.; LOC, W.S.; WILCZYNSKI, Z.R.; MCGOVERN, C.; MATTERS, G.L.; CHENG, K.; KESTER, M.; SINOWAY, L.	Diagnóstico
	WO2015019297- A1; EP3030516- A1; US2016175254- A1; EP3030516- B1; ES2639499- T3; ZA201601483- A	UNIV ZULULAND	DUNPALL, R.; REVAPRASA DU, N.	Diagnóstico
Animal diagnosis and nanoparticle	WO2015075442- A1; CA2930815-A; EP3071183-A1; US2016296465- A1; CN106102714- A; JP2016539114- W; US10441529- B2; JP6595991-B2	ISIS INNOVATION LTD	KWAN, J.; MYERS, R.; COUSSIOS, C.; SHAH, A.	Tratamento e diagnóstico

	WO2017035009-A1; US2018243216-A1	METHODIST HOSPITAL; SERDA, R.E.; MERAZ, I.M.	SERDA, R.E.; MERAZ, I.M.	Fabricação de medicamentos
Nanotechnology and animal products	CN110302372-A	SHANGQIU MEILAN BIOLOGICAL ENG CO LTD	HAN, Y.; YAO, F.; WANG, S.; ZHANG, N.; MENG, X.; JIAO, J.; LI, G.; HUANG, X.	Vacina

Fonte: Derwent Innovations Index.

Embora o uso de sistemas nanoestruturados na medicina veterinária apresente vantagens, há necessidade do emprego de materiais de fontes renováveis e que não levem ao surgimento de resíduos perigosos (Nath; Banerjee, 2013). Assim, a produção de nanomateriais deve se basear na química e na nanotecnologia verde, utilizando-se solventes seguros e polímero biodegradáveis, biocompatíveis e de baixa toxicidade, como é o caso da zeína (Luo; Wang, 2014).

1.3.2 Nanopartículas de zeína

A zeína, proteína encontrada no milho, representa cerca de 50% das proteínas totais presentes neste grão, mais especificamente “zeína” é o nome de uma proteína do endosperma, a qual confere sua dureza (Shukla; Cheryan, 2001). A zeína pertence à classe das prolaminas, que ocorrem especificamente em cereais (a exemplo da hordeína na cevada e gliadina no trigo) (Paliwal; Palakurthi, 2014). A zeína compreende uma mistura de vários polipeptídeos e foi identificada em quatro classes principais: α -zeína, β -zeína, γ -zeína e δ -zeína, sendo a α -zeína a maior representante deste grupo com cerca de 70-85%. Esta classificação é realizada com base na solubilidade, peso molecular e estrutura de cada fração (Girija Aswathy et al., 2012; Zhang et al., 2015).

A zeína pode ser classificada no grupo das prolaminas, sendo estas representadas pela elevada taxa de aminoácidos apolares, fornecendo estrutura molecular hidrofóbica, com solubilidade em álcool para sua extração (Shukla; Cheryan, 2001). A concentração de zeína pode condizer a uma concentração de até 60% da totalidade da concentração de proteínas encontradas no grão de milho e é

descrita conforme sua semelhança em massa molecular, solubilidade em solventes e estrutura em quatro subclasses: alfa, beta, gama e delta, onde comumente a alfa-zeína se apresenta em maior quantidade, também podendo existir modificações na composição em genótipos diferentes de milho (Papalia; Londero, 2015).

A alfa-zeína se define pela grande quantidade de aminoácidos hidrofóbicos (alanina, leucina e prolina), a beta-zeína apresenta taxas elevadas de aminoácidos sulfurados, a gama-zeína é constituída por resíduos de prolina, enquanto que a delta-zeína apresenta em sua composição aminoácidos sulfurados além de prolina e leucina (Larkins et al., 1993; Oliveira et al., 2004; Papalia; Londero, 2015).

A quantidade elevada de aminoácidos não polares (glutamina-20%, leucina-20%, alanina-14%, prolina-9%), torna a zeína não solúvel em água pura ou álcool, mas permite que seja solúvel em soluções de álcool 80-90% e também em acetona. A zeína, por apresentar resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos distribuídos em sua estrutura, é uma proteína anfifílica, contudo se comporta como uma proteína hidrofóbica (Sousa et al., 2013).

A zeína, por apresentar grau elevado de polimerização e propriedades isolantes, destaca-se por seu uso na preparação de filmes para a preservação de alimentos perecíveis e no desenvolvimento de micro e nanocápsulas na indústria farmacêutica (Papalia; Londero, 2015). As características da zeína possibilitam a elaboração de sistemas coloidais, com distintas formas e estruturas, incluindo filmes, micelas, nanopartículas, fibras e géis (Paliwal; Palakurthi, 2014). Dessa forma, a zeína é um alvo de grande interesse científico, focado na elaboração de sistemas de entrega de nutrientes e fármacos, para áreas como a ciência de alimentos, farmacêutica e biomedicina (Shukla; Cheryan, 2001; Kim; Xu, 2008; Luo; Wang, 2014).

Existem muitas metodologias descritas na literatura para a preparação de nanopartículas de zeína utilizadas para carregamento de diferentes compostos ativos (Pascoli et al., 2018), incluindo nanoprecipitação, dispersão líquido-líquido, separação de fases e eletropulverização. As técnicas de encapsulamento são métodos atrativos baseados em processos de precipitação (Tarhini; Greige-Gerges; Elaissari, 2017). Apesar da eficácia dos métodos existentes para o preparo de nanopartículas de zeína, ainda existem desafios consideráveis em relação à estabilidade química desses sistemas sob diferentes condições de armazenamento (Li et al., 2013; Park; Park; KIM, 2015). Chen e Zhong (2014) estudaram dispersões de nanopartículas de zeína e concluíram que elas apresentavam baixa estabilidade coloidal, formando

prontamente agregados e precipitados nas formulações, perdendo sua funcionalidade.

Tendo em vista que a tecnologia de nanoencapsulação em partículas de zeína oferece considerável potencial para o desenvolvimento de formulações capazes de melhorar as propriedades dos compostos encapsulados, é essencial o desenvolvimento de estratégias para possibilitar a melhorar da estabilidade química e estender a vida útil desses sistemas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Esta tese teve como objetivo principal preparar, caracterizar e desenvolver sistemas nanocarreadores a partir de zeína, utilizando isolados vegetais em associação à Ivermectina.

2.2 Objetivos específicos

Esta tese apresenta os seguintes objetivos específicos:

- Desenvolvimento de metodologia analítica para quantificação da Ivermectina e dos isolados vegetais citral, limoneno e mentol, através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Preparo de sistemas nanocarreadores contendo combinações de Ivermectina e dos isolados vegetais citral, limoneno ou mentol;
- Caracterização e avaliação da estabilidade físico-química dos sistemas nanocarreadores desenvolvidos, avaliando: pH, diâmetro médio, polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulação em função do tempo;
- Investigação de toxicidade utilizando o organismo de solo *Caenorhabditis elegans*, a fim de verificar o mecanismo de interação entre o sistema nanocarreador e o nematoide, para avaliação de possíveis impactos a organismos não-alvos;
- Avaliação de atividade acaricida e repelente na espécie alvo: carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais

- Ivermectina - doado pela Ipanema Ind. Produtos Veterinários
- Ivomec[®] 1% injetável- Merial[®]
- Citral - Sigma[®]
- Limoneno - Sigma[®]
- Mentol - Sigma[®]
- Zeína - Sigma[®]
- Pluronic F-68 – Sigma[®]
- Clorofórmio (grau espectroscópico analítico) - Merck[®]
- Álcool etílico - Merck[®]
- Acetonitrila (grau HPLC) – JT Baker[®]
- Metanol (grau HPLC) – JT Baker[®]
- Filtros de 45µm - Millipore[®]
- Dispositivos de ultrafiltração de celulose regenerada de 30 kDa-Milipore[®]
- Agitador magnético - Tecnal[®]
- Microcentrífuga - MiniStar[®]
- Analisador de partículas Zetasizer Nano ZS 90 - Malvern[®]
- Analisador de partículas NanoSight LM10 - Malvern[®]
- pHmetro – MS Technopon[®]
- Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - UltiMate™ 3000 RSLCnano LC System - ThermoScience[®]
- Coluna cromatográfica Varian[®] C18, fase reversa, 5µ 110A, 250x4,60mm
- Coluna cromatográfica Phenomenex[®], Gemini-NX C18, 5µ 110A, 150x4,60mm
- Injetor manual
- Software Galaxie Workstation
- Programa estatístico GraphPad Prism 7

3.2 Metodologia analítica para quantificação dos compostos ativos

A quantificação dos compostos ivermectina, citral, limoneno e mentol foi executada por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Através de ajuste do método cromatográfico ideal, construiu-se a curva analítica para cada composto estudado, a fim de quantificar a eficiência de encapsulação destes nos

sistemas nanocarreadores. As condições cromatográficas para ivermectina, citral, limoneno e mentol estão expostas na Tabela 4.

Tabela 4: Condições cromatográficas dos compostos estudados

Ivermectina	
Fase móvel	Acetonitrila/Água/Metanol (250:90:10) (v/v/v)
Volume de injeção	100 µL
Fluxo	1,5 mL/min
Temperatura	Ambiente (25°C)
Detector	Ultravioleta (UV), $\lambda = 246$ nm
Coluna Cromatográfica	Varian®, C ₁₈ , 5 µm, 110A, 250 x 4,60 mm
Citral	
Fase móvel	Acetonitrila/Água (70:30) (v/v)
Volume de injeção	100 µL
Fluxo	1,0 mL/min
Temperatura	Ambiente (25°C)
Detector	Ultravioleta (UV), $\lambda = 233$ nm
Coluna Cromatográfica	Phenomenex® Gemini-NX, C ₁₈ , 5 µm, 110A, 150 x 4,60 mm
Limoneno	
Fase móvel	Metanol/Água (85:15) (v/v)
Volume de injeção	20 µL
Fluxo	1,0 mL/min
Temperatura	Ambiente (25°C)
Detector	Ultravioleta (UV), $\lambda = 204$ nm
Coluna Cromatográfica	Phenomenex® Gemini-NX C ₁₈ 5µ 110A, 150 x 4,60 mm
Mentol	
Fase móvel	Metanol/Água (70:30) (v/v)
Volume de injeção	20 µL
Fluxo	1,0 mL/min
Temperatura	Ambiente (25°C)

Detector	Ultravioleta (UV), $\lambda = 270$ nm
Coluna Cromatográfica	Phenomenex® Gemini-NX C ₁₈ 5 μ 110A, 150 x 4,60 mm

3.2.1 Validação da metodologia de quantificação dos compostos ativos

A validação de um método possibilita demonstrar que este é adequado ao uso desejado. As características principais para a validação de um método analítico são: exatidão, linearidade, precisão, limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD), (Valentini; Sommer; Matioli, 2013). Desta forma, neste trabalho a metodologia de quantificação dos ativos foi avaliada seguindo instruções dos documentos de caráter orientativo do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO, 2011) e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 2003).

3.2.2 Seletividade

A especificidade ou seletividade é um parâmetro que se relaciona com a capacidade de uma metodologia analítica em distinguir e aferir o composto de interesse (analito) na presença de interferentes (Brasil, 2003; INMETRO, 2011). Para esta avaliação, foram realizadas injeções dos compostos utilizados no preparo dos sistemas nanocarreadores sem a adição dos isolados vegetais.

3.2.3 Linearidade

O parâmetro linearidade aponta se o resultado do ensaio alcançado é diretamente proporcional a concentração do analito na amostra. Recomenda-se que estes estudos sejam realizados em um período de concentrações de pelo menos cinco concentrações diferentes. O coeficiente de correlação (r), parâmetro indicativo de qualidade da curva, é apresentado pela equação matemática obtida por métodos estatísticos adequados, permitindo avaliar a razão entre a área dos picos dos padrões com os valores dos padrões utilizados. O valor mínimo admissível do coeficiente de correlação (r) deve ser = 0,99 (Brasil, 2003; INMETRO, 2011).

3.2.4 Limite de Detecção e Quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) são obtidos para se designar a capacidade analítica na determinação qualitativa e quantitativa de compostos químicos em uma determinada matriz, onde o LD (equação 1) é a menor

quantia de substância que se pode detectar em uma amostra, porém não essencialmente quantificada como valor exato; já o LQ (equação 2) indica a menor concentração de analito que pode se quantificar em uma amostra, com aceitáveis exatidão e precisão (Brasil, 2003; INMETRO,2011).

$$LD = \frac{DP \times 3}{IC} \quad (1)$$

$$LQ = \frac{DP \times 10}{IC} \quad (2)$$

onde, DP é o desvio padrão do coeficiente linear com o eixo y e IC é a inclinação da curva analítica média.

3.3 Preparo de nanopartículas de zeína contendo ingredientes ativos

As nanopartículas de zeína foram preparadas conforme o método de precipitação com anti-solvente descrito por HU e McClements (2014), com modificações. Inicialmente, uma solução de zeína (2% p/v) foi preparada em solução hidroetanólica (85% v/v) e mantida sob agitação durante a noite (overnight). A solução de zeína então foi centrifugada por 30 minutos a 4.500 rpm e posteriormente submetida a um tratamento térmico (15 minutos a 75 °C). Finalmente, a solução foi filtrada utilizando-se filtros de seringa (0,45 µm - Milipore).

Para preparar as nanopartículas contendo os compostos ativos, 600 mg de cada ativo foram adicionados a 10 mL da solução de zeína. Foram preparadas formulações contendo a mistura de Ivermectina com Citral (NPZ_IVM+CIT), a mistura de Ivermectina e Mentol (NPZ_IVM+MEN), e a mistura de Ivermectina e Limoneno (NPZ_IVM+LIM), todas as formulações contendo 2% (p/v) de cada composto ativo. Foi preparada uma solução aquosa de Pluronic F68 a 2% (p/v) e o pH foi ajustado para 4,0. Com o apoio de uma seringa, a solução de zeína contendo os ativos (10 mL) foi rapidamente injetada na solução de Pluronic F68 sob agitação magnética. A dispersão coloidal foi agitada para evaporação do etanol, sob temperatura ambiente. Nanopartículas de controle também foram preparadas sem a adição dos compostos ativos na solução de zeína.

3.4 Estabilidade físico-química

A fim de mensurar a estabilidade das formulações de nanopartículas de zeína, foram determinadas algumas propriedades físico-químicas, tais como tamanho

(diâmetro hidrodinâmico), polidispersão, potencial zeta, pH e eficiência de encapsulação em função do tempo (0, 7, 15, 30, 60 e 90 dias). Foram efetuadas análises estatísticas por ANOVA seguida de teste de Tukey com significância $p < 0,05$ empregando o programa GraphPad Prism 7.

3.4.1. Diâmetro hidrodinâmico e polidispersão

3.4.1.1. Espectroscopia de correlação de fótons

Para realizar a avaliação do tamanho médio (diâmetro hidrodinâmico) e da distribuição de tamanho das nanopartículas (polidispersão), foi empregada a técnica de espectroscopia de correlação de fótons (ECF), também intitulada como Dynamic Light Scattering (Dispersão de luz dinâmica). Para isso, as nanopartículas foram diluídas (1000 vezes) em água deionizada e utilizando-se o analisador de partículas ZetaSizer Nano ZS 90 (Malvern®) a um ângulo fixo de 90 °, a temperatura ambiente (25°C), obtendo-se a distribuição de tamanho pelo índice de polidispersão (PDI). O resultado foi demonstrado como média de três determinações.

3.4.1.2 Rastreamento de nanopartículas

A metodologia de rastreamento de nanopartículas foi empregada para determinar a distribuição de tamanho e a concentração das nanopartículas. Para realizar esta análise utilizou-se uma célula NanoSight LM 10 (laser verde, 532 nm) e uma câmera sCMOS e software NanoSight (versão 3.1). As suspensões de nanopartículas foram diluídas (1500 vezes) em água deionizada, sendo realizadas análises em triplicata para cada amostra. Foram realizados 5 vídeos de 90 segundos, onde para cada vídeo o conteúdo da célula foi deslocado, utilizando-se no total 1 mL da amostra diluída. O equipamento foi ajustado para que as leituras fossem realizadas a 25°C (Anderson et al., 2013).

3.4.2. Potencial Zeta

Segundo Greenwood (2003), quando em contato com a água, as nanopartículas adquirem uma carga na superfície no entorno da partícula e esta carga de superfície pode ser medida em mV, empregando-se o analisador Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern®). As análises foram realizadas com a diluição das formulações em água deionizada pura (1:1000 v:v), sem ajuste de pH, à temperatura ambiente (25 °C) e os resultados foram apresentados como médias de três determinações.

3.4.3. Análises do pH

Monitorar o pH é importante para avaliar a estabilidade das formulações. As alterações sofridas pelo pH podem apontar a degradação do polímero ou de outros componentes presentes na formulação. O pH foi medido durante 120 dias em um potenciômetro (Tecnal[®]), calibrado com soluções tampão em pH 4,0 e 7,0.

3.4.4 Eficiência de encapsulação dos ativos nas formulações e Eficiência de carregamento de droga (Drug Loading)

A quantidade dos compostos encapsulados às nanopartículas foi determinada através do método de ultrafiltração/centrifugação, que se fundamenta em submeter à suspensão de nanopartículas à centrifugação em instrumentos de ultrafiltração compostos por celulose regenerada de 10 kDa (Microcon – Millipore[®]) e quantificar o ultrafiltrado através da técnica de CLAE (Gamisans et al., 1999; Schaffazick et al., 2003; Kilic et al., 2005), como descrito no item 3.2.

A técnica se baseia no fato em que somente o ativo que está livre irá transpor a membrana de celulose. Logo, através da diferença entre a quantidade de fármaco empregada (100%) e a quantidade não associada às nanopartículas, conseguimos precisar a eficiência de fármaco encapsulado nas nanopartículas.

A eficiência de encapsulação (% EE) foi determinada por meio da equação (3):

$$\%EE = \frac{A}{B} \times 100 \quad (3)$$

onde A representa a quantidade encapsulada do ativo nas partículas e B a quantidade de ativo inicialmente adicionada às formulações.

Já a Eficiência de Carregamento de Drogas, conhecida também como *Drug Loading*, corresponde à capacidade de carga de medicamentos que uma determinada partícula possui, onde uma alta capacidade de carregamento de drogas de um sistema de administração de medicamentos é sempre preferida, pois permite minimizar o uso de polímeros (HUANG et al., 2018). A eficiência de carregamento de droga (%ECD) pode ser calculada através da equação (4):

$$\%ECD = \frac{A}{c} \times 100 \quad (4)$$

onde A representa a quantidade encapsulada do ativo nas partículas e C a quantidade inicial de ativos somado a quantidade de excipientes.

3.5 Avaliação *in vitro* de toxicidade em organismo não-alvo

Essa etapa foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Toxicologia em *Caenorhabditis elegans* (GBToxCe) da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Uruguai/RS, sob a orientação da Dr^a. Daiana Silva Ávila.

Para os testes de avaliação de toxicidade em organismo não-alvo, foram utilizados *Caenorhabditis elegans* da linhagem Bristol N2 (tipo selvagem), obtidos do Caenorhabditis Genetics Center (CGC). Os mesmos foram mantidos em meio NGM (meio de crescimento para nematoides) com *Escherichia coli* OP50 como fonte de alimento, sob temperatura constante de $\pm 21^{\circ}\text{C}$ (Brenner, 1974).

Para obtenção das populações na fase larval L1, foi realizado o rompimento da cutícula dos nematoides hermafroditas grávidos utilizando uma solução de lise (1% NaOCl; 0,25M NaOH e água destilada) para a liberação dos ovos e posterior eclosão desses nematoides (Stiernagle, 1999). Posteriormente, foi feita a curva de sobrevivência a partir de diferentes concentrações da formulação comercial Ivomec[®], através de diluições em água destilada, com o intuito de se obter a faixa adequada de trabalho, obtendo a CL50%, que indica a concentração de um produto que leva à morte de 50% dos indivíduos num tempo pré-estabelecido (Queiroz, 2015). Para isso 1500 vermes no estágio larval L1 foram expostos a um tratamento agudo (30 minutos) com as formulações (Ivomec[®] e nanoformulações) em microtubos (grupo tratado) ou a água destilada (grupo controle). Em seguida, para a remoção do tratamento, os microtubos foram centrifugados a 7000 rpm por 3 min, e realizadas três etapas de lavagem com tampão M9. Por fim, o excesso de sobrenadante foi retirado e os nematoides colocados em placas com o meio NGM e a bactéria *E. coli* OP50 como fonte de alimento. Com *C. elegans* no estágio larval L4 (48 horas após o tratamento), o número de nematoides sobreviventes foi contabilizado e a porcentagem em relação ao controle (grupo não-tratado) foi utilizada para determinação da taxa de sobrevivência. O ensaio foi realizado em duplicata e repetido no mínimo 3 vezes.

Realizou-se também o ensaio de tamanho da ninhada (Brood size), onde *C. elegans* foram expostos às nanoformulações para serem avaliados durante todo seu período reprodutivo (4 dias). Para isso um *C. elegans* no estágio L4, de cada grupo de tratamento, foi transferido para uma nova placa contendo o meio NGM e a presença

de bactérias *E. coli* OP50. Durante 4 dias, os *C. elegans* foram transferidos diariamente para novas placas, até o fim do período reprodutivo. Após 48 horas, o número de larvas foi contabilizado e os grupos tratados foram comparados ao controle (água destilada). O ensaio foi realizado em duplicata e repetido no mínimo 3 vezes.

Determinou-se também o tamanho corporal dos *C. elegans*, sendo este mensurado após 48 horas do tratamento, no estágio larval L4. Para isso 5 *C. elegans* de cada grupo foram colocados em lâminas microscópicas e anestesiados através do congelamento (-20°C) e fotografias obtidas utilizando o microscópio óptico Nikon Eclipse 50i microscope (Tokyo, Japão). O tamanho dos *C. elegans* foi mensurado utilizando o software ImageJ (Madison, WI, USA), a média obtida e a porcentagem em relação ao grupo controle utilizada para a análise estatística. Este ensaio foi repetido no mínimo 3 vezes.

3.6 Ensaios *in vitro* com formulações para determinação da eficácia carrapaticida sobre *R. (B.) microplus*

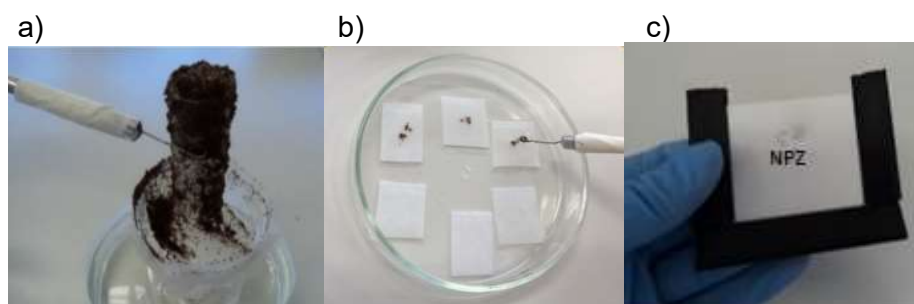
Essa etapa foi realizada no Laboratório de Parasitologia Veterinária da Embrapa Pecuária Sudeste (CPPSE), São Carlos/SP, sob a orientação da Dra. Ana Carolina de Souza Chagas. As fêmeas ingurgitadas (>4 mm) do carrapato *R. (B.) microplus* utilizadas neste estudo foram obtidas a partir de bovinos artificialmente infestados e livres de tratamento carrapaticida há mais de 90 dias, pertencente ao Sistema de Produção de Leite – CPPSE. Da mesma forma, as larvas, que foram utilizadas com idade de 14 a 21 dias, foram oriundas de oviposturas de fêmeas ingurgitadas obtidas nas mesmas condições. Como controle positivo foi utilizado o Ivomec® injetável para bovinos (1% de Ivermectina), adaptado por Sabatini et al. (2001). Os protocolos experimentais desenvolvidos neste estudo cumpriram integralmente os princípios éticos da experimentação animal, elaborados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Embrapa Pecuária Sudeste (CPPSE / Protocolo nº 02/2014) (Anexo A).

3.6.1 Teste de Pacote com Larvas (TPL)

Como demonstrado na Figura 3, papéis filtro (2 cm x 2 cm) foram impregnados com 1 mL de cada formulação, diluídas com água a partir da formulação original, nas concentrações de: 5; 2,5; 1,25; 0,625 e 0,313 mg/mL. Com o apoio de uma alça de transferência, aproximadamente 100 larvas foram depositadas sobre um papel

impregnado que foi coberto com outro papel impregnado com a formulação. Esse “sanduíche” foi colocado no interior de um envelope de papel filtro (4 cm x 6 cm) que foi vedado e mantido em estufa sob as condições de temperatura de $\pm 27^{\circ}\text{C}$ e Umidade Relativa (UR) acima de 80%. Avaliou-se também o controle negativo (água destilada). Os testes foram executados em triplicata. Após 24 horas, a leitura foi procedida com bomba a vácuo e ponteira de barreira, quantificando-se as larvas vivas e mortas, obtendo-se, dessa forma, a porcentagem de mortalidade (FAO, 1971).

Figura 3: Teste de Pacote com Larvas (TPL) de *R. (B.) microplus* com as formulações: a) Larvas coletadas com auxílio de alça de platina, b) Larvas colocadas em papel impregnado, c) Envelope de papéis impregnados envolvendo as larvas



Fonte: Acervo Pessoal

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

Os mesmos procedimentos anteriormente descritos no item 3.6.1 foram realizados para a maior concentração das formulações (5 mg/mL), em triplicata. Após a quantificação de larvas vivas e mortas em 24 horas, os papéis filtro (2 cm x 2 cm) foram reutilizados, adicionando-se 1 mL de água destilada e ± 100 larvas novas, sem adição de formulação, e tiveram nova leitura realizada em 24h. O mesmo procedimento foi repetido para 48h, 72h, 7 dias, 15 dias e 30 dias, avaliando assim a atividade residual das máximas concentrações das formulações testadas.

3.6.3 Teste de Imersão de Adultos (TIA)

O TIA pode sofrer influência pelo tempo de imersão, conforme observado pode Sabatini et al (2001), onde os autores sugeriram que o tempo de imersão para a ivermectina deveria ser de 30 minutos, pois neste tempo ocorre a inibição consistente da postura de ovos. Desta forma, conforme demonstrado na Figura 4, fêmeas ingurgitadas foram colhidas manualmente dos animais, colocadas em recipiente

aerado e encaminhadas ao laboratório, onde foram selecionadas pela ausência de alterações morfológicas. Após serem higienizadas em água corrente, foram secas com papel absorvente e separadas, aleatoriamente, em grupos de 10. Os conjuntos tiveram seus pesos mensurados e balanceados, e foram submetidos à imersão por 30 minutos em 5 mL das formulações nas concentrações de 5; 2,5; 1,25; 0,625 e 0,313 mg/mL. Processo similar foi efetuado para os grupos controle negativo (água destilada) e positivo (Ivomec® - concentração de 0,1 mg/mL). Os testes foram realizados em triplicata. Após a imersão, as fêmeas ingurgitadas foram secas, condicionadas em placas de Petri e mantidas em estufa ($\pm 27^{\circ}\text{C}$, UR > 80%) por 15 dias consecutivos. Em seguida, os ovos foram pesados, alocados em seringas adaptadas, que foram vedadas com algodão hidrófilo, e conservados em estufa por mais 15 dias. A estimativa da eclosão das larvas foi realizada pela contagem de amostras de cada seringa (Giglioti et al., 2011), e os índices de oviposição, porcentagem de eclosão, eficiência reprodutiva e eficácia do produto foram verificados de acordo com Drummond et al. (1973).

Figura 4: Teste de Imersão de Adultos (TIA) de *R. (B.) microplus* com as formulações



Fonte: Acervo Pessoal

3.6.4 Teste de Imersão de Larvas (TIL)

Este teste foi realizado de acordo com Sabatini et al. (2001), com adaptações. As formulações foram diluídas em soluções de Triton X-100® a 0,02% (para garantir a imersão das larvas) e avaliadas nas concentrações de: 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,313; 0,156; 0,078; 0,039; 0,02 e 0,01 mg/mL. Com a ajuda de uma alça de transferência, aproximadamente 300 larvas foram adicionadas em tubos contendo 2 mL de formulação. Os tubos foram agitados por 5 s para que as larvas submergissem, permanecendo imersas por 10 minutos consecutivos. Posteriormente, a solução foi

escoada com cuidado do tubo, e com a alça de transferência as larvas (± 100) foram alocadas diretamente em 03 envelopes de papel filtro (4 cm x 6 cm), não impregnados, para cada concentração. Os envelopes foram vedados e mantidos em estufa ($\pm 27^\circ\text{C}$, UR > 80%). Processo similar foi efetuado para os grupos controle negativo (água destilada + Triton X-100[®] a 0,02%) e positivo (Ivomec[®] - concentração de 0,025 mg/mL). Após 48 horas, a leitura foi procedida com bomba a vácuo e ponteira de barreira, quantificando-se as larvas vivas e mortas, obtendo-se, dessa forma, a porcentagem de mortalidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

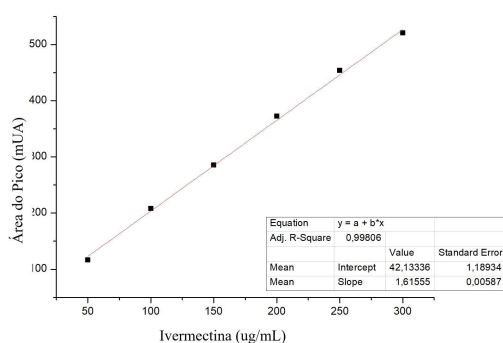
4.1 Desenvolvimento da metodologia analítica para quantificação dos ativos

4.1.1 Curvas de calibração e adequação de metodologia analítica

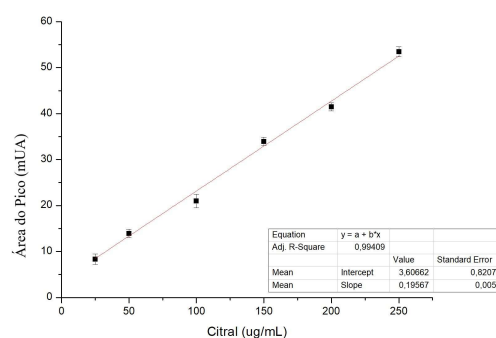
A fim de obter uma metodologia para quantificação de cada ativo utilizado, foram construídas as curvas de calibração para cada ativo, conforme as condições descritas no item 3.2. A Figura 5 apresenta os gráficos correspondentes às curvas analíticas para cada composto ativo.

Figura 5: Curva analítica obtida para os compostos: a) Ivermectina; b) Citral; c) Mentol; d) Limoneno. Valores representam a média de três experimentos realizados

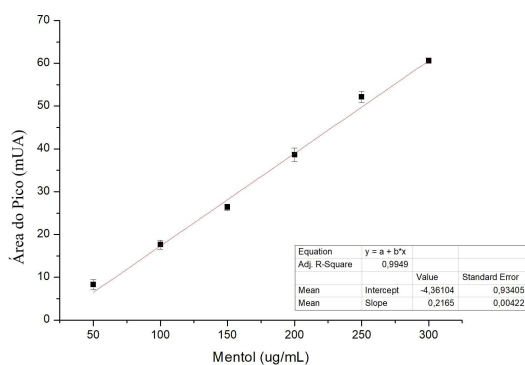
a) Ivermectina



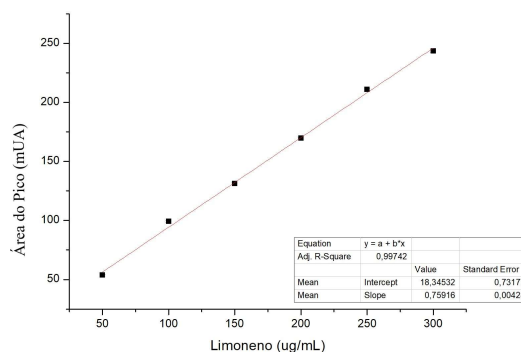
b) Citral



c) Mentol



d) Limoneno



O coeficiente de correlação (r) demonstra a linearidade da curva de calibração, sendo recomendado pela ANVISA e pelo INMETRO que este valor deve ser maior ou igual a 0,99 (Brasil, 2003; INMETRO, 2011). A Tabela 5 traz os valores do coeficiente de correlação (r) obtido para cada composto.

Tabela 5: Coeficiente de correlação (r) obtido para cada composto

Compostos	(r)
Ivermectina	0,99903
Citral	0,99704
Mentol	0,99745
Limoneno	0,99871

A Tabela 6 apresenta a estimativa do limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para os compostos avaliados. As estimativas foram efetuadas a partir de dados adquiridos por regressões lineares das curvas analíticas empregues às equações 2 e 3.

Tabela 6: Limite de detecção e limite de quantificação dos métodos analíticos para cada composto estudado

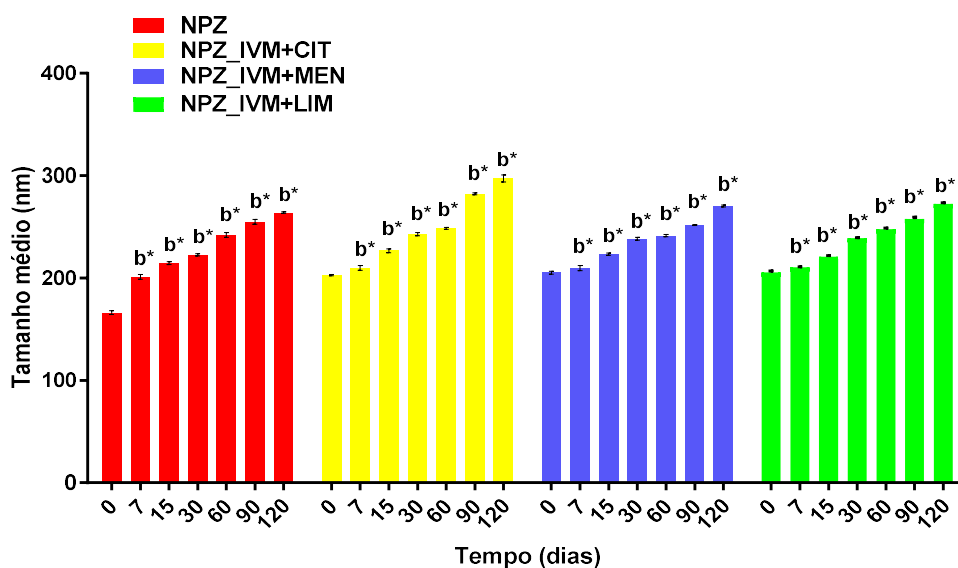
Composto	LD ($\mu\text{g/mL}$)	LQ ($\mu\text{g/mL}$)
Ivermectina	2,21	7,36
Citral	12,58	41,95
Mentol	12,94	43,14
Limoneno	2,59	9,64

4.2 Caracterização e estudo de estabilidade físico-química das nanopartículas

4.2.1 Diâmetro hidrodinâmico e índice polidispersão

As nanopartículas de zeínas foram analisadas através da técnica de espectroscopia de correlação de fótons (ECF) no período de 120 dias. A Figura 6 apresenta a variação do diâmetro hidrodinâmico (em nm) dos nanocarreadores de zeína para as formulações desenvolvidas: controle (NPZ), nanopartículas de zeína contendo Ivermectina e Citral (NPZ_IVM+CIT), nanopartículas de zeína contendo Ivermectina e Mentol (NPZ_IVM+MEN), e nanopartículas de zeína contendo Ivermectina e Limoneno (NPZ_IVM+LIM).

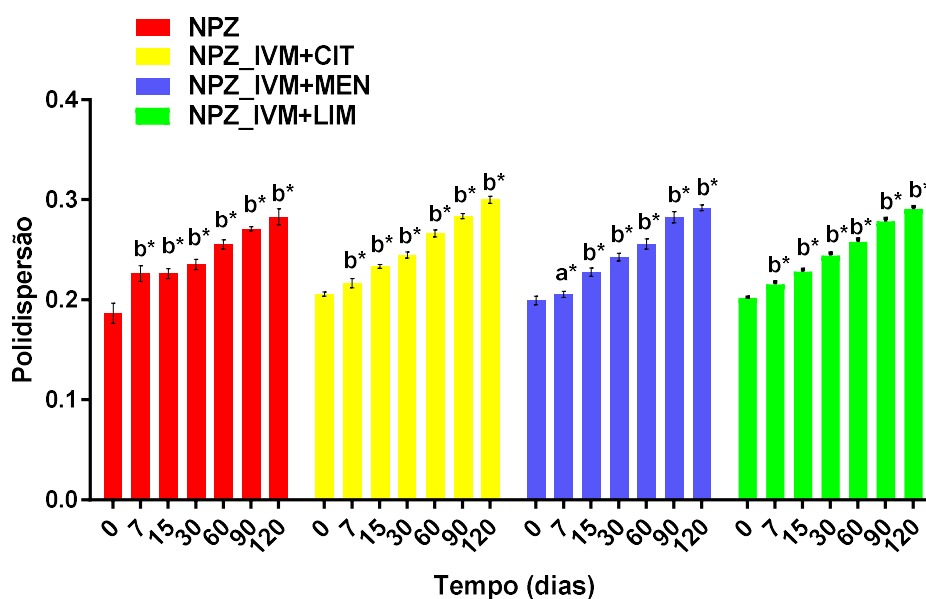
Figura 6: Diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de zeína em função do tempo para o controle (NPZ) e para NPZ_IVM+CIT, NPZ_IVM+MEN e NPZ_IVM+LIM. b* diferença estatística $p < 0,05$ em relação ao tempo zero



Empregou-se o teste ANOVA para averiguação de significativas alterações, sendo ponderada uma significância de $p < 0,05$ para as alterações estatísticas observadas entre os grupos, onde b^* indica alterações significativas entre os grupos em função do tempo em relação ao controle no tempo zero. Como se observa na Figura 8, todas as formulações apresentaram variações significativas na distribuição de tamanho médio das nanopartículas no decorrer do período de armazenamento, onde as NPZ variaram de 166 nm no tempo inicial até 264 nm no tempo 120 dias. Já as nanopartículas contendo compostos ativos apresentam valores iniciais médios: 203 nm para NPZ_IVM+CIT; 205 nm para NPZ_IVM+MEN e 206 nm para NPZ_IVM+LIM. Após o período de 120 dias, os valores apresentaram foram: 297 nm para NPZ_IVM+CIT; 270 nm para NPZ_IVM+MEN e 273 nm para NPZ_IVM+LIM. Estes resultados

A polidispersão também foi avaliada durante o período estudado. A polidispersão retrata a variabilidade do tamanho da partícula. Na Figura 7 estão representadas as variações no valor do índice de polidispersão das formulações de nanocarreadores de zeína.

Figura 7: Polidispersão média em função do tempo para as nanopartículas controle (NPZ) e para NPZ_IVM+CIT, NPZ_IVM+MEN e NPZ_IVM+LIM. b^* diferença estatística $p < 0,05$ em relação ao tempo zero



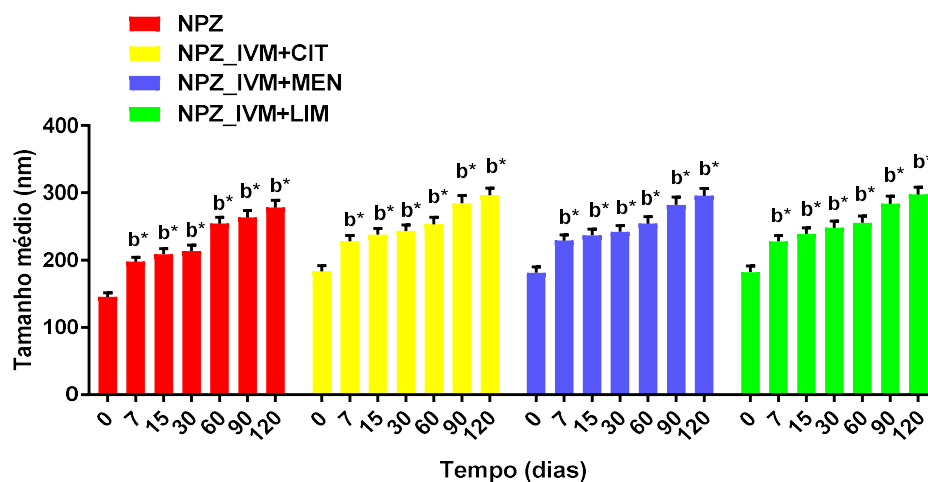
Pode-se verificar que as nanopartículas controle (NPZ) apontam valor médio inicial de índice de polidispersão de 0,186 e, após 7 dias de armazenamento, foram observados aumento significativo do índice de polidispersão. Já para as nanopartículas contendo os compostos ativos, observa-se um valor de índice de polidispersão inicial de 0,206 para NPZ_IVM+CIT; 0,199 para NPZ_IVM+MEN e 0,201 para NPZ_IVM+LIM. Assim como observado para NPZ, foram observadas alterações significativas após 7 dias de armazenamento. Estes resultados corroboram com os dados de diâmetro médio (Figura 6), indicando o início do processo de formação de agregados. O mesmo pode ser observado por Oliveira et al. (2019), onde ocorreu aumento significativo nos valores médios para NZ e também para nanoformulações durante o período de estudo, indicando possível agregação das nanopartículas.

4.2.2 Concentração e tamanho das nanopartículas (Rastreamento de Nanopartículas)

Utilizou-se também a técnica de rastreamento de nanopartículas, também intitulada como Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), para caracterizar as formulações de nanopartículas de zeína desenvolvidas em relação a sua concentração e distribuição de tamanho.

A Figura 8 apresenta os valores de diâmetro médio para as formulações estudadas. As NPZ apresentaram diâmetro inicial de 145 ± 6 nm e foi observado um aumento significativo durante o período de armazenamento, apresentando diâmetro de 278 ± 11 nm após 120 dias. As NPZ_IVM+CIT, NPZ_IVM+MEN e NPZ_IVM+LIM apresentaram valores de diâmetro médio inicial de 183 ± 8 nm; 181 ± 9 nm; e 182 ± 9 nm, respectivamente. Pode-se observar que ocorreu um aumento significativo e gradativo no diâmetro médio em função do tempo de armazenamento.

Figura 8: Diâmetro médio pela técnica de NTA para nanopartículas de zeína em função do tempo de armazenamento para nanopartículas de zeína controle (NPZ) e para NPZ_IVM+CIT, NPZ_IVM+MEN e NPZ_IVM+LIM. b* representa variações significativas entre os grupos em função do tempo em relação ao tempo zero

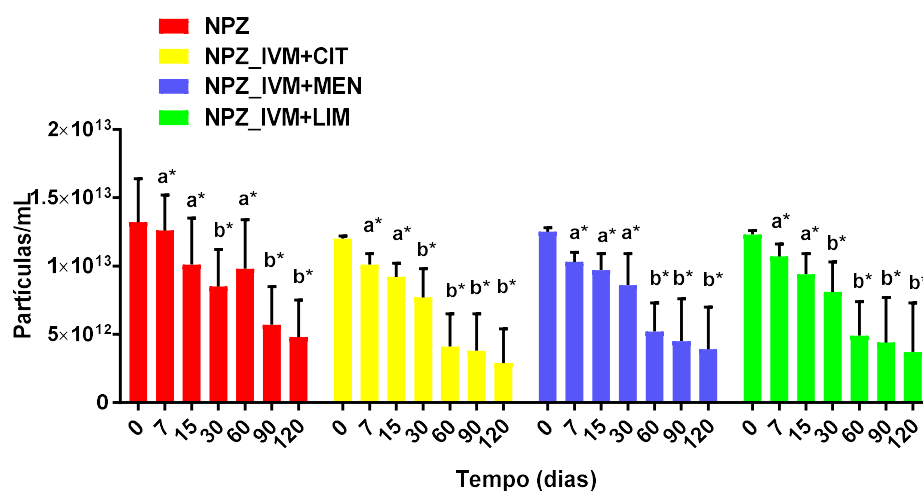


Desta forma, a adição dos compostos ativos resultaram no aumento de tamanho das partículas em relação à nanopartícula controle, sendo observado tal fato tanto pela técnica de ECF como de NTA. Diferenças no diâmetro médio das nanopartículas medidas pelas técnicas de ECF e NTA são esperados, devido a particularidade de cada técnica. A análise das nanopartículas pela técnica de ECF ocorre por dispersão de luz, onde as nanopartículas passam por um feixe de luz, podendo haver partículas com diferentes tamanhos, em que, as nanopartículas maiores acabam dispersando mais luz e mascarando assim as contribuições das nanopartículas menores na distribuição de tamanho. Já pela técnica de NTA as nanopartículas são rastreadas separadamente, focalizando assim cada partícula e avaliando o coeficiente de difusão no meio, e na sequência se calcula a distribuição de tamanho de cada partícula, sendo assim capaz de medir precisamente uma amostra de partículas polidispersas (Enjeti et al., 2016).

A técnica de NTA possibilita também medir a concentração de nanopartículas, como demonstrado na Figura 9. No tempo inicial NPZ apresentou concentração de $1,3 \pm 0,3 \times 10^{13}$ partículas/mL. Já NPZ_IVM+CIT, NPZ_IVM+MEN e NPZ_IVM+LIM apresentaram concentração inicial de $1,2 \pm 0,02 \times 10^{13}$ partículas/mL; $1,2 \pm 0,03 \times 10^{13}$ partículas/mL; e $1,2 \pm 0,03 \times 10^{13}$ partículas/mL, respectivamente.

Para todas as nanoformulações observa-se uma diminuição na concentração durante o tempo de armazenamento. Tal fato é mais um indicativo do processo de formação de agregados, dado que, conforme ocorre a agregação das nanopartículas, elas formam aglomerados e conseqüentemente diminuem a concentração. Oliveira et al. (2018) obtiveram dados semelhantes, atribuindo tal fato a possível falta de estabilidade em relação às nanoformulações desenvolvidas.

Figura 9: Concentração de nanopartículas em função do tempo para as nanopartículas controle (NPZ) e NPZ_IVM+CIT, NPZ_IVM+MEN e NPZ_IVM+LIM. a* representa variações não significativas entre os grupos em função do tempo em relação ao controle no tempo zero; b* representa variações significativas entre os grupos em função do tempo em relação ao tempo zero



Como observado nos testes realizados, ocorreu aumento de tamanho, polidispersão, além de diminuição na concentração de nanopartículas, indicando uma possível agregação, contudo sem que houvesse a precipitação das amostras durante o tempo de estudo de 120 dias.

4.2.3 Potencial zeta

O potencial zeta foi outro critério avaliado para aferir a estabilidade das nanoformulações. O potencial zeta retrata a carga de superfície das nanopartículas, sendo influenciado pela constituição da partícula, o meio dispersante, pH e a força iônica do meio (Greenwood, 2003). Quanto mais elevado o valor numérico (em módulo) do

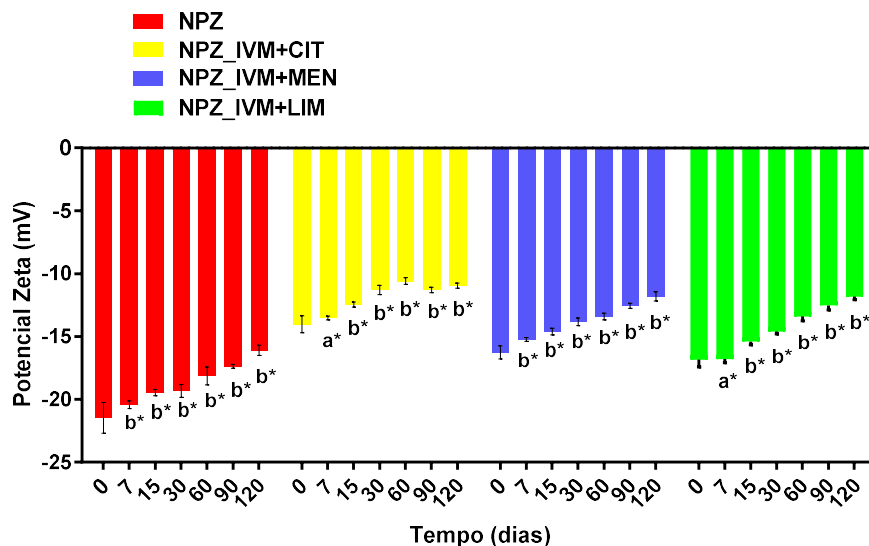
potencial zeta, maior a estabilidade das suspensões coloidais, uma vez que a força de repulsão de cargas entre as partículas aumenta, evitando agregação.

A Figura 10 apresenta a variação do potencial zeta durante o período de 120 dias, onde observa-se que para as nanopartículas controle (NPZ) apresentaram valor inicial de -21 ± 1 mV. Para as nanoformulações, foi obtido potencial zeta de -14 ± 1 mV para nanopartícula contendo Ivermectina e Citral (NPZ_IVM+CIT); $-16 \pm 0,5$ mV para Ivermectina e Mentol (NPZ_IVM+MEN); e -17 ± 1 mV para Ivermectina e Limoneno (NPZ_IVM+LIM).

Após 120 dias, as nanopartículas exibiram os seguintes valores de potencial zeta: $-16 \pm 0,4$ mV para NPZ; $-11 \pm 0,2$ mV para NPZ_IVM+CIT; $-12 \pm 0,4$ mV para NPZ_IVM+MEN; e $-12 \pm 0,2$ mV para NPZ_IVM+LIM.

Apesar de se observar alterações no valor de potencial zeta de todas as nanoformulações, estas foram produzidas empregando o Pluronic F-68 como agente de estabilização, e este surfactante estabiliza as nanopartículas através de impedimento estérico (Wulff-Pérez et al., 2012). Assim, as alterações sofridas nos valores do potencial zeta não são necessariamente um indicativo de instabilidade das nanoformulações.

Figura 10: Potencial zeta das nanopartículas em função do tempo para o controle (NPZ) e para NPZ_IVM+CIT, NPZ_IVM+MEN e NPZ_IVM+LIM. a* representa variações não significativas entre os grupos em função do tempo em relação ao controle no tempo zero; b* representa variações significativas entre os grupos em função do tempo em relação ao tempo zero

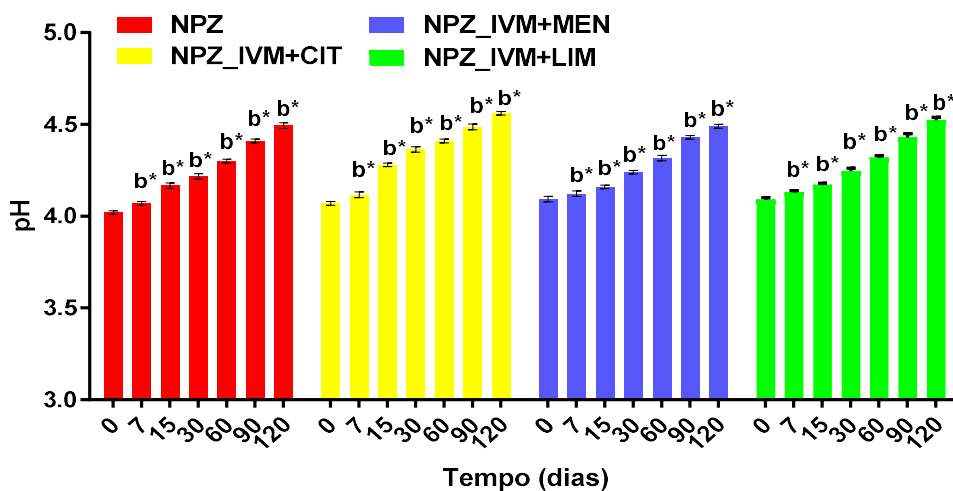


Como se observa na Figura 10, a diminuição no valor em módulo do potencial zeta acompanha a variação de tamanho, polidispersão e concentração de partículas, indicando que ocorreu agregação durante o tempo estudado, sem que houvesse a precipitação das amostras.

4.2.4 Avaliação de alterações do pH

O pH foi analisado com o intuito de avaliar a estabilidade do sistema em função do tempo. Alterações ocorridas nos valores de pH podem indicar processos de degradação de constituintes da formulação, afetando assim a estabilidade dos sistemas. Conforme demonstra a Figura 11, NPZ apresentou pH de $4,0 \pm 0,01$ e após 120 dias de armazenamento houve aumento significativo do pH para $4,5 \pm 0,02$. O mesmo pode-se observar para as nanoformulações, onde NPZ_IVM+CIT apresentou pH inicial de $4,1 \pm 0,01$ e $4,6 \pm 0,02$ após 120 dias; pH inicial de $4,1 \pm 0,02$ para NPZ_IVM+MEN e pH de para $4,5 \pm 0,02$ após 120 dias; pH no tempo 0 de $4,1 \pm 0,01$ para NPZ_IVM+LIM e após 120 dias, apresentou pH de $4,5 \pm 0,2$. Desta forma, observa-se que a encapsulação promoveu leve aumento no valor do pH.

Figura 11: Avaliação de alterações do pH das nanopartículas em função do tempo para o controle (NPZ) e para NPZ_IVM+CIT, NPZ_IVM+MEN e NPZ_IVM+LIM. a* representa variações não significativas entre os grupos em função do tempo em relação ao controle no tempo zero; b* representa variações significativas entre os grupos em função do tempo em relação ao tempo zero

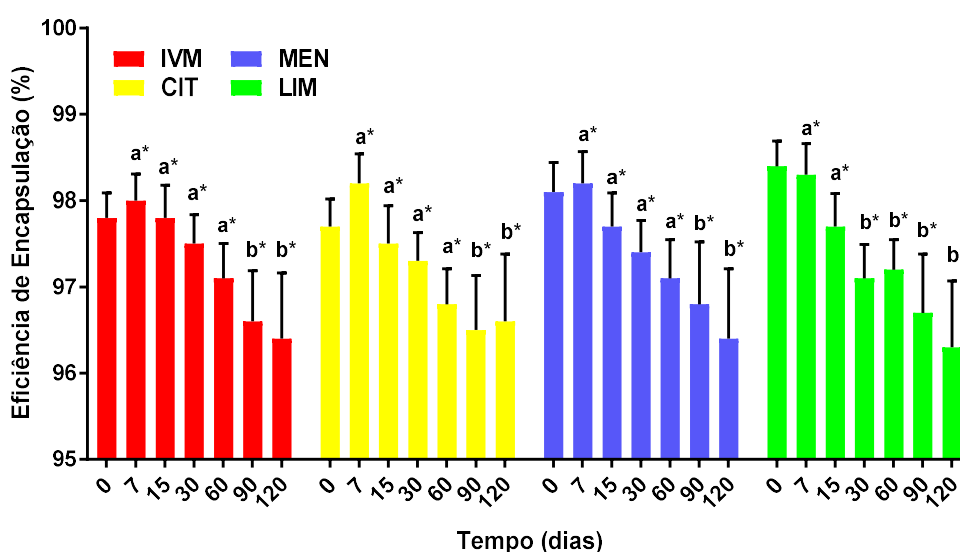


4.2.5 Eficiência de Encapsulação e Eficiência de carregamento de droga (Drug Loading)

A eficiência de encapsulação das formulações foi estudada em função do tempo a fim de analisar a estabilidade dos ativos nas nanopartículas de zeína. Numerosos fatores podem interferir na taxa de encapsulação dos compostos em sistemas nanoestruturados, entre os principais são: as características físico-químicas dos ativos (solubilidade), o tipo de tensoativo utilizado, características de lipídios utilizados, pH do meio e a quantidade de ativo empregada (Schaffazick et al., 2003; Mehnert;Mäder, 2012).

A Figura 12 apresenta a eficiência de encapsulação (%) dos ativos ivermectina (IVM), citral (CIT), mentol (MEN) e limoneno (LIM), em função do tempo. Os compostos ativos apresentaram taxa de encapsulação inicial de $97,8 \pm 0,3\%$ para IVM; $97,7 \pm 0,3\%$ para CIT; $98,1 \pm 0,3\%$ para MEN; e $98,4 \pm 0,3\%$ para LIM. Já após 120 dias de armazenamento, a taxa de encapsulação (%) para os ativos foi de $96,4 \pm 0,8\%$ para IVM; $96,6 \pm 0,8\%$ para CIT; $96,4 \pm 0,8\%$ para MEN; e $96,3 \pm 0,8\%$ para LIM.

Figura 12: Eficiência de encapsulação (%) dos ativos IVM, CIT, MEN e LIN em função do tempo. b* representa variações significativas entre os grupos em função do tempo em relação ao tempo zero

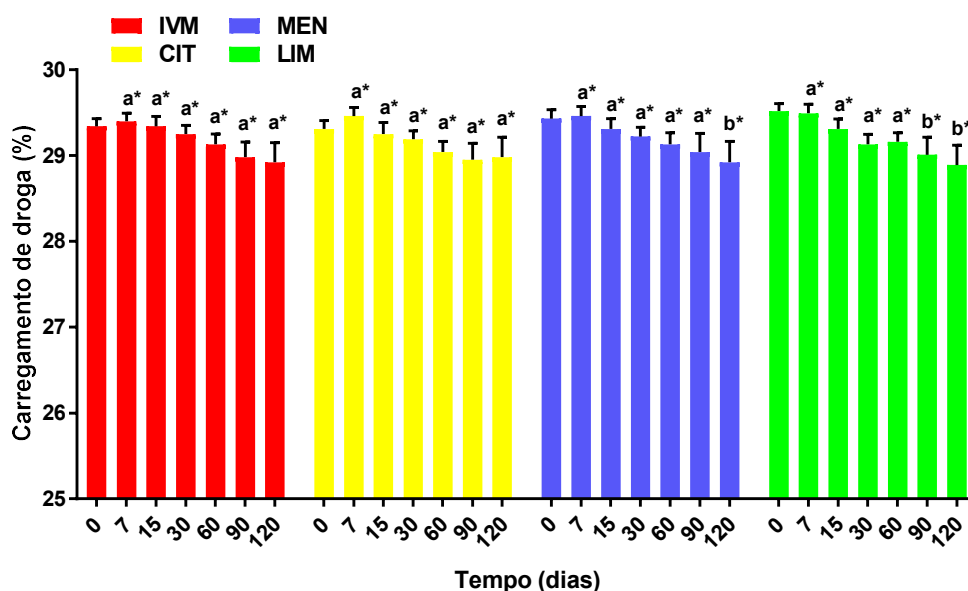


Pode-se observar que as nanopartículas de zeína mostraram ser eficazes para a encapsulação dos ativos estudados, apoiando a sua encapsulação durante os 120

dias de armazenamento. Apesar de apresentarem redução estatisticamente significativa, todas as nanoformulações apresentaram taxa de eficiência de encapsulação superiores a 96% durante o período de estudo. Oliveira et al. (2019) obtiveram eficiência de encapsulação superior a 90% para nanoformulações contendo compostos vegetais encapsulados, reforçando a capacidade da zeína como nanocarreador, corroborando com os resultados deste estudo.

A eficiência de carregamento de droga (drug loading) também foi calculada. Como observa-se na Figura 13, o drug loading no tempo inicial de estudo foi de 29,3% para a IVM e para o CIT, já para o MEN foi de 29,4% e para LIM foi de 29,5%. Observa-se a ocorrência de queda na eficiência para todos os ativos durante o período estudado, onde o carregamento diminuiu para 28,9% para os ativos IVM, CIT e MEN, 28,8% para o LIM.

Figura 13: Eficiência de carregamento de droga (%) para IVM, CIT, MEN e LIM em função do tempo. b* representa variações significativas entre os grupos em função do tempo em relação ao tempo zero



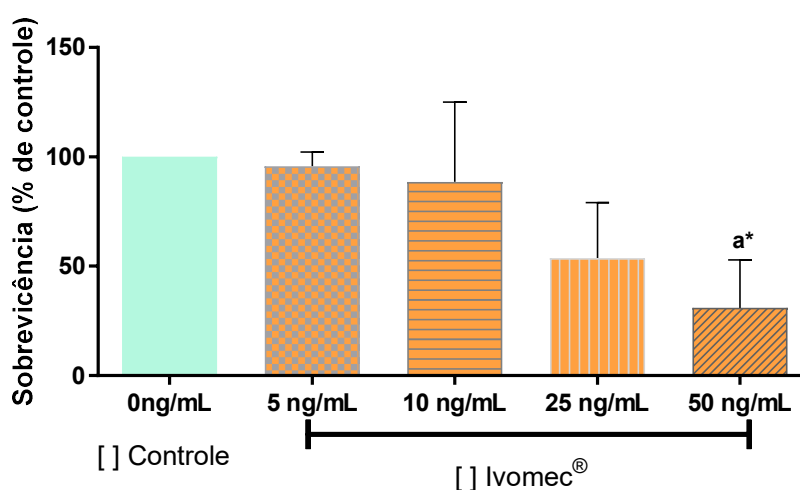
4.3 Avaliação *in vitro* de toxicidade em organismo não-alvo

Os resultados obtidos foram plotados e analisados através do software GraphPad Prism 7. Os dados foram expressos como valor médio \pm o desvio padrão

da média e foram analisados estatisticamente por meio Análise de Variância (ANOVA) unilateral ou bidirecional, seguido pelo teste de post-hoc de Tukey. Resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos após a comparação entre os grupos.

Na Figura 14 podemos observar na curva de sobrevivência realizada que as duas maiores concentrações testadas causaram uma mortalidade nos nematoides em comparativo com o controle, com maior significância na maior concentração. Com isso, esta concentração CL50: 50 ng/mL foi escolhida para a realização dos outros ensaios, afim de se verificar se os isolados vegetais das nanoformulações, teriam efeito protetor contra essa toxicidade exercida pela formulação comercial do carrapaticida Ivomec®.

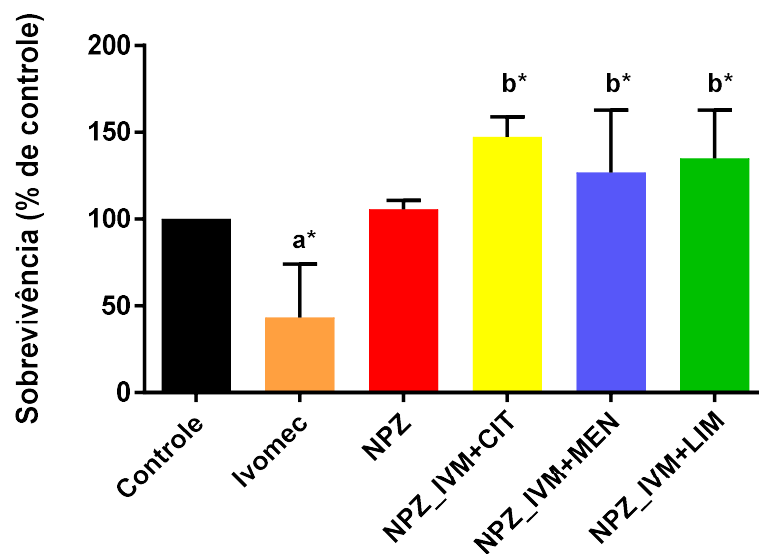
Figura 14: Curva de sobrevivência de *C. elegans* para formulação comercial Ivomec®. Resultados foram comparados ao controle por ANOVA, seguido pelo post-hoc de Tukey. Foram considerados resultados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. a* representa diferenças em relação ao controle com $p < 0,05$.



Na Figura 15 podemos observar que na maior concentração testada (50 ng/mL), as nanoformulações não causam toxicidade quando comparadas com o controle, e foram capazes de proteger contra a mortalidade significativa causada pela ivermectina. Desta forma, as nanoformulações desenvolvidas demonstram ser uma alternativa sustentável e mais segura no uso de agroquímicos. Resultados semelhantes foram obtidos por Pascoli et al. (2019), onde nanoformulações de zeínas

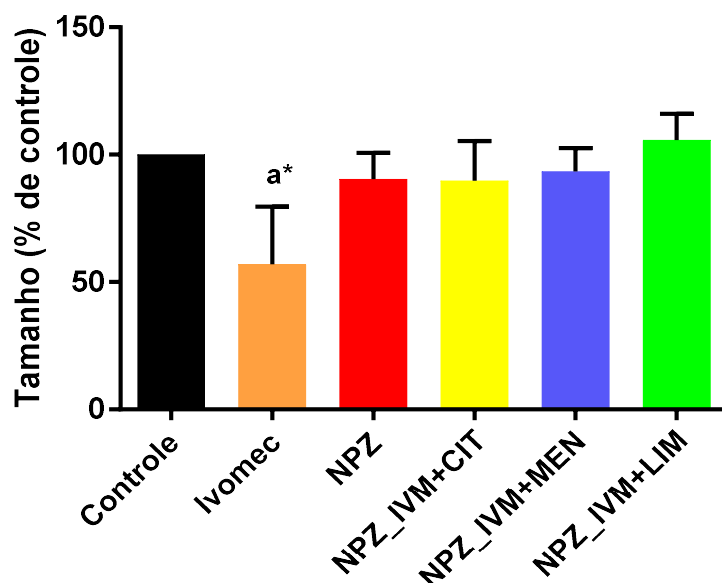
contendo óleo de neem não apresentaram efeito tóxico, enquanto o óleo de neem ocasionou interferências ao *C. elegans*.

Figura 15: Curva de sobrevivência para controle, formulação comercial Ivomec® e nanoformulações. Os resultados foram comparados ao controle por ANOVA, seguido pelo post-hoc de Tukey. Foram considerados resultados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. a* representa diferenças em relação ao grupo controle, b* representa diferenças em relação ao Ivomec®



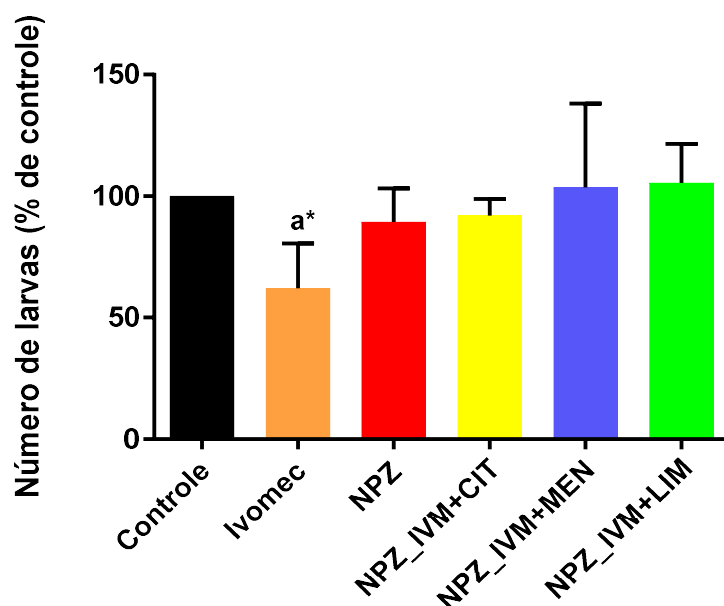
Um dos importantes parâmetros toxicológicos a ser avaliado é o atraso no crescimento dos nematoides, uma vez que diferenças nos tamanhos de *C. elegans* podem levar a más-formações, danos reprodutivos e degenerativos. Na Figura 16 podemos observar que, em relação ao controle (água destilada), na concentração testada (50 ng/mL), somente o Ivomec® apresentou diferenças estatísticas no tamanho de *C. elegans*. Este resultado sugere que as nanoformulações não prejudicam o desenvolvimento dos nematoides, uma vez que não ocasionaram diferenças significativas em relação aos nematoides quando expostos a água destilada, e assim, seu uso pode ser realizado em substituição ao produto comercial.

Figura 16: Alteração no tamanho corporal de *C. elegans* expostos à Ivomec® e nanoformulações em relação ao tamanho relativo (percentual) do controle. Os resultados foram comparados ao controle por ANOVA, seguido pelo post-hoc de Tukey. Foram considerados resultados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. a* representa diferenças em relação ao controle.



Outro importante fator a ser avaliado é a alteração percentual no tamanho de *C. elegans* e atrasos na reprodução, pois estes estão intimamente ligados ao desenvolvimento de *C. elegans* (Woodruff; Johnson; Phillips, 2019). Caso ocorra um atraso no desenvolvimento dos nematoides é possível que haja uma má formação no sistema reprodutivo, desencadeando danos nas gônadas ou na vulva dos mesmos (Tuck, 2013). Na Figura 17 podemos observar que, em relação ao controle (água destilada), na concentração testada (50 ng/mL), a formulação comercial causou danos reprodutivos estatisticamente conclusivos. Porém as nanoformulações desenvolvidas não apresentaram nenhuma tendência de diminuição na postura de ovos dos nematoides, não ocasionando alterações no número de larvas produzidas.

Figura 17: Alteração percentual no tamanho da ninhada de *C.elegans* expostos à formulação comercial e nanoformulações em relação ao controle. Os resultados foram comparados ao controle por ANOVA, seguido pelo post-hoc de Tukey. Foram considerados resultados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. a* representa diferenças em relação ao controle.



Os ensaios de toxicidade também foram realizados com emulsões de cada isolado vegetal (citral, mentol e limoneno), sendo avaliados taxa de sobrevivência, tamanho corporal e tamanho de ninhada de *C.elegans* após a exposição. Nenhuma emulsão apresentou alterações significativas em nenhuma das análises realizadas (dados não exibidos).

Pascoli et al. (2019) demonstraram em ensaios de toxicidade realizados com *C. elegans* que a sobrevivência, reprodução e comprimento corporal dos nematoides não apresentaram diferenças significativas após a exposição às nanopartículas de zeína carregadas com óleo de neem, corroborando com os resultados deste estudo. Desta forma, os resultados as nanoformulações desenvolvidas demonstraram eficácia em proteger da toxicidade causada pela Ivermectina e os isolados vegetais em sua forma livre, sendo assim opção viável para possível substituição do produto comercial.

4.4 Ensaios *in vitro* com formulações para determinação de eficácia carrapaticida

Foram desenvolvidas diferentes formulações contendo a associação de Ivermectina e três diferentes isolados vegetais (Citral, Mentol e Limoneno). As nanoformulações foram submetidas ao Teste de pacote com larvas (TPL) (Figura 3) e o Teste de Imersão de Adultos (TIA) (Figura 4).

4.4.1 Teste de Pacote com Larvas (TPL)

A primeira concentração (5 mg/mL) utilizada nos testes *in vitro* para esse estudo corresponde a 50% da concentração indicada pelo fabricante do produto comercial, Ivomec[®], utilizado como controle positivo, o qual contém apenas Ivermectina a 1% (1 g em 100 mL ou 10 mg/mL). Essa concentração foi então o parâmetro de comparação para as formulações desenvolvidas com nanocarreadores de zeína.

A Tabela 7 apresenta os resultados do TPL, onde é possível observar que a NPZ não causou a mortalidade das larvas em nenhuma concentração testada, enquanto que a maior concentração (5 mg/mL) apresentou uma taxa de mortalidade de 100% para NPZ_IVM+CIT, $95,69 \pm 4,14\%$ para NPZ_IVM+MEN, e $74,10 \pm 6,24\%$ para NPZ_IVM+LIM. Apesar de NPZ_IVM+MEN e NPZ_IVM+LIM apresentarem menor taxa de mortalidade quando comparadas ao controle positivo (Ivermectina), vale salientar que as formulações foram testadas em concentração equivalente a 50% do controle positivo.

Ao realizar a diluição das formulações, observa-se considerada queda nas taxas de mortalidade para NPZ_IVM+CIT, caindo de 100% na concentração de 5 mg/mL, para 0% na concentração de 0,313 mg/mL, e também para NPZ_IVM+MEN, onde ocorreu queda de $95,69 \pm 4,14\%$ para $1,43 \pm 2,48\%$ de mortalidade. Já para NPZ_IVM+LIM, ocorreu menor queda quando realizada diluição, apresentando variação entre $74,10 \pm 6,24\%$ e $30,59 \pm 10,41\%$. Também foi calculada a média de mortalidade utilizando-se o produto comercial, no entanto os resultados obtidos foram imprecisos (dados não exibidos).

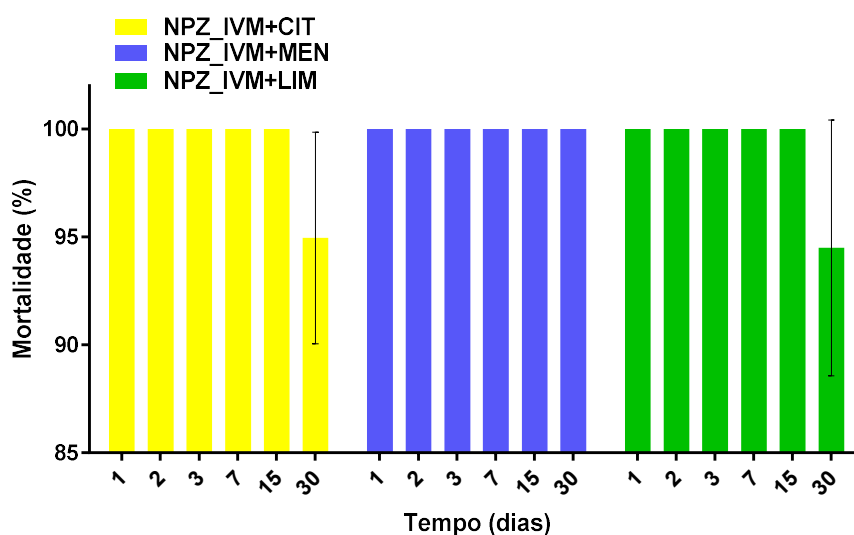
Tabela 7: Médias de mortalidade (%) de larvas de *R. (B.) microplus* verificadas pelas nanoformulações, em um intervalo de 24 h, pelo Teste de Pacote com Larvas (TPL).

Concentração (mg/mL)	NPZ_IVM+CIT	NPZ_IVM+MEN	NPZ_IVM+LIM
0,313	0,00	1,43 ± 2,48	30,59 ± 10,41
0,625	2,29 ± 2,7	16,16 ± 5,67	19,43 ± 18,85
1,25	21,47 ± 8,53	30,03 ± 20,29	6,82 ± 7,33
2,5	33,59 ± 27,73	52,90 ± 2,0	63,16 ± 21,42
5	100 ± 0	95,69 ± 4,14	74,10 ± 6,24
C – (água destilada)	0,00	0,00	0,00
NPZ (branco)	0,00	0,00	0,00

4.4.2 Atividade residual verificada por Teste de Pacote com Larvas (TPL)

A atividade residual está demonstrada na Figura 18, onde se avaliou a atividade residual das formulações desenvolvidas em sua concentração máxima testada (5 mg/mL). O controle negativo (água destilada) e as NZ sem princípios ativos não causaram mortalidade sobre as larvas (dados não exibidos).

Figura 18: Atividade residual sobre *R. (B.) microplus*, a partir das médias de mortalidade obtidas por TPL após 1, 2, 3, 7, 15, e 30 dias do tratamento inicial



Na Figura 14 pode-se observar que as formulações apresentaram atividade residual de 100% de mortalidade durante o período de 15 dias para todas as formulações testadas na concentração de 5 mg/mL, sendo que a formulação contendo mentol se manteve em 100% e as formulações contendo citral e limoneno reduziram para 94,95 e 94,49%, respectivamente. Desta forma, todas as formulações testadas indicam elevada atividade residual (acima de 94%), demonstrando possível uso sem necessidade de reaplicação a longo prazo.

4.4.3 Teste de Imersão de Adultos (TIA)

A eficiência das formulações também foi testada através do TIA. Os resultados estão demonstrados na Tabela 8.

Tabela 8: Valores das médias dos pesos das fêmeas (PF), pesos das massas de ovos (PO), % de eclosão das larvas (E), índice de eficiência reprodutiva (REI) e eficácia das nanoformulações sobre fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* (EP), avaliadas pelo Teste de Imersão de Adultos (TIA)

Formulação	Concentração (mg/mL)	PF (g)	PO (g)	E (%)	REI	EP (%)
C – (água)	-	2,34	1,19	91,00	92,56	-
Ivomec®	0,1	2,33	0,297	59,00	15,05	83,74 ± 5,91 ^{ab}
	0,05	2,35	0,350	51,33	15,31	83,46 ± 7,32 ^{ab}
	0,025	2,34	0,457	64,57	25,28	72,69 ± 20,96 ^{abc}
	0,012	2,35	0,343	37,00	10,83	88,30 ± 9,14 ^{abd}
NPZ	5	2,31	0,967	88,33	77,56	16,21 ± 5,69 ^e
	5	2,36	0,213	32,33	5,84	93,69 ± 7,28 ^{abcd}
	2,5	2,34	0,400	48,33	16,50	82,17 ± 10,77 ^{abcd}
NPZ_IVM+CIT	1,25	2,35	0,400	19,00	6,47	93,01 ± 12,26 ^{abcd}
	0,625	2,32	0,453	62,67	24,46	73,58 ± 9,09 ^{abcd}
	0,313	2,34	0,510	57,33	25,03	72,96 ± 8,02 ^{abcd}

NPZ_IVM+MEN	5	2,33	0,270	64,00	14,83	83,97 ± 3,46 ^{abcd}
	2,5	2,36	0,390	35,67	11,80	87,25 ± 9,67 ^{abcd}
	1,25	2,36	0,333	45,33	12,81	86,16 ± 6,07 ^{abcd}
	0,625	2,34	0,427	56,00	20,39	77,97 ± 6,34 ^{abcd}
	0,313	2,33	0,483	59,00	24,51	73,52 ± 3,71 ^{abcd}
NPZ_IVM+LIM	5	2,34	0,923	90,67	71,65	22,58 ± 8,82 ^e
	2,5	2,37	1,097	93,33	86,25	6,81 ± 12,51 ^e
	1,25	2,35	1,137	95,33	92,22	0,36 ± 4,77 ^e
	0,625	2,33	0,967	90,67	75,34	18,60 ± 14,08 ^e
	0,313	2,36	1,073	90,67	82,47	10,90 ± 7,33 ^e

*Letras diferentes indicam diferença estatística significativa (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

Conforme demonstrado na Tabela 8, as nanoformulações desenvolvidas apresentaram eficácia superior a 72% sobre as fêmeas ingurgitadas no TIA, com exceção da NPZ_IVM+LIM, que apresentou eficácia inferior a 23% no intervalo de concentração estudada. Pode-se observar que o índice de eficiência reprodutiva (REI) resultou em valores inferiores a 25%, exceto para a NPZ_IVM+LIM, que apresentou valores superiores a 71%. Contudo, o resultado apresenta evolução em comparação a estudo realizado por Berni Neto (2014), que demonstrou que, utilizando nanopartículas poliméricas para encapsular amitraz para uso carrapaticida, a nanoformulação apresentou eficiência de cerca de 3%, enquanto o ativo livre apresentou eficácia de 83%.

Dessa forma, foi possível constatar interferência sobre o aparelho reprodutivo com redução da ovipostura (PO) das fêmeas ingurgitadas e da eclosão das larvas (E) nas concentrações estudadas, demonstrando assim eficácia das nanoformulações NPZ_IVM+CIT e NPZ_IVM+MEN.

4.4.4 Teste de Imersão de Larvas (TIL)

Os resultados referentes à eficácia das nanoformulações obtida pelo TIL estão apresentados na Tabela 9, através da porcentagem média de mortalidade (%) de larvas de *R. (B.) microplus*.

Tabela 9: Porcentagem média de mortalidade (%) de larvas de *R. (B.) microplus* verificadas pelas nanoformulações de NPZ, em um intervalo de 48 h, pelo Teste de Imersão de Larvas (TIL).

Concentração (mg/mL)	NPZ_IVM+CIT	NPZ_IVM+MEN	NPZ_IVM+LIM
5	100 ± 0,0 ^{ab}	100 ± 0,0 ^{ab}	100 ± 0,0 ^{ab}
2,5	100 ± 0,0 ^{ab}	100 ± 0,0 ^{ab}	100 ± 0,0 ^{ab}
1,25	100 ± 0,0 ^{ab}	100 ± 0,0 ^{ab}	100 ± 0,0 ^{ab}
0,625	100 ± 0,0 ^{ab}	100 ± 0,0 ^{ab}	100 ± 0,0 ^{ab}
0,313	100 ± 0,0 ^{ab}	100 ± 0,0 ^{ab}	98,28 ± 2,97 ^{ab}
0,156	80,97 ± 11,51 ^{abc}	100 ± 0,0 ^{ab}	98,32 ± 0,72 ^{ab}
0,078	74,04 ± 7,0 ^{abcd}	98,81 ± 2,06 ^{ab}	94,62 ± 3,11 ^{ab}
0,039	66,99 ± 13,82 ^{abcd}	78,68 ± 3,19 ^{abc}	74,70 ± 10,76 ^{abc}
0,020	47,90 ± 15,61 ^{bcd}	57,17 ± 12,88 ^{abcd}	60,14 ± 6,97 ^{abcd}
0,010	36,94 ± 6,58 ^{cde}	46,10 ± 18,44 ^{cd}	48,00 ± 7,92 ^{bcd}
C – (Triton X-100® a 0,02%)	7,14 ^e	7,14 ^e	7,14 ^e
NPZ (branco)	0	0	0
Ivomec®			
0,2	84,87 ± 0,0 ^{ab}	84,87 ± 0,0 ^{ab}	84,87 ± 0,0 ^{ab}
0,1	78,01 ± 0,0 ^{abc}	78,01 ± 0,0 ^{abc}	78,01 ± 0,0 ^{abc}
0,05	53,68 ± 0,0 ^{bcd}	53,68 ± 0,0 ^{bcd}	53,68 ± 0,0 ^{bcd}
0,025	43,36 ± 0,0 ^{cd}	43,36 ± 0,0 ^{cd}	43,36 ± 0,0 ^{cd}

* Letras diferentes indicam diferenças significativas entre produto comercial e formulação testada em diferentes concentrações, pelo ANOVA e teste de Tukey ($p \geq 0.05$).

Como demonstrado na Tabela 9, as nanoformulações apresentaram eficácia de 100% sobre as larvas utilizadas no TIL quando imersas em concentrações de até 0,625 mg/mL, enquanto que a NPZ não causou mortalidade, diferentemente do controle negativo (Triton 0,02%), que ocasionou mortalidade média de 7,14%.

Quando comparadas ao controle positivo (Ivomec®) na maior concentração testada (0,2 mg/mL), as nanoformulações contendo mentol e limoneno apresentaram maior mortalidade no intervalo de concentrações entre 5 de 0,078 mg/mL, onde as

nanoformulações apresentaram mortalidade mínima de 98,81% para NPZ_IVM+MEN, e 94,62% para NPZ_IVM+LIM. Já a nanoformulação contendo citral, apresentou no intervalo de concentração entre 5 a 0,313 mg/mL eficácia mínima de 100%. Desta forma, as nanoformulações desenvolvidas se apresentam como alternativas viáveis ao produto comercial, permitindo a redução na concentração do composto Ivermectina, mantendo alta eficácia carrapaticida.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho proporcionou conhecimentos relevantes relacionados ao preparo, caracterização, avaliação de encapsulação e eficiência carrapaticida de nanopartículas de zeína contendo compostos ativos sobre *R. (B.) microplus*.

Os resultados obtidos demonstram que as nanopartículas de zeína desenvolvidas pelo método de precipitação com anti-solvente apresentam alta capacidade de encapsulação dos ativos IVM, CIT, MEN e LIM, apresentando eficiência superiores a 96% durante o período de armazenamento de 120 dias.

As formulações desenvolvidas exibiram estabilidade durante o tempo de armazenamento. As diferentes técnicas (ECF e NTA) permitiram ser adquiridos valores para a distribuição de tamanho, onde através da técnica de ECF, as NPZ desenvolvidas apresentaram um diâmetro médio variando entre 166 a 264 nm. Já para as nanoformulações contendo os compostos ativos estudados, o valor variou de 203 a 297 nm. Pela técnica de NTA, o tamanho variou entre 145 a 278 nm para as NPZ e entre 181 a 297 nm para as nanoformulações. Ou seja, observa-se por ambas técnicas que ocorre aumento de tamanho das nanopartículas quando ocorre a adição de compostos.

O índice de polidispersão das NPZ contendo os compostos ativos e na ausência deste ficaram por volta de 0,2 no início do estudo, apresentando aumento significativo durante o estudo. O potencial zeta médio das formulações de NPZ variaram entre -21 mV e -16 mV, enquanto as nanopartículas contendo compostos ativos apresentaram variação entre -14 mV e -10 mV.

Através da técnica de NTA também foi possível verificar a concentração de partículas de cada formulação. Foram obtidas para as formulações de NPZ no tempo de 0 dias de $1,32 \pm 0,32 \times 10^{13}$ partículas/mL. Já as NPZ_IVM+CIT, NPZ_IVM+MEN, e NPZ_IVM+LIM apresentaram concentrações iniciais de $1,2 \pm 0,02 \times 10^{13}$ partículas/mL; $1,25 \pm 0,03 \times 10^{13}$ partículas/mL; e $1,23 \pm 0,03 \times 10^{13}$ partículas/mL,

respectivamente. Para todas as nanoformulações observa-se a ocorrência de diminuição na concentração durante o tempo de armazenamento (120 dias). Tal fato unido ao aumento do diâmetro hidrodinâmico e polidispersão das nanopartículas, além da diminuição da concentração de nanopartículas, podem ser um indicativo do processo de formação de agregados, dado que, conforme ocorre a agregação das nanopartículas, elas formam aglomerados e conseqüentemente diminuem a concentração e aumenta seu tamanho médio.

Os resultados dos ensaios in vitro com as formulações para determinação da eficácia carrapaticida demonstram que, no TPL, as NPZ não causaram nenhuma mortalidade às larvas, enquanto que as nanoformulações apresentaram mortalidade entre 74 e 100% em concentrações correspondentes à 50% da concentração indicada comercialmente.

As formulações desenvolvidas apresentaram atividade residual de 100% durante o período de 15 dias para todas as formulações na concentração de 5 mg/mL. Além disso, a formulação contendo mentol se manteve em 100% após 30 dias e as formulações contendo citral e limoneno reduziram sua atividade residual para 94,95 e 94,49%, respectivamente. Em relação ao TIA, a NPZ demonstrou eficiência de 16%. Já as nanoformulações NPZ_IVM+CIT e NPZ_IVM+MEN apresentaram eficácia superior a 72%, enquanto que a NPZ_IVM+LIM apresentou eficácia inferior a 23%. Para o TIL, a NPZ não provocou a mortalidade das larvas, enquanto que as nanoformulações apresentaram mortalidade de 100% em concentrações entre 5 e 0,625 mg/mL. Em comparação com o controle positivo (Ivomec[®]), as nanoformulações apresentaram mortalidade de 80,97% para NPZ_IVM+CIT, 100% para NPZ_IVM+MEN, e 98,32% para NPZ_IVM+LIM na concentração de 0,156 mg/mL, enquanto que o controle a 0,2 mg/mL causou mortalidade de 84,87%.

Os ensaios de toxicidade demonstraram que as nanoformulações desenvolvidas não ocasionaram alterações nos parâmetros avaliados (taxa de sobrevivência, tamanho corporal e tamanho de ninhada) após a exposição. Já o produto comercial ocasionou alterações significativas, provocando a letalidade e redução de tamanho corporal e de ninhada.

6 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados demonstraram que as formulações de nanopartículas de zeína obtiveram altas taxas de mortalidade de larvas, realçando

seu potencial uso carrapaticida, com destaque para NPZ_IVM+MEN, que apresentou os melhores resultados para os ensaios para determinação de eficácia carrapaticida, podendo assim ser uma opção futura viável aos produtos comerciais. Desta forma, as nanoformulações podem ser consideradas uma opção para o desenvolvimento de novos carrapaticidas, possibilitando o uso de menores concentrações de princípios ativos, mantendo-se a mesma eficácia de um produto comercial. Isso representaria um grande avanço, principalmente em relação ao problema de possíveis resíduos em alimentos de origem animal e no ambiente, promovendo um controle parasitário mais seguro.

7 REFERÊNCIAS

- ABDEL-GHAFFAR, F.; AL-QURASHY, S.; MEHLHORN, H. **Length of tick repellency depends on formulation of the repellent compound (icaridin = Saltidin®): tests on Ixodes persulcatus and Ixodes ricinus placed on hands and clothes.** Parasitology Research, v. 114, p. 3041–3045, 2015.
- ADAIR, J.H.; KNECHT, S.D.; BOYER, J.E.; TUTWILER, R.L.; CARR, C.; TANG, X.; ADAIR, B.M.; NEUBERGER, T.; LOC, W.S.; WILCZYNSKI, Z.R.; MCGOVERN, C.; MATTERS, G.L.; CHENG, K.; KESTER, M.; SINOWAY, L. **Nanoparticle bioimaging contrast agent used in multimodal biological imaging for rapidly detecting trauma in battlefield, comprises pegylated calcium phosphosilicate nanoparticles.** Depositante: Penn State Res. Found. US2018064347-A1; WO2018049172-A1. Depósito: 08 de março de 2018. Disponível em: <http://apps-webofknowledge.ez87.periodicos.capes.gov.br/full_record.do?product=DIIDW&search_mode=GeneralSearch&qid=20&SID=6DRFGilUByrGi7yFvmg&page=1&doc=1>. Acesso em: janeiro, 2020.
- AMARAL, J.F.; SILVA, M.I.G.; AQUINO-NETO, M.R.; TEIXEIRA-NETO, P.F.; MOURA, B.A.; MELO, C.T.V. de; ARAUJO, F.L.O. de; SOUSA, D.P. de; VASCONCELOS, P.F. de; VASCONCELOS, S.M.M. de; SOUSA, F.C.F. de. **Antinociceptive Effect of the Monoterpene R-(d)-Limonene in Mice.** Biological & Pharmaceutical Bulletin, v. 30, n.7, p. 1217-1220, 2007.
- ANDERSON, W.; KOZAK, D.; COLEMAN, V.A.; JÄMTING, Å.K.; TRAU, M. A comparative study of submicron particle sizing platforms: Accuracy, precision and resolution analysis of polydisperse particle size distributions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.405, p.322–330, 2013.
- ANDRADE, S. F.; RODRIGUES, A. S. **Regras básicas para o uso de ivermectina na clínica de pequenos animais.** A Hora Veterinária, v.21, n.125, p.53-57, 2002.
- ANDREOTTI, R. **Situação atual da resistência do carrapato-do-boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos acaricidas no Brasil.** Campo Grande: Embrapa: CNPGC, 2010. 36 p.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE (ABIEC). **Beef REPORT: Perfil da Pecuária no Brasil, 2019.** Disponível em:

<<http://www.abiec.com.br/controle/uploads/arquivos/sumario2019portugues.pdf>>

- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK D.; IDAOMAR M. **Biological effects of essential oils: A review**. Food And Chemical Toxicology, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BENELLI, G. **Tools to fight ticks: A never-ending story? News from the front of green acaricides and photosensitizers**. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, v. 6, p. 656–659, 2016.
- BENELLI, G.; PAVELA, R.; CANALE, A.; MEHLHORN, H. **Tick repellents and acaricides of botanical origin: a green roadmap to control tick-borne diseases?** Parasitology Research, v. 115, p. 2545–2560, 2016.
- BENJAMIN, M.A.; ZHIOUA, E.; OSTFELD, R.S. **Laboratory and field evaluation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) for controlling questing adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae)**. Journal of Medical Entomology, v. 39, p. 723–728, 2002.
- BERNI NETO, E.A.. **Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas contendo amitraz, fluazuron e/ou violaceína para o uso na pecuária**. 2014. 117 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, São Paulo. 2014.
- BHATI-KUSHWAHA, H.; MALIK, C.P. **Assessment of antibacterial and antifungal activities of silver nanoparticles obtained from the Callus (stem and leaf) of *Tridax procumbens* L.** Indian Journal of Biotechnology, v. 13, p. 114–20, 2014.
- BITTER, C.; SUTER-ZIMMERMANN, K.; SURBER, C. **Nasal drug delivery in humans**. current problems in dermatology, v.40, p. 20–35, 2011.
- BLAGBURN, B.L.; DRYDEN, M.W. **Biology, treatment, and control of flea and tick infestations**. Veterinary Clinics of Small Animals, v. 39, p. 173-1200, 2009.
- BRIZUELA, C.M.; ORTELLADO, C.A.; SANCHEZ, T.I.; OSORIO, O.; WALKER, A.R. **Formulation of integrated control of *Boophilus microplus* in Paraguay: analysis of natural infestations**. Veterinary Parasitology, v. 63, p. 95-108, 1996.
- BOOTH, N. H.; McDONALD, L. E. **Farmacologia e terapêutica veterinária**. 7. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1992.
- BRANDÃO, H.M.; GERN J.C.; VICENTINI, N.M.; PEREIRA, M.M.; ANDRADE, P.V.D. **Nanotecnologia: a próxima revolução na agropecuária**. Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária, ano XVII, v. 53, p. 61-67, 2011.

- BRASIL, ANVISA. Resolução - **Resolução nº 899**, Brasília, 2003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Gestão Estratégica. **Plano Mais Pecuária**. 2014a. 32 p.
- BRENNER, S. **The genetics of *Caenorhabditis elegans***. *Genetics*, 77, n. 1, p. 71-94, May 1974.
- BUCALA, R.; GEALL, A. **Composition for providing protective immunity against parasite infection in subject in need comprises immunologically effective amount of nucleic acid comprising sequence that encodes parasite macrophage migration inhibitory factor antigen**. Depositante: Univ. Yale. WO2015144732-A2; WO2015144732-A3; EP3122774-A2; US2017106070-A1. Depósito: 01 de outubro de 2015. Disponível em: <http://apps-webofknowledge.ez87.periodicos.capes.gov.br/full_record.do?product=DIIDW&search_mode=GeneralSearch&qid=16&SID=6DRFGilUByrGi7yFvmg&page=1&doc=1&cacheurlFromRightClick=no>. Acesso em: janeiro, 2020.
- BUCALA, R.; GEALL, A. **Use of composition comprising nucleic acid comprising sequence that encodes macrophage migration inhibitory factor (MIF) antigen, parasitic MIF antigen, and antibody, for providing protective immunity against parasitic infection**. Depositante: Univ. Yale. BE1022446-A1. Depósito: 01 de março de 2016. Disponível em: <http://apps-webofknowledge.ez87.periodicos.capes.gov.br/full_record.do?product=DIIDW&search_mode=GeneralSearch&qid=15&SID=6DRFGilUByrGi7yFvmg&page=1&doc=1&cacheurlFromRightClick=no>. Acesso em: janeiro, 2020.
- BUDAK, M.; BUDAK, G.G.; BUDAKER, M. **Tissue-cell stain formula and molecule which is specific to nucleus of the cell, useful e.g. for staining the cell nucleus, for detecting presence of malignant and metastatic cells, and for assessment and diagnosis of tumor biopsies**. Depositante: Budak, M.; Budak, G.G.; Budaker, M. WO2016064353-A1; IN201747017230-A; EP3209292-A1; KR2017100486-A; CN107205980-A; US2017315031-A1. Depósito: 28 de abril de 2016. Disponível em: <http://apps-webofknowledge.ez87.periodicos.capes.gov.br/full_record.do?product=DIIDW&search_mode=GeneralSearch&qid=18&SID=6DRFGilUByrGi7yFvmg&page=1&doc=1&cacheurlFromRightClick=no>. Acesso em: janeiro, 2020.
- CALDERON-NIEVA, D.; GOONEWARDENE, K.B.; GOMIS, S.; FOLDVARI, M. **Veterinary vaccine nanotechnology: pulmonary and nasal delivery in**

- livestock animals**. Drug Delivery and Translational Research, v. 7, p. 558–570, 2017.
- CATTO, J.B.; ANDREOTTI, R.; KOLLER, W.W. **Atualização sobre o controle estratégico do carrapato-do-boi**. Campo Grande: Embrapa: CNPGC, 2010. 6 p.
- CHAGAS, A.C.S.; RABELO, M.D. **Método para detecção de substâncias com atividade repelente sobre larvas do carrapato Rhipicephalus (Boophilus) microplus: revisão e recomendações**. São Carlos: CPPSE, 27 p. (Embrapa-CPPSE. Documento Técnico, 106), 2012.
- CHEN, H.; ZHONG, Q. **Processes improving the dispersibility of spraydried zein nanoparticles using sodium caseinate**. Food Hydrocolloids. v. 35, p. 358–366, 2014.
- COSTA, S.C.L.; MAGALHÃES, V.C.S.; OLIVEIRA, U.V.; CARVALHO, F.S.; ALMEIDA, C.P.; MACHADO, R.Z.; MUNHOZ, A.D. **Transplacental transmission of bovine tick-borne pathogens: Frequency, co-infections and fatal neonatal anaplasmosis in a region of enzootic stability in the northeast of Brazil**. Ticks and Tick-borne Diseases, v. 7, n. 2, p. 270-275, 2016.
- CRUZ, A.A.; MOLENTO, M.B. **Nanotechnology: meeting the future of Veterinary Parasitology Research**. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 35, p. 842-843, 2015.
- DE CASTRO, J.J. **Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries**. Veterinary Parasitology, v. 71, p. 77-97, 1997.
- DE KOKER, S.; BEVERS, S.; TOMME, P. **Lipid nanoparticle useful in pharmaceutical composition, human or veterinary medicine for inducing immune response against nucleic-acid encoded antigen in mammal or treating cancer, contains ionizable lipid, and phospholipid**. Depositante: Ethernal Immunotherapies. WO2019141814-A1. Depósito: 25 de julho de 2019. Disponível em: <http://apps-webofknowledge.ez87.periodicos.capes.gov.br/full_record.do?product=DIIDW&search_mode=GeneralSearch&qid=14&SID=6DRFGilUByrGi7yFvmg&page=1&doc=1&cacheurlFromRightClick=no>. Acesso em: janeiro, 2020.
- DE LA FUENTE, J.; RODRIGUEZ, M.; MONTERO, C.; REDONDO, M.; GARCIA GARCIA, J.C.; MENDEZ, L.; SERRANO, E.; VALDES, M.; ENRIQUEZ, A.;

- CANALES, M.; RAMOS, E.; BOUE, O.; MACHADO, M.; LLEONART, R. **Vaccination against ticks (*Boophilus spp.*): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac (TM)**. Genetic Analysis Biomolecular Engineering, v. 15, p. 143–148, 1999.
- DEBBOUN, M.; STRICKMAN, D. **Insect repellents and associated personal protection for a reduction in human disease**. Medical and Veterinary Entomology, v. 27, p. 1–9, 2013.
- DEMENEV, V.A.; SHCHINOVA, M.A.; IVANOV, L.I.; VOROBEVA, R.N.; ZDANOVSKAIA, N.I.; NEBAIKINA, N.V. **Perfection of methodical approaches to designing vaccines against tick-borne encephalitis**. Vopr Virusol, v. 41, p. 107–110, 1996.
- DRUMMOND, R.O.; ERNEST, S.E.; TREVINO, J.L.; GLADNEY, W.J.; GRAHAM, O.H. ***Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides**. Journal of Economical Entomology, v. 66, n. 1, p. 130-133, 1973.
- DUNPALL, R.; REVAPRASADU, N. **Nanoparticle useful in e.g. therapy and/or diagnosis of cancer in human or animal, and bio-imaging, detection and/or thermo-destruction of tumor, comprises core comprising gold and first layer comprising zinc telluride**. Depositante: Univ. Zululand. WO2015019297-A1; EP3030516-A1; US2016175254-A1; EP3030516-B1; ES2639499-T3; ZA201601483-A. Depósito: 12 de fevereiro de 2015. Disponível em: <http://apps-webofknowledge.ez87.periodicos.capes.gov.br/full_record.do?product=DIIDW&search_mode=GeneralSearch&qid=21&SID=6DRFGilUByrGi7yFvmg&page=1&doc=1&cacheurlFromRightClick=no>. Acesso em: janeiro, 2020.
- DYKMAN, L.A.; KHLEBTSOV, N.G. **Immunological properties of gold nanoparticles**. Chemical Science, v. 8, p. 1719 -1735, 2017.
- EL-SAYED, A.; KAMEL, M. **Advances in nanomedical applications: diagnostic, therapeutic, immunization, and vaccine production**. Environmental Science and Pollution Research, v. 27, p. 19200–19213, 2020.
- ENJETI, A.K.; ARIYARAJAH, A.; D'CRUS, A.; SELDON, M.; LINCZ, L.F. **Correlative analysis of nanoparticle tracking, flow cytometric and functional measurements for circulating microvesicles in normal subjects**. Thrombosis Research, v. 145, p. 18–23, 2016.
- FAO. **Guidelines - Resistance management and integrated parasites control in ruminants**. Module 1: Ticks: Acaricide Resistance, Diagnosis, Management and

Prevention, Food and Agriculture Organization, Animal Production and Health Division, Rome, 2004, 25 p.

FAO. **Recommended method for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides: tentative methods for larvae of cattle tick *Boophilus* spp.** Plant Protection Bulletin, v. 19, n. 7, p. 15-18, 1971.

FAO. **The State of Food and Agriculture 2019. Moving forward on food loss and waste reduction.** Rome, 2019.

FAO; IFAD; UNICEF; WFP; WHO. **The State of Food Security and Nutrition in the World 2019. Safeguarding against economic slowdowns and downturns.** Rome, FAO, 2019.

FLECHTMANN, C.H.W. **Ácaros de Importância Médico-Veterinária.** São Paulo: Nobel, 1973. 192p.

GAMISANS, F.; LACOULONCHE, F.; CHAUVET, A.; ESPINA, M.; GARCIA, M.L.; EGEA, M. A. **Flurbiprofen-loaded nanospheres: analysis of the matrix structure by thermal methods.** International Journal of Pharmaceutics, v.179, p.37–48, 1999.

GEARY, T.G.; THOMPSON, D.P. **Development of antiparasitic drugs in the 21st Century.** Veterinary Parasitology, v. 11, p. 167-184, 2003.

GHOSH, S.; AZHAHIANAMBI, P.; de la FUENTE, J. **Control of ticks of ruminants, with special emphasis on livestock farming systems in India: present and future possibilities for integrated control—a review.** Experimental and Applied Acarology, v. 40, p. 49–66, 2006.

GHOSH, S.; AZHAHIANAMBI, P.; YADAV, M.P. **Upcoming and future strategies of tick control: a review.** Journal of vector borne diseases, v. 44, p. 79–89, 2007.

GIGLIOTI, R.; FORIM, M.R.; OLIVEIRA, H.N.; CHAGAS, A.C.S.; FERREZINI, J.; BRITO, L.G.; FALCOSKI, T.O.R.S.; ALBUQUERQUE, L.G.; OLIVEIRA, M.C.S. **In vitro acaricidal activity of neem (*Azadirachta indica*) seed extracts with known azadirachtin concentrations against *Rhipicephalus microplus*.** Veterinary Parasitology, v. 181, p. 309–315, 2011.

GREENWOOD, R. **Review of the measurement of zeta potentials in concentrated aqueous suspensions using electroacoustics.** Advances in Colloid and Interface Science, v.106, p.55-81, 2003.

HAN, Y.; YAO, F.; WANG, S.; ZHANG, N.; MENG, X.; JIAO, J.; LI, G.; HUANG, X. **Animal genetic vaccine based on nanotechnology comprises emulsifier,**

- polymer, immunopotentiator, co-emulsifier and animal vaccine.** Depositante: Shangqiu Meilan Biological Eng. Co. Ltd. CN110302372-A. Depósito: 08 de outubro de 2019. Disponível em: <http://apps-webofknowledge.ez87.periodicos.capes.gov.br/full_record.do?product=DIIDW&search_mode=GeneralSearch&qid=24&SID=6DRFGilUByrGi7yFvmg&page=1&doc=1&cacheurlFromRightClick=no>. Acesso em: janeiro, 2020.
- HOLBAN, A.M.; GESTAL, M.C.; GRUMEZESCU, A.M. **Control of biofilm-associated infections by signaling molecules and nanoparticles.** International Journal of Pharmaceutics, v. 510, p. 409-418, 2016.
- HOLBAN, A.M.; GESTAL, M.C.; GRUMEZESCU, A.M. **New molecular strategies for reducing implantable medical devices associated infections.** Current Medicinal Chemistry, v. 21, p. 3375–3382, 2014.
- HOLLINGSWORTH, R.G. **Limonene, a Citrus Extract, for control of Mealybugs and Scale insects.** Journal of Economic Entomology, v. 98, n. 3, p. 772-779, 2005.
- HU, K.; MCCLEMENTS, D.J. **Fabrication of Surfactant-Stabilized Zein Nanoparticles: A PH Modulated Antisolvent Precipitation Method.** Food Research International, v. 64, p. 329–335, 2014.
- HUANG, W.; TSUI, C.P.; TANG, C.Y.; GU, L. **Effects of Compositional Tailoring on Drug Delivery Behaviours of Silica Xerogel/Polymer Core-shell Composite Nanoparticles.** Scientific Reports, v. 8, n. 13002, p. 1-13, 2018.
- IBRAHIM, M.A.; PIRJO, K.; AFLATUNI, A.; TIILIKKALA, K.; HOLOPAINEN, J.K. **Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: With special reference to limonene and its suitability for control of insect pests.** Agricultural and Food Science in Finland, v. 10, p. 243-259. 2001.
- INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos - DOC CGRE-008,** Brasília, 2011. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf>
- IRACHE, J. M.; ESPARZA, I.; GAMAZO, C.; AGÜEROS, M.; ESPUELAS, S. **Nanomedicine: Novel approaches in human and veterinary therapeutics.** Veterinary Parasitology, Special Issue: Towards good management practises in parasite control, v. 180, n. 1, p. 47–71, 2011.
- KELSEY, R.G.; REYNOLDS, G.W.; RODRIGUEZ, E. **The chemistry of biologically active constituents secreted and stored in plant glandular trichomes.** In:

- RODRIGUEZ, E.; HEALEY, P.L.; METHA, I. (Eds.). *Biology and chemistry of plant trichomes*. New York: Plenum, p.187-241, 1984.
- KILIC, A. C.; CAPAN, Y.; VURAL, I.; GURSOY, R. N.; DALKARA, T.; CUINE, A.; HINCAL, A. A. **Preparation and characterization of PLGA nanospheres for the targeted delivery of NR2B-specific antisense oligonucleotides to the NMDA receptors in the brain**. *Journal of Microencapsulation*, v.22, p.633–641, 2005.
- KIM, S.; XU, J. **Aggregate Formation of Zein and Its Structural Inversion in Aqueous Ethanol**. *Journal of Cereal Science*, v. 47, n. 1, p. 1–5, 2008.
- KROLEVETS, A.A. **Method of producing ecocide nanocapsules in carrageenan**. Depositante: A.A. Krolevets. RU2688148-C1. Depósito: 20 de maio de 2019. Disponível em: <http://apps-webofknowledge.ez87.periodicos.capes.gov.br/full_record.do?product=DIIDW&search_mode=GeneralSearch&qid=9&SID=6DRFGilUByrGi7yFvmg&page=1&doc=1&cacheurlFromRightClick=no>. Acesso em: janeiro, 2020.
- KROLEVETS, A.A. **Method of producing ecocide nanocapsules in konjac gum**. Depositante: A.A. Krolevets. RU2688146-C1. Depósito: 20 de maio de 2019. Disponível em: <http://apps-webofknowledge.ez87.periodicos.capes.gov.br/full_record.do?product=DIIDW&search_mode=GeneralSearch&qid=6&SID=6DRFGilUByrGi7yFvmg&page=1&doc=1&cacheurlFromRightClick=no#searchErrorMessage>. Acesso em: janeiro, 2020.
- KROLEVETS, A.A. **Method of producing metronidazole nanocapsules in kappa-carrageenan**. Depositante: A.A. Krolevets. RU2691391-C1. Depósito: 13 de junho de 2019. Disponível em: <http://apps-webofknowledge.ez87.periodicos.capes.gov.br/full_record.do?product=DIIDW&search_mode=GeneralSearch&qid=7&SID=6DRFGilUByrGi7yFvmg&page=1&doc=1&cacheurlFromRightClick=no#searchErrorMessage>. Acesso em: janeiro, 2020.
- KROLEVETS, A.A. **Method of producing nanocapsules of biopaga-d in konjac gum veterinary preparation**. Depositante: A.A. Krolevets. RU2666596-C1. Depósito: 11 de setembro de 2018. Disponível em: <http://apps-webofknowledge.ez87.periodicos.capes.gov.br/full_record.do?product=DIIDW&

search_mode=GeneralSearch&qid=11&SID=6DRFGilUByrGi7yFvmg&page=1&doc=1&cacheurlFromRightClick=no>. Acesso em: janeiro, 2020.

KROLEVETS, A.A. **Method of producing Virkon-S nanocapsules in sodium alginate**. Depositante: A.A. Krolevets. RU2708616-C1. Depósito: 10 de dezembro de 2019. Disponível em: <http://apps-webofknowledge.ez87.periodicos.capes.gov.br/full_record.do?product=DIIDW&search_mode=GeneralSearch&qid=1&SID=6DRFGilUByrGi7yFvmg&page=1&doc=1&cacheurlFromRightClick=no>. Acesso em: janeiro, 2020.

KROLEVETS, A.A. **Method of producing vitamin B**. Depositante: A.A. Krolevets. RU2699788-C1. Depósito: 11 de setembro de 2019. Disponível em: <http://apps-webofknowledge.ez87.periodicos.capes.gov.br/full_record.do?product=DIIDW&search_mode=GeneralSearch&qid=5&SID=6DRFGilUByrGi7yFvmg&page=1&doc=1&cacheurlFromRightClick=no#searchErrorMessage>. Acesso em: janeiro, 2020.

KROLEVETS, A.A. **Method of producing vitamin nanocapsules**. Depositante: A.A. Krolevets. RU2703269-C1. Depósito: 16 de outubro de 2019. Disponível em: <http://apps-webofknowledge.ez87.periodicos.capes.gov.br/full_record.do?product=DIIDW&search_mode=GeneralSearch&qid=2&SID=6DRFGilUByrGi7yFvmg&page=1&doc=1>. Acesso em: janeiro, 2020.

KROLEVETS, A.A.; BOGACHEV, I.A.; ANDREENKOV, V.S. **Method of producing nanocapsules of creatine**. Depositante: Univ. Belgorod Nat. Res. RU2592202-C1. Depósito: 20 de julho de 2016. Disponível em: <http://apps-webofknowledge.ez87.periodicos.capes.gov.br/full_record.do?product=DIIDW&search_mode=GeneralSearch&qid=13&SID=6DRFGilUByrGi7yFvmg&page=1&doc=1&cacheurlFromRightClick=no>. Acesso em: janeiro, 2020.

KWAN, J.; MYERS, R.; COUSSIOS, C.; SHAH, A. **Nanoparticle useful in treatment or diagnosis of human or animal subject, for tumor, comprises cup having cavity, and gas pocket present in cavity**. Depositante: Isis Innovation Ltd. WO2015075442-A1; CA2930815-A; EP3071183-A1; US2016296465-A1; CN106102714-A; JP2016539114-W; US10441529-B2; JP6595991-B2. Depósito: 28 de maio de 2015. Disponível em: <http://apps-webofknowledge.ez87.periodicos.capes.gov.br/full_record.do?product=DIIDW&

search_mode=GeneralSearch&qid=22&SID=6DRFGilUByrGi7yFvmg&page=1&doc=1&cacheurlFromRightClick=no>. Acesso em: janeiro, 2020.

- LARA, H.H.; ROMERO-URBINA, D.G.; PIERCE, C.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; ARELLANO-JIMENEZ, M.J.; JOSE-YACAMAN, M. **Effect of silver nanoparticles on *Candida albicans* biofilms: An ultrastructural study.** *Journal of Nanobiotechnology*, v. 13, p. 91, 2015.
- LARKINS, B.A.; LENDING, C.R.; WALLACE, J.C. **Modification of maize-seed protein quality.** *American Journal of Clinical Nutrition*, v.58, n.2, p.264s-269s, 1993.
- LEITE, J.L.B.; RESENDE, J.C.; Stock, L.A. **Desempenho do mercado brasileiro de lácteos.** In: Anuário Leite 2019. São Paulo - SP: Embrapa. 26-27. 2019.
- LI, K.K.; YIN, S.W.; YIN, Y. C.; TANG, C. H.; YANG, X.Q.; WEN, S.H. **Preparation of water-soluble antimicrobial zein nanoparticles by a modified antisolvent approach and their characterization.** *Journal of Food Engineering*. v. 119, p. 343–352, 2013.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** 2 ed. Nova Odessa-SP. Instituto Plantarum. 2008. 544p.
- LUO, Y.; WANG, Q. **Zein-Based Micro- and Nano-Particles for Drug and Nutrient Delivery: A Review.** *Journal of Applied Polymer Science*, v. 131, n. 16, p. 40696, 2014.
- LUPI, E.; HATZ, C.; SCHLAGENHAUF, P. **The efficacy of repellents against *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* and *Ixodes* spp. - a literature review.** *Travel Medicine and Infectious Disease*, v. 11, p. 374–411, 2013.
- LYUBIMOV, V.E.; OSIPOV, V.I.; ROMANOV, D.V.; TSOI, YU.A. **Method and medical preventive device for impulse frequency resonant electromagnetic field for prophylaxis and treatment of cow udder diseases, stimulation of lactation.** Depositante: Russian Sci. Res. Agro; Eng. Cent. Vim. RU2644826-C1. Depósito: 14 de fevereiro de 2018. Disponível em: <http://apps-webofknowledge.ez87.periodicos.capes.gov.br/full_record.do?product=DIIDW&search_mode=GeneralSearch&qid=12&SID=6DRFGilUByrGi7yFvmg&page=1&doc=1&cacheurlFromRightClick=no>. Acesso em: janeiro, 2020.
- MARCIANI, D.J. **Formulation, useful for vaccinating subject to potentiate T-helper 2 immune response against antigen in e.g. human, comprises antigens comprising amyloid-beta derived antigens and tau-derived**

antigen, and triterpene saponins adjuvants. Depositante: Qantu Therapeutics Inc. WO2015017280-A1; EP3027205-A1; US2016166663-A1; EP3027205-A4; US10195257-B2. Depósito: 05 de fevereiro de 2015. Disponível em: <http://apps-webofknowledge.ez87.periodicos.capes.gov.br/full_record.do?product=DIIDW&search_mode=GeneralSearch&qid=17&SID=6DRFGilUByrGi7yFvmg&page=1&doc=1&cacheurlFromRightClick=no#searchErrorMessage>. Acesso em: janeiro, 2020.

MARTINS, J.R.S. **Carrapato *Boophilus microplus* (Can. 1887) (Acari: Ixodidae) resistente a ivermectina, moxidectina e doramectina.** Rio Grande do Sul, Brasil. 2006. 74 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2006.

MASEK, J.; LUKAC, R.; RASKA, M.; KNOTIGOVA, P.T.; TURANEK, J.; LUBASOVA, D.; MILLER, A.D. **Mucoadhesive (e.g. particle) carrier, used in mucoadhesive delivery system e.g. to treat allergy, comprises nanoscaffold or matrix carrying substance or active pharmaceutical ingredient present in form of particles, and mucoadhesive layer.** Depositante: Globalacorn Ltd. WO2018033744-A1. Depósito: 22 de fevereiro de 2018. Disponível em: <http://apps-webofknowledge.ez87.periodicos.capes.gov.br/full_record.do?product=DIIDW&search_mode=GeneralSearch&qid=19&SID=6DRFGilUByrGi7yFvmg&page=1&doc=1&cacheurlFromRightClick=no>. Acesso em: janeiro, 2020.

McCALL, J. W.; LINDEMANN, B. A.; PORTER, C. A. **Evaluation of ivermectin and milbemycin oxime efficacy against *Dirofilaria immitis* infections of three and four months' duration in dogs.** American journal of veterinary research, v.57, n.8, p.1189-1196, 1996.

MEHNERT, W.; MADER, K. **Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications.** Advanced Drug Delivery Reviews, v.47, p.165–96, 2001.

MELO, M. M.; MARQUES, A. P.; VIANA, F. A. B. **Avaliação das enzimas alanina aminotransferase, aspartato-aminotransferase, fosfatase alcalina e creatinina fosfoquinase em cães submetidos à administração semanal de ivermectina.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. v. 47, n. 6, p. 753-761, 1995.

- MILLEZI, A.F.; BAPTISTA, N.N.; CAIXETA, D.S.; ROSSONI, D.F.; CARDOSO, M.G.; PICCOLI, R.H. **Caracterização e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli***. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v.15, n.3, p.373-379, 2013.
- NATH, D.; BANERJEE, P. **Green nanotechnology – A new hope for medical biology**. Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 36, n. 3, p. 997–1014, 2013.
- NWANADE, C.F.; WANG, M.; WANG, T.; YU, Z.; LIU, J. **Botanical acaricides and repellents in tick control: current status and future directions**. Experimental and Applied Acarology, v.81, p.1–35, 2020.
- OLIVEIRA, J.; CHAVES, L. J.; DUARTE, J. B.; BRASIL, E.; FERREIRA JUNIOR, L.; RIBEIRO, K. **Teor de proteína no grão em populações de milho de alta qualidade protéica e seus cruzamentos**. Pesquisa Agropecuária Tropical, v. 34, n. 1, p. 45-51, 2007.
- OLIVEIRA, J.L.; CAMPOS, E.V.R.; GERMANO-COSTA, T.; LIMA, R.; DELLA VECHIA, J.F.D.; SOARES, S.T.; ANDRADE, D.J.; GONÇALVES, K.C.; NASCIMENTO, J.; POLANCZYK, R.A.; FRACETO, L.F. **Association of zein nanoparticles with botanical compounds for effective pest control systems**. Pest Management Science, v.75, p.1855-1865, 2019.
- OLIVEIRA, J.L.; CAMPOS, E.V.R.; PEREIRA, A.E.S.; PASQUOTO, T.; LIMA, R.; GRILLO, R.; ANDRADE, D.J.; SANTOS, F.A.D.; FRACETO, L.F. **Zein nanoparticles as eco-friendly carrier systems for botanical repellents aiming sustainable agriculture**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 66, p. 1330-1340, 2018.
- PALIWAL, R.; PALAKURTHI, S. **Zein in Controlled Drug Delivery and Tissue Engineering**. Journal of Controlled Release, v. 189, p. 108–122, 2014.
- PAPALIA, I.S.; LONDERO, P.M.G. **Extração de zeína e sua aplicação na conservação dos alimentos**. Ciência Rural. v. 45. p. 552-559, 2015.
- PARK, C. E.; PARK, D.J.; KIM, B.K. **Effects of a chitosan coating on properties of retinol-encapsulated zein nanoparticles**. Food Science and Biotechnology. v. 24, p. 1725–1733, 2015.

- PASCOLI, M.; DE LIMA, R.; FRACETO, L.F. **Nanoparticles and Strategies to Improve Colloidal Stability: A Mini-Review**. *Frontiers in Chemistry*, v. 6, p. 1-6, 2018.
- PASCOLI, M.; JACQUES, M. T.; AGARRAYUA, D. A.; AVILA, D. S.; LIMA, R.; FRACETO, L.F. **Neem oil based nanopesticide as an environmentally-friendly formulation for applications in sustainable agriculture: An ecotoxicological perspective**. *Science of The Total Environment*, v. 677, p. 57-67, 2019.
- PIMPÃO, C.T.; ROCHA, R.M.V.M.; SCHAEFER, R.; WOUK, A.F.P.F.; CIRIO, S.M.; BENATO, E.M., GURGEL, L.G.A.; FRONCZAK, M.A. **Avaliação dos efeitos toxicológicos da ivermectina em cães**. *Revista Acadêmica*, v.3, n.4, p.19-24, 2005.
- PRINS, C.L.; FREITAS, S.P.; CAMPOSTRINI, E.; GRAVINA, G.A.; REIS, F.O. **Efeitos de confinamento do sistema radicular sobre capim-limão (*Cymbopogon citratus*)**. *Revista Ciência Agronômica*, v. 39, n. 03, p. 416-421, 2008.
- QUEIROZ, S. *Tratado de toxicologia ocupacional*. 2. ed. Rio de Janeiro: Biblioteca 24 Horas, 2015. 554 p.
- RATES, S.M.K. **Plants as source of drugs**. *Toxicon*, v.39, p.603-613, 2001.
- RODRIGUES, K. M. S. **Ação do linalol sobre o sistema cardiovascular de ratos normotensos**. 2011, 146f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2010.
- ROY, A.; BAJPAI, J.; BAJPAI, A. K. **Dynamics of Controlled Release of Chlorpyrifos from Swelling and Eroding Biopolymeric Microspheres of Calcium Alginate and Starch**. *Carbohydrate Polymers*, v. 76, n. 2, p. 222–231, 2009.
- SABATINI, G.A.; KEMP, D.H.; HUGHES, S.; NARI, A., HANSEN, J. **Tests to determine LC₅₀ and discriminating doses for macrocyclic lactones against the cattle tick, *Boophilus microplus***. *Veterinary Parasitology*. v. 95, p. 53–62, 2001.
- SAFAEI-CHEREHH, A.; RASOULI, B.; ADENIYI ALABA, P.; SEIDAVI, A.; ROJAS HERNÁNDEZ, S.; SALEM, A.Z.M. **Effect of dietary *Foeniculum vulgare* Mill. extract on growth performance, blood metabolites, immunity and ileal microflora in male broilers**. *Agroforestry Systems*, v.94, p. 1269–1278, 2020.

- SAMISH, M.; REHACEK, J. **Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control**. Annual Review of Entomology, v. 44, p. 159–182, 1999.
- SANGANERIA S. **Vibrant India: Opportunities for the flavor and fragrance industry**. Perfumer & Flavorist, v. 30, n. 7, p. 24-34, 2005.
- SANTHOSHKUMAR, T.; RAHUMAN, A.A.; BAGAVAN, A.; MARIMUTHU, S.; JAYASEELAN, C.; KIRTHI, A.V. **Evaluation of stem aqueous extract and synthesized silver nanoparticles using *Cissus quadrangularis* against *Hippobosca maculata* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. Experimental Parasitology, v. 132, p.156-165, 2012.
- SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.; FREITAS, L.L.; POHLMANN, A.R. **Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos**. Quimica Nova, v.26, p.726-737, 2003.
- SERDA, R.E.; MERAZ, I.M. **Cationic liposomal nanoparticle useful for manufacturing medicament for treating or ameliorating symptom of cancer in mammal comprises portion, outer surface, and reservoir inside portion**. Depositante: Methodist Hospital. WO2017035009-A1; US2018243216-A1. Depósito: 02 de março de 2017. Disponível em: <http://apps-webofknowledge.ez87.periodicos.capes.gov.br/full_record.do?product=DIIDW&search_mode=GeneralSearch&qid=23&SID=6DRFGilUByrGi7yFvmg&page=1&doc=1&cacheurlFromRightClick=no#searchErrorMessage>. Acesso em: janeiro, 2020.
- SHAMS, H. **Recent developments in veterinary vaccinology**. The Veterinary Journal, v. 170, p. 289–99, 2005.
- SHUKLA, R.; CHERYAN, M. **Zein: the industrial protein from corn**. Industrial Crops and Products, v.13, p.171-192, 2001.
- SILVA, T.F.; ALVES-SOBRINHO, A.V.; LIMA, L.F.S.; ZIEMNICZAK, H.M.; FERRAZ, H.T.; LOPES, D.T.; SILVA, V.L.D.; BRAGA, I.A.; SATURNINO, K.C.; RAMOS, D.G.S. **Bovine parasite sadness: Review**. Research, Society and Development, v. 10, n. 1, p. e15410111631, 2021.
- SINGH, P.; SHUKLA, R.; PRAKASH, B.; KUMAR, A.; SINGH, S.; MISHRA, P.K.; DUBEY, N.K. **Chemical profile, antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential**

- oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene.** Food and Chemical Toxicology, v.48, p.1734-40, 2010.
- SONENSHINE, D.E. **Tick pheromones and their use in tick control.** Annual Review of Entomology, v. 51, p. 557–580, 2006.
- SONENSHINE, D.E.; ROE, R.M. **Overview: ticks, people, and animals.** In: Sonenshine, D.E., Roe, R.M. (Eds.), Biology of Ticks. Oxford University Press, New York, pp. 3-16, 2014.
- SOUSA, F.F.O.; LUZARDO-ÁLVAREZ, A.; BLANCO-MÉNDEZ, J.; OTERO ESPINAR, F.J.; MARTÍN-PASTOR, M.; SÁNDEZ MACHO, I. **Use of ¹H NMR STD, WaterLOGSY, and Langmuir monolayer techniques for characterization of drug–zein protein complexes.** European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 85, n. 3, p. 790–798, 2013.
- STEINFELD, H.; GERBER, P.; WASSENAAR, T.; CASTEL, V.; ROSALES, M.; DE HAAN, C. **Livestock’s Long Shadow: Environmental Issues and Options.** Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), v. 24, Rome, 2006.
- STIERNAGLE, T. **Maintenance of C. elegans.** C. elegans, v. 2, p. 51-67, 1999.
- SUN, J. D-Limonene: safety and clinical applications. Alternative Medicine Review, v. 12, n. 3, p. 259–264, 2007.
- TARHINI, M.; GREIGE-GERGES, H.; ELAISSARI, A. **Protein-based nanoparticles: from preparation to encapsulation of active molecules.** International Journal of Pharmaceutics. v. 522, p. 172–197, 2017.
- THOMSON REUTERS. **Derwent Innovations Index.**, Disponível em: <http://apps-webofknowledge.ez87.periodicos.capes.gov.br/DIIDW_GeneralSearch_input.do?product=DIIDW&search_mode=GeneralSearch&SID=7FGd28iYC2IXBOg1LVu&errorQid=64#searchErrorMessage>. Acessado em: janeiro, 2020.
- TORRES-SANGIAO, E.; HOLBAN, A.M.; GESTAL, M.C. **Advanced Nanobiomaterials: Vaccines, Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases.** Molecules, v. 21, p. 867-889, 2016.
- TREES, A.J. **On ticks and tick-borne diseases.** Parasitology Today, v. 15, p. 253-254, 1999.
- TUCK, S. **The control of cell growth and body size in C. elegans.** Experimental cell research, 321, 11/18 2013.

- UNDERWOOD, C.; VAN EPS, A. W. **Nanomedicine and Veterinary Science: The Reality and the Practicality**. The Veterinary Journal, v. 193, n. 1, p. 12–23, 2012.
- VALENTINI, S.R.; SOMMER, W.A.; MATIOLI, G. **Validação de métodos analíticos**. Arquivos do Museu Dinâmico Interdisciplinar. v. 11, n. 2, p. 26-31, 2013.
- VERCRUYSSSE, J.; ALBONICO, M.; BEHNKE, J.M.; KOTZE, A.C.; PRICHARD, R.K.; McCARTHY, J.S.; MONTRESOR, A.; LEVECKE, B. **Is anthelmintic resistance a concern for the control of human soil-transmitted helminths?** International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance, v. 1, p.14-27, 2011.
- WILLADSEN, P. **Tick control: thoughts on a research agenda**. Veterinary Parasitology, v. 138, p. 161–168, 2006.
- WILLADSEN, P.; BIRD, P.; COBON, G.S.; HUNGERFORD, J. **Commercialization of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus***. Parasitology, v. 110, p. S43–S50, 1995.
- WOODRUFF, G. C.; JOHNSON, E.; PHILLIPS, P. C. **A large close relative of *C. elegans* is slow-developing but not long-lived**. BioMed Central Ecology and Evolution, v. 19 p. 74, 2019.
- WULFF-PÉREZ, M.; DE VICENTE, J.; MARTÍN-RODRÍGUEZ, A.; GÁLVEZ-RUIZ, M. J. **Controlling lipolysis through steric surfactants: New insights on the controlled degradation of submicron emulsions after oral and intravenous administration**. International Journal of Pharmaceutics, v. 423, n. 2, p. 161–166, 28 fev. 2012.

ANEXO A – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA

Embrapa

Pecuária Sudeste

CERTIFICADO

PRT N° 01/2019

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

São Carlos, 18 de junho de 2019



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

Reunião de 18/06/2019

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/07/2019 a 31/03/2022
Espécie/linhagem/raça	<i>Bos taurus</i> raça Holandesa
N° de animais	34
Peso/Idade	200-300 kg
Sexo	Machos
Origem	Embrapa Pecuária Sudeste