

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
NANOCIÊNCIAE NANOBIOTECNOLOGIA

**AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DA NARINGENINA NANOESTRUTURADA  
NA AGROPECUÁRIA**

Brasília DF  
Junho, 2023

ALICE LIMA ROSA MENDES

**AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DA NARINGENINA NANOESTRUTURADA NA  
AGROPECUÁRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>: Livia Cristina Lira de Sá Barreto.

Coorientador: Prof. Dr.: Marcílio Sérgio Soares da Cunha Filho.

Brasília -DF

Junho, 2023

## **Ficha catalográfica**

ALICE LIMA ROSA MENDES

**AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DA NARINGENINA NANOESTRUTURADA NA  
AGROPECUÁRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

**Brasília, 06 de julho de 2023.**



Documento assinado digitalmente

LIVIA CRISTINA LIRA DE SA BARRETO

Data: 15/07/2023 09:06:56-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Livia Cristina Lira de Sá Barreto  
(Presidente, PPGNANO/IB/UnB)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Talita Faraj Faria  
(Examinadora externa)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Jairelda Sousa  
Rodrigues (Examinadora  
externa)

---

Prof. Dr. Marcílio Sergio Soares da Cunha Filho  
(Examinador suplente, PPGNANO/IB/UnB)

*Dedico primeiramente a Deus,  
Agradecendo-lhe por nunca me ter  
abandonado em diversas situações.  
Agradeço também a minha família,  
especialmente à minha mãe Nelma e ao meu  
pai,  
Lino in memoriam.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, e a Nossa Senhora por toda intercessão, por todas as graças, bênçãos e livramentos que me aclamaram e me confortaram nos momentos de atribuições, em meio as turbulências que me permitiu enfrentar diversas situações difíceis para me proporcionar meu melhor em concluir esse trabalho.

À minha mãe, **Nelma Lima Rosa Mendes** que não mediu esforços mesmo distante me deu suporte e incentivo para priorizar e alcançar meus objetivos através dos estudos e *in memoriam* **Lino Mendes Rodrigues**, que mesmo diante de Deus pai, sei que me acompanhou e me deu forças suficientes para não desistir e sim por meio das dificuldades mostrar o caminho certo para conseguir.

Às minhas queridas irmãs, **Isia Lima Rosa Mendes** e **Iane Lima Rosa Mendes** obrigada por me ensinar minhas virtudes. Aos meus tios e familiares que me acolheram em Brasília com muito carinho **Julia Oliveira, Bezerra Oliveira, Pedro Rodrigues, Rosilene Rodrigues, Rosimeire Rodrigues** e minhas queridas primas **Soraya Rodrigues, Carine Vilela Rodrigues, Viviane Barcelos, Bruna Oliveira, Samara Rodrigues, Nadia Rosa Alvarenga** por se disponibilizarem pelo menos uma vez ao mês e me tirarem da rotina.

Aos meus queridos amigos do meu prédio **Andrea Franco, Vanessa Menezes, Simone Santiago, Paulinho, Romeu Fortes, Laís Brasileiro, Robert Gomes, Ivan Pereira, Daniel Gomes e Cida Campos** que tive uma honra em poder conhecer e dividir diversos momentos se tornando ate mesmo irmãs como a **Isabela Gomes Magalhães Ferreira** que me trouxe uma família e amigos em Luziânia-Go, **Gabriela Ribeiro de Macedo Lima** que se tornou uma mãe e meu irmão de vida **Janailton Mick Vítor da Silva** meu muito obrigada por tudo.

Aos meus queridos amigos e colegas de laboratório LTMAC que sempre se disponibilizaram para o que eu precisasse, obrigada por toda ajuda e companheirismo e aprendizado nessa jornada: **Farmacêutica Ana Luiza Lima do Nascimento, Pedro Andres, Dra. Ludmila Alvim, Dr. Idejan Padilha Gross, Msc. Jessika Layane Rocha, Dr. Breno Matos, Danilo Negreiros, Msc. Camila Oliveira Cardoso, Luma de Lira, Msc. Seila Tolentino, Msc. Rayssa Ferreira, Msc. Geisa Barbalho, Thamires**

**Miranda, Msc. Jaynaraian Martins** e aos queridos professores **Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tais Gratieri, Prof. Dr Guilherme M. Gelfuso** por dividirem tanto conhecimento acadêmicos. A **Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daniela Castilho Orsi**, por dividir os conhecimentos e auxiliar nos experimentos no laboratório de microbiologia.

Aos meus queridos “pais orientadores”, “papis” e “mamis”, **Prof. Dr Marcilio Sérgio Soares da Cunha Filho** e **Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Livia Cristina Lira de Sá Barreto**, respetivamente, por toda dedicação, acompanhamento, preocupação, disponibilidade, presença, atencao, e até mesmo em situações alheias ao desenvolvimento da pesquisa, desde o início de minha jornada, sempre presentes e prestativos. Meu muito obrigada por tudo, tudo mesmo.

As minhas queridas irmãs do laboratório LABTEC/FCE/UnB, **Msc. Maiane Silva de Souza e Farmacêutica Tainara Melo Lira** e em especial `a **Farmacêutica Evalina Costa de Sousa** que me acompanhou desde o início da jornada na mudança de projeto disponibilizando ajuda nos experimentos, muito obrigada por toda ajuda, distrações, frustrações, conquistas, brincadeiras e amizade.

Aos funcionários da EMBRAPA, **Fred Gomes, Claudiomir Gonçalves da Silva** por viabilizarem a coleta das amostras de carrapatos, essenciais ao estudo.

À **Coordenação de Apoio a Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelo apoio financeiro, através da bolsa de mestrado.

À **Universidade de Brasília - UnB**, pela oportunidade de formação e titulação de mestre, através do Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, do Instituto de Ciências Biológicas, e pelo suporte financeiro ao projeto através do Edital COPEI-DPI/DEX 01/2021.

Agradeço, por fim, à **Fundação de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal – FAP-DF**, pelo apoio e parceria.

## RESUMO

O presente estudo visou o desenvolvimento e caracterização de nanosistemas contendo Naringenina como alternativa eficaz para o controle de pragas na pecuária e na agricultura. As nanoformulações foram obtidas por métodos e/ou composição distintas, e caracterizadas quanto ao pH, potencial Zeta, índice de polidispersão (PDI) e tamanho médio. A caracterização biológica envolveu a avaliação da efetividade acaricida, frente a *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (carrapato bovino), através do teste de imersão larval (TIL) e teste de imersão de adultos (TIA), e a avaliação da inocuidade germinativa, através da embebição de sementes de *Lactuca sativa* (alface) e avaliação do crescimento por sete dias. Os nanosistemas desenvolvidos apresentaram diferentes características físico-químicas, que pode ser justificado pela composição e método de elaboração distintos. Entretanto, todas as formulações apresentaram efetividade acaricida em comparação aos controles negativo, água destilada, e positivo, Amitraz (TRIATOX®). No ensaio TIL, os nanosistemas 1 e 2, contendo naringenina, geraram mortalidade maior ou igual a 95%, respectivamente. Enquanto o nanosistema 3, contendo naringenina, gerou cerca de 85% de mortalidade. A inocuidade avaliada pelo teste de germinação de *L. sativa*, foi possível observar que a nanoestruturação 3 da naringenina promoveu 68% de crescimento radicular, próximo ao valor de referência indicado na Instrução Normativa, MAPA nº 42 de 2019 (70% para germinação básica). Enquanto os nanosistemas 1 e 2 superaram o valor de referencia (75%). Os resultados físico-químicos indicaram variação dos parâmetros para os nanosistemas desenvolvidos. Entretanto, estes fatores não provocaram interferências nas características biológicas avaliadas para efetividade e inocuidade. Sendo assim, é possível inferir que as nanoformulações contendo a naringenina como princípio ativo podem ser aplicadas no controle da resistência acaricida em relação a teleógenas e larvas de carrapatos bovinos, sem provocar danos ao meio ambiente. Em adição, a diversidade de métodos utilizados para nanoestruturação do fitoingrediente, possibilita ampliar o leque produtivo para as indústrias.

**Palavras-chave:** Naringenina, Nanotecnologia, Carrapato bovino.

## ABSTRACT

The present study aimed to develop and characterize nanosystems containing Naringenin as an alternative for pest control in livestock and agriculture. Nanoformulations were obtained by different methods and/or compositions and characterized by pH, Zeta potential, polydispersion index (PDI), and average size. The biological characterization involved the evaluation of the acaricidal activity against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (bovine tick) by the larval immersion test and adult immersion test and the assessment of germinal harmless by *Lactuca sativa* (lettuce) seed imbibition and growth evaluation for seven days. The naringenin-based nanosystems presented different physicochemical characteristics, which can be justified by the different composition and methods of elaboration. However, all formulations showed acaricidal effectiveness compared to negative controls, distilled water, and positive controls, Amitraz (TRIATOX®). Nanosystems 1 and 2 generated mortality greater than or equal to 95% in the larval immersion test. Nanosystem 3, in turn, led to 85%. The harmless evaluated by the *L. sativa* germination test showed that nanosystem 3 promoted 68% of root growth, close to the reference value indicated in Brazilian Normative Instruction MAPA n° 42 of 2019, while nanosystems 1 and 2 surpassed the reference value (75%). The physical-chemical results showed that the parameter variations used do not compromise the biological characteristics of the nanosystems. Therefore, it is possible to infer that nanoformulations containing naringenin as an active ingredient can be applied to control acaricide resistance against teleogenous ticks and bovine tick larvae without causing damage to the environment. In addition, the diversity of methods used for nanostructuring such phytoingredient makes it promising for industrial production.

**Keywords:** Naringenin, Nanotechnology, Bovine tick,

## RESUMEN

El presente estudio tuvo el objetivo de desarrollo y caracterización de nanosistemas de Naringenina como alternativa efectiva para el control de plagas en ganadería y agricultura. Las formulaciones se obtuvieron por diferentes métodos y/o composiciones, y se caracterizaron por pH, potencial Zeta, índice de polidispersión (PDI) y tamaño. La caracterización biológica involucró la evaluación de la efectividad acaricida, contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (garrapata del ganado vacuno), a través de los ensayos de inmersión de larvas (TIL) y inmersión de adultos (TIA), y la evaluación de la inocuidad germinal, a través de imbibición de semillas de *Lactuca sativa* (lechuga), y evaluación del crecimiento durante siete días. Los nanosistemas desarrollados presentaron diferentes características fisicoquímicas, lo que puede justificarse por la diferente composición y método de elaboración. Sin embargo, todas las formulaciones mostraron efectividad acaricida en comparación con los controles negativos, agua destilada, y los controles positivos, Amitraz (TRIATOX®). En el ensayo TIL, los nanosistemas 1 y 2, que contenían naringenina, generaron mortalidad mayor o igual al 95 %. Mientras que el nanosistema 3, que contenía naringenina, generó alrededor del 85%. La inocuidad evaluada por la prueba de germinación de *L. sativa*, se pudo observar que la nanoestructuración de naringenina 3 promovió el 68% del crecimiento radicular, cercano al valor de referencia indicado en la Instrucción Normativa Brasileña, MAPA n° 42 de 2019 (70% para germinación básica). Mientras que los nanosistemas 1 y 2 superaron el valor de referencia (75%). Los resultados fisicoquímicos indicaron variación de los parámetros para los nanosistemas desarrollados. Sin embargo, estos factores no produjeron alteraciones frente a las características biológicas evaluadas para efectividad e inocuidad. Por lo tanto, es posible inferir que las nanoformulaciones que contienen naringenina como ingrediente activo pueden aplicarse para controlar la resistencia acaricida contra garrapatas y larvas de garrapatas de vacuno, sin causar daños al medio ambiente. Además, la diversidad de métodos utilizados para la nanoestructuración del fitofarmaco permite ampliar la gama productiva para las industrias.

**Palabras clave:** Naringenina, Nanotecnología, Garrapata vacuno.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* teleóginas fêmeas ingurgitadas.
- Figura 2.** Representação esquemática, do ciclo de vida do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.
- Figura 3.** Principais fontes de naringina.
- Figura 4.** Teleóginas separadas em grupos homogêneos em triplicada.
- Figura 5.** Eppendorf com ovos de teleóginas.
- Figura 6.** Eficácia dos produtos em lavas mortas.
- Figura 7.** Teste de germinação da alface (*Lactuca sativa*).
- Figura 8.** Teste de imersão das adultas em triplicata com eclosão das teleóginas.
- Figura 9.** Eficiência do produto teleóginas de *R. microplus*.
- Figura 10.** Teste de germinação da alface.

## LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

**Tabela 1.** Caracterização das nanoformulações contendo Nanossistema 1; Nanossistema 1 NAR, Nanossistema 2, Nanossistema 2 NAR, Nanossistema 3, Nanossistema 3 NAR, quanto ao PDI, índice de polidispersão e diâmetro da gotícula (nm).

**Tabela 2.** Resultado da avaliação do potencial zeta (mV) das nano formulações contendo Nanossistema 1; Nanossistema 1 NAR, Nanossistema 2, Nanossistema 2 NAR, Nanossistema 3, Nanossistema 3 NAR.

**Tabela 3.** Avaliação do pH das nanoformulações contendo Nanossistema 1, Nanossistema 1 NAR, Nanossistema 2, Nanossistema 2 NAR, Nanossistema 3, Nanossistema 3 NAR.

**Tabela 4.** Média e desvio padrão de eficiência carrapaticidas por grupo Controle negativo/ água\*, controle positivo/Triatox\*\*, Nanossistema 1, Nanossistema 1 NAR, Nanossistema 2, Nanossistema 2 NAR, Nanossistema 3, Nanossistema 3 NAR, em teste *in vitro* com teleóginas de *R. microplus* procedentes de bovinos naturalmente criados na Embrapa-Reencanto das Emas -DF.

**Tabela 5** - Teste de germinação da alface das nanoformulações contendo Nanossistema 1, Nanossistema 1 NAR, Nanossistema 2, Nanossistema 2 NAR, Nanossistema 3, Nanossistema 3 NAR. Controle negativo água em alface *Lactuca sativa*. Brasília- Df (Reencanto das Emas).

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A/O	Água em óleo
A/O/A	Água em óleo em água
OMS	Organização Mundial da Saúde
NAR	Naringenina
TPB	Tristeza parasitária bovina (TPB)
LTMAC	Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos
HP $\beta$ CD	Hidroxipropil beta ciclodextrina
LABTEC	Laboratório Multidisciplinar de Tecnologias
ER	Eficiência Reprodutiva
PMO	Peso da massa de ovos
PFI	Peso da fêmea ingurgitada
ECLO	Eclodibilidade
SG	Sementes germinadas
SNG	Sementes não germinadas (SNG)
IVG	Índice de Velocidade de Germinação
TIL	Teste de imersão Larval
TIA	Teste de imersão de Adultas
UnB	Universidade de Brasília
FCE	Faculdade de Ceilândia
pH	Potencial Hidrogeniônico
PDI	Índice de polidispersividade

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>3</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>5</b>
2.1 Objetivo Geral .....	5
2.2 Objetivos Específicos .....	5
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>6</b>
3.1 Carrapatos .....	6
3.2 <i>Rhipicephalus (Boophilus) Microplus</i> .....	6
3.2.1 Ciclo de Vida do Carrapato .....	9
3.2.2 Carrapaticidas .....	11
3.2.3 Utilização como Alternativa aos Produtos Carrapaticidas .....	13
3.3 Teste de Germinação .....	14
3.4 Fitofármacos .....	15
3.4.1 Naringenina .....	16
<b>4 MATERIAL E MÉTODO .....</b>	<b>17</b>
4.1 Local e Condições Experimentais .....	17
4.2 Reagentes .....	17
4.3 Preparo das Nano formulações .....	18
4.3.1 Desenvolvimento de Desenvolvimento do Nanossistema 1 .....	18
4.3.2 Desenvolvimento de Desenvolvimento do Nanossistema 2.....	18
4.3.3 Desenvolvimento de Desenvolvimento do Nanossistema 3.....	19
4.4 Caracterização das nano formulações.....	20
4.4.1 PDI e Tamanho da Partícula.....	20
4.4.2 Potencial Zeta .....	20
4.4.3 Mensuração do pH.....	20
4.5 Avaliação Acaricida.....	20
4.5.1 Teste de imersão de adultos (TIA) .....	20
4.5.2 Teste de imersão Larval (TIL).....	22
4.6 Teste de Germinação .....	23
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>24</b>
5.1 PDI e Tamanho da Gotícula .....	24
5.2 Potencial Zeta .....	26
5.3 Mensuração do pH.....	26

5.4 Teste de imersão de Adultos.....	27
5.5 Teste de imersão Larval.....	29
5.6 Teste de Germinação .....	31
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>33</b>
<b>REFERÊNCIA.....</b>	<b>34</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A aplicação de metabolitos secundários vegetais responsáveis por diferentes atividades biológicas remonta à antiguidade e apresenta interesse crescente pelas indústrias farmacêuticas, devido ao seu potencial inesgotável e inovador, tanto de substâncias, como de aplicações. Apesar do uso de plantas e/ou seus metabolitos consistirem ferramenta usual da medicina tradicional, sendo reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS), devido a sua utilização na atenção primária, por cerca de 80% da população, sua aplicação para o controle de pragas tem um aumento significativo no setor da agricultura e da pecuária (PORTO., et al. 2015).

Alguns pesticidas naturais destacam suas características de baixa solubilidade aquosa e composição complexa de bioativos, como: terpenoides, flavonoides e ácidos graxos, existentes, por exemplo, no óleo de Neem. Este insumo vegetal apresenta aplicação antimicrobiana, antiinflamatória, antioxidante e pesticida natural, tanto na agricultura quanto na medicina veterinária, para controlar uma variedade de pragas e doenças (MATO et al., 2020).

As plantas são uma importante fonte de substâncias com diferentes estruturas químicas, algumas das quais têm sido utilizadas ou são promissoras no controle de pragas agrícolas na pecuária. Extratos de certas plantas demonstraram a capacidade de reduzir o número de larvas que eclodem (BROGLIO., 2009). Entre essas plantas, temos as sementes de graviola (*Annona muricata L.*), as folhas de capim-santo (*Cymbopogon citratus (DC.)*), as flores de jambo (*Syzygium malaccensis (L.)*). Além disso, flavonoides encontrados em extratos de alfavaca (*Ocimum gratissimum L.*), carqueja (*Baccharis trimera (Less)*), e camomila (*Chamomilla recutita (L.) Rauschert*) têm demonstrado uma forte atividade carrapaticida (SANTOS et al., 2018).

A naringenina (NAR), 5,7,4'-triidroxiflavanona, é uma flavanona presente em grande quantidade em frutas cítricas, como laranjas e tangerinas, bem como na casca do tomate (MATO et al., 2020). Possuindo um peso molecular de (272,26 g/mol), sóluvel em solventes orgânicos, como por exemplo o etanol, baixa solubilidade em água em diferentes pHs (475 mg L<sup>-1</sup>), solúvel em solventes orgânicos, como por exemplo o etanol (SAHIN et al., 2017); PEDRO et al., 2021).

Entre as pragas frequentes no setor agropecuário, os carrapatos são destacados por sua diversidade, resistência aos pesticidas, e difícil controle, tanto no animal, como no meio ambiente. Em adição, são reconhecidos como agentes transmissores de doenças para

os humanos, como a febre maculosa (bactéria *Rickettsia rickettsii*), doença de Lyme (bactéria *Borrelia burgdorferi*), doença de Powassan (vírus Powassan), babesiose (protozoário *Babesia* spp.), Erliquiose (bactéria *Ehrlichia chaffeensis*) e Tularemia (bactéria *Francisella tularensis*) (TOSONI et al., 2016).

De acordo com, (LUZ et al., 2016) são conhecidas mais de 920 espécies, dentre elas, as pertencentes às famílias Ixodidae, são conhecidas como carrapatos “duros” e possuem aproximadamente 720 membros, distribuídos em 14 gêneros. Neste contexto, destaca-se que dos cinco tipos de carrapatos existentes no país, são as espécies de *Amblyomma* e *Rhizocephalus* têm aumentado bastante o interesse da comunidade científica, não somente pela sua relevância, mas para a higiene pública, e também pelo seu impacto financeiro (RECK et al., 2017). O *Boophilus microplus*, é a espécie de carrapato que mais prejudica a pecuária bovina no Brasil, a qual tem um custo anual estimado em mais de US\$ 1 bilhão.

A progressão biológica de *R. (B.) Microplus* pode ser subdividida em duas fases: uma etapa livre, vulgarmente denominada de não parasitária, quando ocorre a desova em um espaço ambiental apropriado e incubado para emitir larvas na pastagem; e a segunda etapa, parasitária, quando as formas larvárias abrigam-se no organismo do hospedeiro para desenvolverem-se na fase adulta sendo, por fim, liberados os exemplares das fêmeas ingurgitadas (LABRUNA et al., 2016).

Deste modo, é relevante possuir extenso conhecimento a respeito da biologia e do comportamento do carrapato e de suas larvas presente em pastos. Atualmente, há numerosas famílias e grupos químicos de carrapaticidas para auxiliar na eliminação desses ectoparasitas. Estes podem ser divididos em carrapaticidas de contato e sistêmicos (RECK et al., 2017).

A alface cultivada (*Lactuca sativa L.*) pertence à família Asteraceae (*Compisitae*) é nativa do Oriente Médio; é uma planta dicotiledônea consumida *in natura* durante sua fase de crescimento (SOUZA et al., 2015). Geralmente, o teste avalia os lotes de sementes, o que torna necessário o uso de métodos apropriados para avaliar a viabilidade das sementes, analisando os resultados e a possibilidade de diminuir o tempo do teste (TUNES et al., 2013). Os resultados do teste de germinação, mostram o percentual máximo de qualidade da semente, pois deve ser realizado de acordo com a temperatura, presença ou ausência de luz, umidade e tempo de exposição recomendada para cada espécie (RADAKE et al., 2016).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Desenvolver nanossistemas contendo Naringenina como alternativa eficaz para o controle de carrapatos na pecuária e ácaros na agricultura.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Utilizar diferentes tecnologias para obtenção de sistemas nanoestruturados de Naringenina.
- Realizar a caracterização físico-química e biológica dos nanossistemas obtidos para aplicação na agropecuária.
- Avaliar a aplicação sustentável dos sistemas desenvolvidos.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Carrapato

Todos os anos, novos registros são lançados em todo o mundo sobre carrapatos. Nesse sentido, já foram descritas mais de 920 espécies no mundo, divididas em três famílias, sendo duas as mais importantes e as mais numerosas: são mais de 720 espécies da família Ixodidae, divididas em 14 gêneros, comumente conhecidos como carrapatos “duros”. A segunda menor família, Argasidae, com mais de 200 espécies e cinco gêneros, são conhecidos como carrapatos “moles”. Finalmente, a família Nuttalliellidae, que foi determinada como tendo apenas uma espécie (NAVA et al., 2014).

Carrapatos, são artrópodes de importância médica e veterinária que podem infectar uma variedade de hospedeiros vertebrados, incluindo humanos. No Brasil, existe uma fauna composta por 73 espécies referentes a duas famílias: Argasidae com 26 espécies e Ixodidae, com 47 espécies (LEAL et al., 2017).

A família argasídeos são compostos por quatro gêneros: *Ornithodoros* que apresenta o maior número de espécies, *Antricola*, *Argas* e *Nothoaspis*. No entanto, a família Ixodídeos apresentam cinco gêneros: *Amblyomma* que apresenta uma maior abundância, *Ixodes*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus* e *Haemaphysalis* (KRAWCZAK et al., 2015; LABRUNA et al., 2016).

Nesse contexto, vale ressaltar que, dos cinco gêneros de carrapatos encontrados no Brasil, os carrapatos dos gêneros *Amblyomma* e *Rhizocephalus* têm despertado maior interesse da comunidade científica, seja pela importância do saneamento público, seja também pela importância econômica de impacto. Como exemplo de carrapato de importância para a saúde pública, destaca-se aqui a espécie *Amblyomma sculptum* (LUZ et al., 2016).

#### 3.2 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

A infestação por carrapatos é um problema grave em muitos países, pois afeta a saúde de animais de estimação, na pecuária e em humanos. O carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, é um dos mais importantes ectoparasitas que causam problemas em rebanhos em regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo (PÉREZ et al., 2019).

Esse carrapato afeta economicamente na produção bovina, reduzindo o ganho de peso e a produção de leite. Além disso, é vetor de patógenos causadores de doenças como babesiose

e anaplasmose. O controle de carrapatos é baseado principalmente no uso de acaricidas químicos. No entanto, seu uso levou ao rápido surgimento de populações de carrapatos resistentes (ABOELHADID et al., 2018).

No Brasil, a principal espécie de carrapato que compromete a produtividade da pecuária bovina, é normalmente conhecida como carrapato-do-boi, é chamada de *Boophilus microplus* (RECK et al., 2017). Os principais danos mais prejudiciais são: a) ingestão de sangue (uma fêmea pode ingerir até 2 mililitros de sangue durante sua alimentação sobre o hospedeiro) podendo causar redução da produção de carne e leite; b) transmissão de agentes infecciosos, principalmente Anaplasma e Babesia, responsáveis pela tristeza parasitária bovina (TPB); c) inoculação de toxinas nos hospedeiros, levando a diversas alterações e consequências fisiológicas, como a falta de apetite; e d) diminuição da qualidade do couro do animal, devido as cicatrizes irreversíveis ocasionadas durante a alimentação. Além desses danos, têm-se as despesas com mão-de-obra, construção e manutenção de banheiro, aquisição de equipamentos, compra de carrapaticidas, entre outros prejuízos significativos na pecuária brasileira (MARUYAMA et al., 2017).

Deve-se ter um cuidado no controle do carrapato, pois é uma fonte de prejuízos nos centros de raças bovinas e leiteiras. No entanto, em áreas onde a raça zebuína é explorado, este parasita não deve ser negligenciado, pois sua presença torna-se prejudicial, não apenas em situações especiais de manejo que levam ao estresse, como alimentação insuficiente, altas concentrações por hectare, desmame interrompido ou prematuro, também é usado para espalhar o TPB (GUGLIELMONE et al., 2014).

*Rhipicephalus (B.) microplus*, é popularmente conhecido como carrapato-do-boi. É um carrapato monóxeno e os bovinos são os seus principais hospedeiros. O parasita também pode ser encontrado em outros animais como ovinos, equinos e até mesmos os que compartilhem esse ambiente (MARUYAMA et al., 2017). Existe um grande desafio que surge devido à resistência de carrapatos aos acaricidas, decorrente principalmente de uso inadequado ou descontrolado destes produtos. O aparecimento de populações resistentes é um dos maiores problemas na produção de bovinos, pois relatos de resistência abrangem grande variedade de acaricidas comercialmente utilizados (WULFF et al., 2022).

A produção de leite, é drasticamente reduzida devido à presença de restos de produtos químicos usados para combater o carrapato-do-boi, resultando em significativas perdas para os pecuaristas. O *R. (B.) microplus*, traz consigo inúmeros danos para a cadeia produtiva bovina, por isso, o controle deste ectoparasito deve ser realizado de forma adequada para prevenir ou retardar a resistência (SOUSA et al., 2022).

Além disso, é essencial que sejam seguidas as diretrizes dos produtos usados no combate aos carrapatos, optando apenas por aqueles de uso veterinário. Desse modo, se evita a presença de resíduos tóxicos nos alimentos e o risco de intoxicação humana e animal durante a aplicação do carrapaticida. Portanto, o uso de produtos químicos é necessário para impedir contaminação dos carrapatos (DOS SANTOS et al., 2020).

### 3.2.1 Ciclo de vida do carrapato

A evolução biológica do *R. (B.) Microplus* pode ser dividida em duas etapas: uma fase de existência livre, também conhecida como não parasitária, a teleóquina procura um ambiente adequado e incubar seus ovos para produzir larvas na pastagem; e uma etapa parasitária, quando as larvas se alojam em seu hospedeiro e desenvolvem-se até a fase adulta, resultando na liberação das teleóginas (Figura 1- fêmeas ingurgitadas). Além disso, a representação da espécie pode ser considerada parasitas monóxenos, pois seu ciclo de vida se completa em um só hospedeiro. Tais carrapatos são comumente responsáveis por infestações devido à sua curta jornada de vida, sendo capazes de reproduzir-se rapidamente em tempos curtos (RECK et al., 2017).

**Figura 1.** Representação do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* teleóginas fêmeas ingurgitadas.



Fonte: Próprio autor, 2023.

A fase parasitária, inicia-se com a ancoragem da larva em um organismo suscetível, alguns locais do corpo deste ser são mais interessadas (úbere, entre pernas, barbela, zona períneo e traseira) seja pela temperatura e espessura da epiderme ou para se preservar da autodepuração realizada pelos hospedeiros na tentativa de eliminação desses ectoparasitas. Entre 4 e 7 dias depois da fixação da larva acontece a transição do estágio larval, para ninfa

que, depois de 9 a 16 dias, sofre uma ecdise, mudando para adulto. Desta forma, os adultos realizam cópula e as fêmeas se separam do hospedeiro entre 18 e 35 dias após a ancoragem das larvas. Apesar do tempo de fixação descrito na literatura de (18 à 35 dias), a fase parasitária do

*R. (B.) microplus*, desde a presença da larva até o seu desapego da teleógina, dura em média 21 dias (PÉREZ et al., 2019). Os machos permanecem por um longo tempo no hospedeiro, à procura de novas fêmeas. É importante notar que o estágio parasitário não é tão suscetível às circunstâncias climáticas, sendo que o hospedeiro preserva uma temperatura estável, ao contrário do estágio de vida livre, no qual o carrapato está exposto às mudanças da temperatura e a condições do ambiente (OLIVEIRA et al., 2016).

Conforme descrito anteriormente, a etapa não parasitária começa quando a teleógina se separa do indivíduo e cai no chão. De preferência, a desintegração ocorre na manhã ou no final da tarde, momentos que oferecem as condições climáticas mais favoráveis para a fêmea ingurgitada. Logo, procura-se um lugar para se refugiar, impedindo a incidência de luz solar e a presença de inimigos. Desde o momento da despreensão, até a ovipostura, necessita-se de 3 a 5 dias, em condições climáticas apropriadas. Nesse período ocorre a maturação dos ovários e a produção dos ovos. Entretanto, o tempo pode variar dependendo das condições climáticas (KRAWCZAK et al., 2015; LABRUNA et al., 2016).

Após a postura dos ovos, a fêmea morre, completando seu ciclo de vida e deixando seus ovos para incubar. Cada teleógina produz cerca de 50% de seu peso em ovos, em média três mil ovos. Depois de um determinado tempo de incubação, nascem as larvas, que têm três pares de pernas (hexápodas). O tempo de incubação também pode variar de acordo com as temperaturas, como, por exemplo se a temperatura estiver mais baixa, isso pode aumentar o tempo de incubação. Quase translúcidas, a coloração das larvas muda ao serem expostas ao ar, tornando-se avermelhada (VUDRIKO et al., 2022).

Após um período limitado de inatividade, as larvas se aglomeram nas extremidades das folhas do capim, onde permanecem juntas aguardando por um hospedeiro. Estudos realizados por Gauss; Furlong (2002) descreveram que as larvas são capazes de esperar pelo hospedeiro na pastagem por mais de oitenta dias.

A etapa não parasitária conclui quando as larvas finalmente se fixam ao hospedeiro ou morrem sem encontrar um adequado. Como se mencionou previamente, as condições climáticas influenciam significativamente o tempo da fase não parasitária. Estudos sugerem que, na primavera e verão (estações mais quentes), o lapso desde o descolamento da teleógina até a aparência das larvas na pastagem é menor do que nos meses de outono e inverno, prolongando a fase não parasitária nas partes do ano com temperaturas mais baixas (OLIVEIRA et al., 2016).

Na Figura 2, pode-se observar o ciclo de reprodução do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

**Figura 2.** Representação esquemática do ciclo de vida do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.



Fonte: ANUALPEC, 2013.

É importante ter presente que, aproximadamente 95% dos carrapatos no sistema de criação de bovinos se manifestam nas pastagens, nos estágios de ovos, larvas e/ou climatérios, enquanto somente 5% encontram-se parasitando nos animais (CAMPOS PEREIRA et al., 2008). Essa circunstância é relevante, pois a luta contra o *R. (B.) microplus*, acaba concentrada na pequena parte de carrapatos que parasitam bovinos (LÁZARO et al., 2013; RIBEIRO et al., 2011).

Considerando os estágios de existência de vida livre e parasitária, podemos dizer que a duração total do ciclo de vida do *R. (B.) microplus* é determinada pelas condições meteorológicas, depende das regiões e épocas do ano. Em situações favoráveis, o ciclo inteiro se pode concretizar em dois meses, mas quando as condições forem desfavoráveis, pode se estender por vários meses (NAVA et al., 2014).

Neste sentido, é altamente relevante ter profundo conhecimento do ciclo de vida do carrapato, incluindo questões como o comportamento dos ectoparasitos, as larvas e a dinâmica de sua população presente em pastos. Com essas informações, o agricultor estará apto a usar recursos eficazes para a prevenção e combater esse parasita (OLIVEIRA et al., 2016).

### 3.2.2 Carrapaticidas

A preocupação com o controle do carrapato bovino aumentou no país desde um certo período. Mesmo com os investimentos feitos pela indústria química, o carrapato continuou conseguindo se adaptar aos carrapaticidas oferecidos no mercado (LABRUNA et al., 2016). Atualmente, existem diferentes famílias e grupos químicos de carrapaticidas para eliminar esses ectoparasitas. Estes podem ser agrupados em carrapaticidas de contato e sistêmicos. Os primeiros são aplicados por meio de pulverização, imersão ou “*pour on*”. Para funcionarem, é necessário que os produtos tenham contato direto com o carrapato, penetrando através de seus orifícios ou da cutícula para ocasionar sua morte (ADENUBI et al., 2018).

Os carrapaticidas sistêmicos, por sua vez, são aplicados por meio de injeções, derrame na região dorsal ou pulverização nos dois lados da coluna vertebral. Os princípios ativos desses produtos, são absorvidos pelo organismo do animal e distribuídos por todo o corpo, atingindo, assim, os carrapatos, que também são eliminados (GRISI et al., 2014).

Carrapaticidas são divididos em famílias ou grupos químicos. Organofosforados, o mais antigo deles, ainda é comercializado para bovinos. Porém, possuem pouco poder residual e, para aumentar a eficácia, é preciso associá-lo a piretróides. Amidínicos, que sucederam os organofosforados, proporcionam maior poder residual, permitindo maiores intervalos de tratamento. Eles são amplamente usados pelos produtores, mesmo 30 anos após sua comercialização (VIEIRA et al., 2013).

Por fim, os sintéticos são os carrapaticidas de maior interesse, pois têm maior "poder residual" e menor toxicidade aos seres vivos e ao ambiente. Estes costumam ser originários principalmente da Deltametrina, Cipermetrina e Alfametrina. Devido ao seu elevado poder residual, a sobrevivência de indivíduos naturalmente tolerantes e a resistência das populações de carrapatos foram favorecidas. Para prolongar a eficácia desse grupo de carrapaticidas, formulações novas vêm sendo criadas com associação de piretróides a organofosforados, pois há uma associação entre eles (ADENUBI et al., 2018).

Outro carrapaticida que tem sido utilizado é o das fenilpirazóis, cujos princípios ativos afetam substâncias específicas do sistema nervoso dos carrapatos, paralisando-os. Porém, sua desvantagem é que não pode ser usado em animais em lactação com longo período de restrição antes do abate. É disponibilizado na forma "*pour on*". Naturalyte é o último grupo químico no mercado nacional, cujo componente ativo é o spinosad, obtido a partir da fermentação de um fungo actinomiceto. Seu maior benefício é o mecanismo de ação inovador e a liberação para uso em animais em lactação (ADENUBI et al., 2018).

Carrapaticidas sistêmicos, são aplicados por injeção ou pulverização; os princípios ativos são metabolizados pelo organismo e distribuídos a todo o corpo do animal, intoxicando

os carrapatos. Lactonas macrocíclicas derivam de produtos obtidos por fermentação de fungos, como as avermectinas e a moxidectina. São aplicados por injetáveis ou "pour on" e metabolizados pelo organismo, chegando à circulação sanguínea. Porém, apresenta como desvantagem de não poder ser usado em animais em lactação ou de corte pelo menos 30 dias antes do abate devido aos níveis de resíduos (GRISI et al., 2014).

Benzofenilureas, são drogas usadas para inibir o crescimento dos carrapatos, interrompendo a produção de quitina da cutícula e impedindo que as larvas eclodam. As subfamílias usadas são fluazuron e diflubenzuron, mas elas não são aplicáveis nos animais em lactação (LEAL et al., 2017).

### **3.2.3 Utilização como alternativa aos produtos carrapaticidas**

Vacinas contra carrapatos são alternativas aos produtos carrapaticidas, oferecendo segurança e ausência de período de carência. Os produtos TickGard, produzidos na Austrália, e Gavac, produzidos em Cuba, têm eficácia variando entre 51-91%. Estas são baseadas na proteína Bm86, presente na membrana das células do intestino de *R. microplus* (ADENUBI et al., 2018). A vacina, tem ação na lise das células intestinais do carrapato, reduzindo o número de parasitas e na fertilidade dos sobreviventes. Embora ainda não estejam disponíveis comercialmente no Brasil, possuem registro de licenciamento (VUDRIKO et al., 2022).

A fitoterapia tem sido amplamente recomendada para o controle de parasitas em fazendas, sendo como uma opção segura e menos agressiva para o homem e o para o meio ambiente. Os extratos vegetais são uma alternativa viável e de baixo custo, pois é obtido a partir de recursos renováveis, facilmente adquiridos e rapidamente degradáveis. Estes possuem a vantagem de conter diferentes substâncias que podem trabalhar sinergicamente para o controle dos parasitas, minimizando assim a resistência aos carrapaticidas naturais (VIEIRA et al., 2013).

Contudo, este método de controle precisa ser avaliado para se obter um produto realmente eficaz. Os fitoterápicos, quando selecionados com critério e testados, tendem a ser menos tóxicos para mamíferos, biodegradáveis e não gerar resistência. Apesar disso, há limitações associadas a este método, como a baixa concentração do bioativo no extrato bruto, variações sazonais, e dificuldade em formular compostos ativos que penetrem na cutícula do hospedeiro (MASCARIN et al., 2019).

Uma alternativa promissora para o controle biológico de carrapatos são os fungos filamentosos artropodo patogênicos, que possuem a capacidade de se espalhar e penetrar

diretamente na cutícula do hospedeiro. Estes organismos podem ser usados sob três estratégias: controle biológico clássico, aumento de inóculos, e conservação por meio de modificações de manejo (SOUSA et al., 2022).

### 3.3 Teste de germinação

A alface cultivada (*Lactuca sativa L.*) pertence à família Asteraceae (*Compositae*) nativa do Oriente Médio; uma planta dicotiledônea consumida *in natura* durante a sua fase de crescimento. Hoje, é uma das espécies de oleracea mais consumidas e amplamente distribuídas no mundo, sendo cultivada em quase todas as regiões geográficas. Hoje é o vegetal folhoso mais comum cultivado em quase todos os países (SOUZA et al., 2015).

Os produtores familiares cultivam de forma intensa e ampla, além de ser considerada uma boa fonte de vitaminas e sais minerais, destacando-se seu alto teor de vitamina A, contém também vitaminas C, B1 e B2, cálcio e ferro (MARTINS et al., 2011). É uma das hortaliças mais valorizadas e, juntamente com o tomate, também é a preferida dos brasileiros no preparo de saladas devido ao seu sabor agradável e possui facilidade em seu preparo (RADAKE et al., 2016).

O sistema de produção de sementes, na avaliação da qualidade fisiológica, é um fator importante na decisão de usá-las como material de propagação e na avaliação da qualidade fisiológica em que são deixadas. Nesse sentido, o teste de incubação provou ser bastante preciso e eficaz, além da padronização (SOUZA et al., 2015).

Os resultados do teste de germinação mostram o percentual máximo de qualidade da semente, pois deve ser realizado de acordo com a temperatura, presença ou ausência de luz, umidade e tempo de exposição recomendada para cada espécie. Em geral, o teste padrão avalia o potencial fisiológico dos lotes de sementes, portanto é necessário usar testes adequados em que há uma necessidade crescente de investigar e avaliar a capacidade e viabilidade das sementes, analisando os resultados e, o potencial de reduzir o tempo necessário para o teste (TUNES et al., 2013).

As sementes de hortícolas da família Asteraceae vem crescendo, sendo assim é possível analisar alterações na qualidade detectando ao longo do processo produtivo sendo possível a realização de novos testes padronizados e rápidos para permitir a qualidade entre as diferenças nos lotes das sementes de acordo com seu grau de deterioração. As ferramentas possíveis para realizar a qualidade da pós-maturação, serve para selecionar os problemas do cultivo identificando problemas no cultivo fisiológico (MARTINS et al., 2011).

A alface no período vegetativo vai desde a emergência das plântulas até o início da floração. Na fase vegetativa, em que se encerra as folhas elas tendem a atingir o seu tamanho maior. Quando ela estar florescendo sob dias longos e em temperaturas adequadas se inicia o seu pendoamento em que é a etapa reprodutiva, caso contrário se inicia a etapa vegetativa (TUNES et al., 2013).

### **3.4 Fitofármacos**

O estudo de metabólitos secundários de origem vegetal para a obtenção de fármacos vem crescendo cada vez mais nas indústrias farmacêuticas. A fitoquímica, tem como objetivo analisar os compostos bioativos presentes nos extratos de plantas medicinais. De acordo com a OMS, essas plantas são aquelas que possuem substâncias que podem ser usadas para fins terapêuticos. Além disso, a Secretaria de Vigilância Sanitária define um fitoterápico como um medicamento elaborado exclusivamente com matérias-primas vegetais para diagnóstico ou tratamento do usuário (GALVÃO et al., 2018).

Ao longo dos anos, os conhecimentos tradicionais dos povos indígenas sobre as propriedades e usos das plantas têm sido reconhecidos como uma fonte de informação extremamente valiosa. Esses conhecimentos, que foram acumulados durante séculos, fornecem uma compreensão única sobre o uso sustentável dos recursos naturais (BARBOSA et al., 2016).

O fitoterápico está associado à eficácia, reprodutibilidade e qualidade consistente, o que o distingue dos produtos farmacêuticos. Na sua elaboração, podem ser utilizados adjuvantes farmacêuticos autorizados, mas não inclui substâncias ativas de outras fontes. Por outro lado, o fitofármaco é uma substância ativa, obtida de matérias-primas vegetais, ou de uma mistura de substâncias ativas de origem vegetal. Contudo, a qualidade do fitoterápico pode ser afetada por substâncias não identificadas, adulterantes, diluentes ou extratos vegetais. Por isso, essa questão vem sendo tratada em trabalhos científicos recentes (LASANO et al., 2018).

Ao adquirir plantas medicinais, é importante estar consciente de todos os riscos citados acima. Para garantir a segurança, é recomendável procurar por profissionais confiáveis e qualificados para obter informações sobre a planta, assim como para ter acesso às melhores fontes e produtos com qualidade (GALVÃO et al., 2018). Além disso, é importante preservar os recursos medicinais ao incentivar práticas de conservação sustentável, buscando garantir que esses recursos sejam usados de maneira responsável e sejam disponíveis para as próximas gerações (UCHÔA et al., 2015).

Devido aos riscos envolvidos na comercialização popular de plantas medicinais, é

importante que todos os interessados adotem práticas responsáveis para garantir a segurança deles e de seus consumidores. O principal requisito, para isso é garantir que o produto seja verificado por profissionais qualificados e confiáveis para obter informações relevantes sobre a planta, bem como para ter acesso às melhores fontes e produtos com qualidade. Além disso, todos precisam trabalhar juntos para preservar os recursos medicinais através da implementação de práticas de conservação sustentável (BARBOSA et al., 2016).

Dessa forma, todos podem usufruir destes recursos por muitas gerações. Ao longo dos anos, os conhecimentos tradicionais dos povos indígenas sobre as propriedades e usos das plantas têm sido reconhecidos como uma fonte de informação extremamente valiosa. Esses conhecimentos, que foram acumulados durante séculos, fornecendo uma compreensão única sobre o uso sustentável dos recursos naturais (UCHÔA et al., 2015).

### 3.4.1 Naringenina

Estudos indicam que ela pode modular respostas inflamatórias agudas e crônicas, podendo ser usada para fins terapêuticos. O uso da naringenina também é comum na síntese de outros flavonoides, pois ela é a primeira a ser produzida quando uma molécula de 4-cumaroil-CoA reage com três moléculas de malonil-CoA por meio da enzima chalcona sintase (SOLAK et al., 2014). Com um peso molecular de 272,26 g/mol, ela é insolúvel na água, mas solúvel em solventes orgânicos como álcool. Além disso, a naringenina possui uma ampla gama de atividades biológicas e farmacológicas (SAHIN et al., 2017).

Da mesma forma, a naringenina (Figura3), possui atividade antioxidante, pois sequestra os radicais superóxido, ânion e hidroxila, além de proteger contra a peroxidação lipídica, graças ao aumento da expressão da SOD, GPx e CAT (HERNÁNDEZ-AQUINO et al., 2018).

**Figura 3** - Principais fontes de naringenina.



Fontes: pfaf.org; flickr.com; folha de Campo Largo; revistagloborural.globo.com; blog.rpccommerce.com.br; heavendelhaye.com.br; supermercadossantoantonio.com.br; citrusvariety.ucr.edu.

A naringenina, possui a capacidade de agir como pró-oxidante quando sofre oxidação catalisada pela peroxidase presente em sua estrutura. O uso terapêutico da naringenina tem sido dificultado devido às suas propriedades físicas indesejáveis que incluem estabilidade reduzida, baixo log P 2,4 e solubilidade reduzida em água. Para contornar esses problemas, vários estudos foram realizados para explorar alternativas tecnológicas, sendo a complexação com ciclodextrinas uma delas. Estes compostos possuem alta solubilidade em água, melhoram a estabilidade e biodisponibilidade do fármaco (RANAWAT et al., 2017).

O HPβCD (Hidroxipropil beta ciclodextrina , derivado quimicamente modificado da ciclodextrina, demonstrou ser extremamente eficaz na encapsulação de fármaco. No entanto, os processos utilizados para produzir esses complexos de inclusão apresentam desvantagens significativas, tais como baixos rendimentos, custos elevados e dificuldades no processo ampliado (GRANADOS et al.,2022).

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Local e condições experimentais**

As nanoformulações foram desenvolvidas e caracterizadas no Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos (LTMAC) da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília - Campus Universitário Darcy Ribeiro em Brasília, no Distrito Federal.

Uma amostra de 250 fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. Microplus* foram coletadas manualmente em vacas leiteiras da raça Zebuínas (CZT) da EMBRAPA Cerrados, na cidade de Recanto das Emas, no Distrito Federal. As amostras foram cuidadosamente acondicionadas em recipientes limpos e aerados para o transporte até o Laboratório de Tecnologia e Cosmética (LBTEC) da Universidade de Brasília (UnB), Campus Ceilândia (FCE). As amostras foram então mantidas em condições ideais, em uma câmara climática (Nova Ética série 420-CLDTS), com temperatura  $\pm 27^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa  $>80\%$ .

O teste de germinação, foi realizado com as sementes de alface *Lactuca sativa*, do lote 143574-010, safra 2020, descrição técnica com porcentagem de germinação de 84% da linha Alface Grandes Lagos Americana, com validade até 05/2023. Estas sementes foram adquiridas na Agro San Comércio e Representações Agrícolas, localizada na SCR N 714/715,

bl. A, lj. 18, Brasília, DF. O teste foi conduzido no Laboratório de Tecnologias e Cosmetologia (LABTEC) da Universidade de Brasília - Campus Ceilândia (FCE).

## **4.2 Reagentes**

As substâncias foram utilizadas e adquiridas na Sigma Parteck® MXP (álcool polivinílico, PVA, lote F1952064) foi doado pela Merck (Darmstadt, Alemanha), enquanto Plasdone® S-630 (polivinilpirrolidona-co-vinil-acetato, PVA, lote 002095174). Aldrich NAR (C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>, (2S)-5,7-di-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)-2,3-di-hidro-4H-cromen-4-ona, pureza ≥ 98%, lote MKCD1056) e HPβCD (grau de substituição: 0,9, lote BCBQ9423) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Todos os experimentos foram realizados com água ultrapura de grau Milli-Q® (Millipore, Illkirch Graffenstaden, França). O Eudragit® RS100 (Methacrylic Acid - Methyl Methacrylate Copolymer (1:1), lote: B160703010) foi obtido de Pharma Polymere, Alemanha. O polissorbato 80, foi adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha). Todos os outros produtos químicos e solventes eram de grau analítico.

## **4.3 Preparo das nanoformulações**

### **4.3.1 - Desenvolvimento do Nanossistema 1**

Para a produção de nanopartículas poliméricas da naringenina na fase aquosa, foram usados 0,5 g de PVA e 0,75 mL de água ultrapura (Millipore, Illkirch-Graffenstaden, França). O meio foi aquecido até 80°C até que a solução esteja completamente solubilizada. Para a fase orgânica, 0,5 g de Eudragit L-100, 0,75 g de naringenina e 25 mL de etanol foram adicionados a um béquer. A formulação foi agitada em uma placa magnética até se tornar completamente solúvel.

A fase orgânica, foi então adicionada à fase aquosa gota a gota de forma constante com o auxílio de uma bureta. A mistura foi agitada por 1 hora em uma placa agitadora. Finalmente, as nanopartículas foram transferidas para um balão de fundo redondo e submetidas ao rotaevaporador para eliminar 25 mL de etanol.

### **4.3.2 - Desenvolvimento do Nanossistema 2**

No balão de fundo redondo, colocou-se 0,5g de PVA e 0,75 mL de água ultrapura (Millipore, Illkirch-Graffenstaden, França), que foram aquecidos até 80°C por 60 minutos para solubilizar. Em seguida, adicionou-se 4,015 g de HPβCD, ajustando o volume para 0,75 mL de água ultrapura. Na fase orgânica, diluiu-se 0,5g de Eudragit L-100 (25 mL de etanol) e 0,75g

do fármaco.

A solubilização foi completa e a fase aquosa foi então acrescentada gota a gota com a velocidade mais constante possível usando uma bureta. O conteúdo foi agitado por 60 minutos na placa agitadora. Posteriormente, as nanopartículas de Naringenina HP $\beta$ CD foram adicionadas ao balão e 25 mL de etanol evaporados pela rotaevaporador.

### **4.3.3 - Desenvolvimento do Nanossistema 3**

Após ter escolhido o 50 mL de óleo de milho, 0,15g de fármaco e tensoativos/cotensoativos (Tween80 e Glicerina) resultando em proporção de (4/3/1) variando de 1/9 a 9/1 (ml/ml) foram preparadas em beckeres e um agitador magnético até a sua completa homogeneização. A fase aquosa utilizada no diagrama foi água ultrapura. Esta foi adicionado de 1 mL em 1 mL até que seu volume total fosse de 20 mL. Depois disso, a cada 10 mL até o volume total ser de 110 mL.

Posteriormente a cada adição, das misturas foram mantidas em repouso por 60 segundos e analisadas visualmente, sendo possível identificar a formação de nanoemulsão. As características esperadas consistiam na visualização de mistura brilhante, translúcida, monofásica e o efeito Tyndall. Portanto, a amostra foi selecionada com uma proporção (4/3/1/4).

## **4.4 Caracterização das nanoformulações**

A análise das nanoformulações (Nanossistema 1, Nanossistema 1 NAR, Nanossistema 2, Nanossistema 2 NAR, Nanossistema 3, Nanossistema 3 NAR). O controle positivo, foi representado por formulações com fármaco, enquanto o controle negativo foi representado por formulações sem o princípio ativo. O pH, o Potencial Zeta, o PDI e o tamanho da gotícula foram avaliados para a caracterização das formulações.

### **4.4.1 PDI e Tamanho da gotícula**

O diâmetro hidrodinâmico das gotículas e o Índice de polidispersividade foram determinados com a técnica de espalhamento de luz. Os resultados foram obtidos utilizando o aparelho Zetasizer Nano ZS (Malvern, EUA) sob um ângulo fixo de 90° e 25°C, a partir da diluição aquosa das nano formulações na relação de 980:20 (v/v).

#### 4.4.2 Potencial Zeta

O potencial zeta foram analisados e determinados pelo cálculo da mobilidade eletroforética das partículas. Os exames foram executados no equipamento dispositivo Zetasizer Nano ZS (Malvern, EUA) com uma diluição aquosa das nano formulações, na proporção 980:20 (v/v).

#### 4.4.3 Mensuração do pH

A concentração de pH presentes nas nanoformulações, foi medida através da inserção direta de eletrodos apropriados conectados a um potenciômetro digital (Digimed, modelo DM-22) em temperatura de 25°C.

### 4.5 Avaliação Acaricida

#### 4.5.1 Teste de imersão de adultos (TIA)

Uma coleta manual de 250 fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. Microplus* foi realizada em vacas leiteiras da raça zebuínas (CZT) da EMBRAPA Cerrados, na cidade de Recanto das Emas, no Distrito Federal. Estes animais não tinham recebido nenhum tratamento parasítico nos últimos 30 dias. As amostras foram acondicionadas em recipientes limpos e aerados para serem transportadas até o Laboratório de Tecnologia da Universidade de Brasília (UnB), Campus Ceilândia (FCE).

De acordo com Drumond et al. (1973), as amostras foram lavadas em água corrente, limpa e secas com papel absorvente antes de serem separadas em grupos homogêneos de 10 teleóginas cada, utilizando apenas 240 teleóginas. O teste foi realizado em triplicata (Figura 4), com repetições o mais homogêneas possível, consideração o peso das teleóginas.

**Figura 4-** Teleóginas separadas em grupos homogêneos em triplicata.



Fonte: Próprio autor, 2023.

Foi realizado um teste de imersão de adultos (TIA) para avaliar a eficácia das nano

formulações com Naringenina e da solução comercial Triatox (Amitraz) no controle de carrapatos como controle positivo na concentração indicada pelo fabricante. Para tal, amostras contendo (Nanossistema 1, Nanossistema 1 NAR, Nanossistema 2, Nanossistema 2 NAR, Nanossistema 3, Nanossistema 3 NAR) e água ultra-pura foram submetidas a um grupo controle negativo.

Nesse sentido, 200 mL das amostras foram submersas durante 10 minutos em triplicata. Após a imersão, o excesso de líquido foi removido e as teleóginas foram acondicionadas em placas de Petri e identificadas. Elas foram mantidas em uma câmara climática (Nova Ética série 420-CLDTS), com temperatura  $\pm 27^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa  $>80\%$ , sendo essas condições ideais para o cultivo dos carrapatos.

A fase de oviposição foi concluída com a transferência das massas dos ovos para um tubo de ensaio vedado com algodão ("plugue de algodão"). Estas massas foram mantidas nas mesmas condições descritas por mais 45 dias. A partir daí, os parâmetros (peso da massa de ovos, peso das fêmeas ingurgitadas e taxa de eclodibilidade) são analisados, com o intuito de calcular a "Eficiência Acaricida" (EA) de acordo com Drummond et al. (1973). Um produto acaricida é considerado eficiente quando a EA é igual ou maior que 95%.

**ER** – Eficiência Reprodutiva;

**PMO** – Peso da massa de ovos;

**PFI** – Peso da fêmea ingurgitada;

**Eclo** – Eclodibilidade;

**ER= (PMO/PFI) x %Eclo X 20.000\***

\*Um grama de ovos de *R. microplus* corresponde a 20.000 larvas.

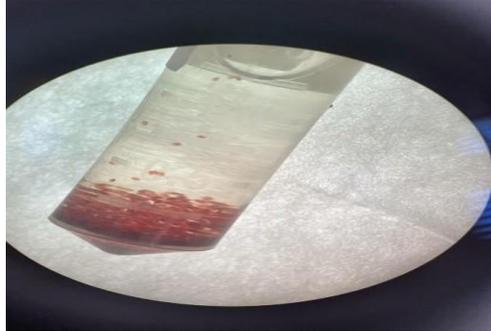
#### **4.5.2 Teste de imersão larval (TIL)**

No Laboratório de Tecnologias (LABTEC) da Universidade de Brasília - Campus Ceilândia (FCE), foi realizado um teste em triplicata para avaliar a eficácia de nanoformulações. Foi usado como grupo, amostras (Nanossistema 1, Nanossistema 2, Nanossistema 3) e água ultra-pura foram submetidas a um grupo controle negativo e um produto comercial Triatox (Amitraz) como controle positivo.

As teleóginas foram colocadas em placas de Petri e mantidas em uma câmara climática da marca Nova Ética (série 420-CLDTS) por 18 dias, a 80% de UR (umidade relativa) e  $27^{\circ}\text{C} \pm 1$  para a obtenção de posturas. Após esse período (Figura 5), alíquotas de 0,25 gramas de ovos foram pesadas e guardadas em tubos Eppendorf de 2 mL, com um furo na

parte superior para passagem de ar e para permitir a injeção dos tratamentos.

**Figura 5-** Eppendorf com ovos de teleóginas.



Fonte: Próprio autor, 2023.

Após 45 dias, as larvas nasceram. Com 48 dias, 1 mL das nano formulações foram adicionadas a cerca de 500 larvas (0,025 gramas de ovos) em eppendorfs, e o tubo foi agitado no Vortex Motion III LSM56-III por 60 segundos. Em seguida, colocou-se o tubo em um agitador magnético modelo SP-10206/A - SPLABOR por 10 minutos, com uma velocidade de 200 rpm. Depois disso, as larvas foram transferidas para envelopes de papel filtro e mantidas em uma câmara climática com 80% de URA e  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ . Após 24 horas, abriram-se os envelopes e iniciou-se a contagem das larvas vivas e mortas.

**Figura 6-** Eficácia dos produtos em lavas mortas.



Fonte: Próprio autor, 2023.

De acordo com Drummond et al. (1973), a atividade carrapaticida das nanoformulações e seus controles foram expressos através da concentração letal média (LC50) calculada para cada uma das formulações testadas em relação às larvas dos carrapatos. Além disso, houve uma regressão linear entre as médias de inibição encontradas com cada formulação e as concentrações desta 1% dos exemplares de carrapatos (LC1) e para 99,9%

das amostras (LC 99,9).

#### 4.6 Teste de germinação

No Laboratório de Tecnologia da Universidade de Brasília (UnB), Campus Ceilândia, Distrito Federal, foi realizado um teste de germinação com a alface (*Lactuca sativa*). Utilizaram-se como tratamentos: Nanossistema 1, Nanossistema 1 NAR, Nanossistema 2, Nanossistema 2 NAR, Nanossistema 3, Nanossistema 3 NAR e Controle Positivo Água Ultrapura (Figura 7). Foram selecionadas 960 sementes, distribuídas em placas de Petri contendo 30 sementes por repetição.

**Figura 7-** Teste de germinação da alface (*Lactuca sativa*)



Fonte: Próprio autor, 2023.

As sementes foram embebidas com 8 mL de cada formulação e colocadas sobre duas folhas de papel germi teste autoclavadas. As placas de Petri foram seladas com filme plástico e colocadas dentro da câmara de clima produzida pela Nova Ética (modelo 420-CLDTS) a 20°C, em um fotoperíodo de 8 horas de luz e 16 horas de escuridão durante sete dias, seguindo os padrões da RAS (BRASIL, 2009). Após essa semana, foi realizada a contagem final de sementes e avaliado o número de sementes germinadas (SG), sementes não germinadas (SNG) e índice de Velocidade de Germinação (IVG).

Segundo Maguire (1962), o índice de Velocidade de Germinação é determinado pela soma entre o número de sementes germinadas a cada dia no período de avaliação.

$$IVG = G1/N1 + G2/N2 + \dots + Gn/Nn.$$

Em que: G1, G2 ..., Gn = número de sementes germinadas no dia da observação. N1,

N2 ..., Nn = número de dias após a semeadura.

Os resultados foram submetidos à porcentagem e tamanho de cada grupo sendo expressos em tabelas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Análise do Índice de polidispersividade (PDI) e Tamanho da gotícula

**Tabela 1 .** Caracterização das nano formulações contendo (Nanossistema 1, Nanossistema 1 NAR, Nanossistema 2, Nanossistema 2 NAR, Nanossistema 3, Nanossistema 3 NAR), quantoao PDI, índice de polidispersão e o diâmetro da gotícula (nm).

Nanoformulação	PDI	Diâmetro da gotícula (nm)
<b>Nanossistema 1</b>	0,104±0,04	445,2±5,1
<b>Nanossistema 1 NAR</b>	0,186±0,05	467,4±22,2
<b>Nanossistema 2</b>	0,246±0,87	659,3±21,9
<b>Nanossistema 2 NAR</b>	0,280±0,05	687,9±6,7
<b>Nanossistema 3</b>	0,080±0,43	89,25±1,95
<b>Nanossistema 3 NAR</b>	0,090±0,47	98,36±1,74

Fonte: Próprio autor, 2023.

Na Tabela 1, é possível observar a variação do tamanho da gotícula e do PDI das nanoformulações após a adição de diferentes componentes. O tamanho médio dos Nanossistema 1 NAR, Nanossistema 2 NAR, Nanossistema 3 NAR aumentou estatisticamente em relação aos valores das outras amostras quando adicionado em maior proporção quando foi adicionado o fármaco, dando um resultado diferente do nanossistema sem fármaco.

Dessa forma, é possível afirmar que os resultados obtidos são condizentes com o esperado, pois com a adição de outros componentes à formulação, há a possibilidade de ocorrer remanejamentos ou alterações na estrutura das nanopartículas, o que pode repercutir na variação do diâmetro das partículas. Além disso, a presença de fármacos e bioativos na formulação pode ter influência significativa na síntese das nanopartículas, mudando radicalmente seu tamanho e sua característica superficial (ALI et al., 2017).

Dessa maneira, a adição de componentes específicos à formulação pode ter um impacto significativo e direto na síntese do diâmetro das formulações, proporcionando resultados consistentes com o esperado, o que pode servir para melhorar as características das

formulações. Por exemplo, a incorporação de substâncias adicionais pré-determinadas pode influenciar o tamanho das partículas, aumentando o diâmetro das formulações, resultando em um processo de síntese mais eficiente e eficaz.

Uma nanoemulsão com seu tamanho médio de gotícula entre 10-100 nm exibirá diversas características desejadas. Além da melhora na estabilidade, a diminuição da ocorrência de coalescência, possibilita também um aumento considerável do poder de penetração dos fármacos incorporados (LALU et al., 2017). Esta característica, somada ao ideal tamanho da gotícula, torna-se uma das principais qualidades deste tipo de nanoformulação. Além disso, há ainda a redução de impacto na saúde, pois a absorção e biodisponibilidade dos fármacos melhora consideravelmente (KUMAR et al., 2017).

## 5.2 Potencial Zeta

O Potencial Zeta (Tabela 2), indica a concentração de carga em torno das nanogotículas e oferece dados sobre o nível de repulsão entre elas. Desse modo, quanto maior o seu Potencial Zeta, seja negativo ou positivo, mais elevada deve ser a resistência física da formulação, pois há prevenção de aglomeração e a união das nanogotículas da formulação podendo ser empregada para melhorar a formulação de dispersões, emulsões e suspensões (TOLETINO et al., 2020).

**Tabela 2.** Resultado da avaliação do Potencial Zeta (mV) das nano formulações contendo Nanossistema 1 ; Nanossistema 1 NAR, Nanossistema 2, Nanossistema 2 NAR, Nanossistema 3, Nanossistema 3 NAR.

<b>Amostra</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>
<b>Nanossistema 1</b>	0,287±0,17
<b>Nanossistema 1 NAR</b>	0,349±0,01
<b>Nanossistema 2</b>	-0,364±0,14
<b>Nanossistema 2 NAR</b>	-0,613±0,23
<b>Nanossistema 3</b>	1,113±0,11
<b>Nanossistema 3 NAR</b>	1,350±0,07

Fonte: Próprio autor, 2023.

## 5.3 Mensuração do pH

Nanoformulações contendo o fármaco foram testadas, resultando em valores de pH ácido, variando entre  $5,10 \pm 6,20$  (Tabela 3). Esta faixa de pH é ideal para a aplicação de

carrapaticidas, pois consegue oferecer uma duração maior de exposição ao ácaro, já que o valor ideal para carrapaticidas é de até 7 em solução.

**Tabela 3.** Avaliação do pH das nano formulações contendo Nanossistema 1; Nanossistema 1 NAR, Nanossistema 2, Nanossistema 2 NAR, Nanossistema 3, Nanossistema 3 NAR.

<b>Nanoformulação</b>	<b>pH</b>
<b>Nanossistema 1</b>	5,10±0,10
<b>Nanossistema 1 NAR</b>	5,14±0,13
<b>Nanossistema 2</b>	5,30±0,25
<b>Nanossistema 2 NAR</b>	5,68±0,28
<b>Nanossistema 3</b>	6,01±0,15
<b>Nanossistema 3 NAR</b>	6,20±0,18

Fonte: Próprio autor, 2023.

De acordo com Porto (2015) uma pesquisa realizada com os carrapatos *Boophilus microplus* foi capaz de ancorar e liberar carrapaticida gradualmente em áreas com pH entre 5 e 6. Isto foi fundamental para o tratamento de bovinos expostos ao ácaro, pois aumentou a duração da exposição entre o ácaro e o carrapaticida (DE BARBOSA, 2015). Além disso, a determinação e o controle do pH na pele têm uma extrema utilidade prática, pois é comum o contato com produtos agressivos, como detergentes, e até mesmo para prevenir a aplicação de produtos tópicos inadequados.

O pH é um fator importante para a monitorização da estabilidade das formulações. Quando há alterações no seu valor, isso pode indicar a ocorrência de reações químicas indesejáveis e/ou crescimento de bactérias, o que, por sua vez, compromete a qualidade do produto final. Diante disso, é importante, que se faça o monitoramento frequente do pH para manter o controle qualitativo da emulsão durante o processo industrial (ALI et al., 2017).

#### **5.4 Teste de imersão de adultos (TIA)**

Os testes *in vitro* de TIA (Tabela 4) e TIL (Tabela 5) são eficazes, rápidos e acessíveis, podendo ser empregados como projetos de administração em estados brasileiros com ampla produção de bovinos e elevada carga parasitária nos animais, para que o monitoramento seja

feito por profissional qualificado e não por proprietários de modo aleatório.

**Tabela 4** - Média e desvio padrão de eficiência carrapaticidas por grupo Controle negativo/água\*, controle positivo/Triatox\*\*, Nanossistema 1, Nanossistema 1 NAR, Nanossistema 2, Nanossistema 2 NAR, Nanossistema 3, Nanossistema 3 NAR, em teste *in vitro* com teleóginas de *R. microplus* procedentes de bovinos criados na Embrapa- Recanto das Emas -DF.

Amostras	MF(%)	PIF	% MO	Eclosão (%)	ER%	Água* % EP	Triatox** %EP
Controle/ água*	10	4,048	0,237	100	117094,86	---	---
Controle/Triatox**	13,3	4,570	0,172	100	99781,18	35,71	---
Nanossistema 1	10	5,440	0,251	100	92279,41	21,19	7,51
Nanossistema 1 NAR	33,33		0,202	100	76255,19	93,46	23,57
		5,298					
Nanossistema 2	20	5,845	0,112	100	38323,35	67,27	61,59
Nanossistema 2 NAR	33,33		0,142	30	19090,29	83,69	80,69
		4,463					
Nanossistema 3	30	4,025	0,103	100	51180,12	56,29	48,70
Nanossistema 3 NAR	100			0,00	--	100	100
		5,556	0,00				

As formulações são: Controle negativo/água\*, controle positivo/Triatox\*\*, Nanossistema 1, Nanossistema 1 NAR, Nanossistema 2, Nanossistema 2 NAR, Nanossistema 3, Nanossistema 3 NAR.

\* Cálculo baseado no controle-negativo, \*\* Cálculo baseado no controle positivo;

#### Fórmulas matemáticas de acordo com Drummond et al. (1971/1973).

MF= Massa de ovos das

teleóginas PIF= Peso inicial das

teleóginas MO= Massa de ovos

ER = Peso da massa dos ovos X % Eclosão X 20.000\*/ Peso das

Fêmeas ER = Eficiência Reprodutiva

\* = Número de larvas por 1 grama de ovos.

EP =  $\frac{ER \text{ Controle} - ER \text{ Produto} \times 100\%}{ER \text{ Controle}}$

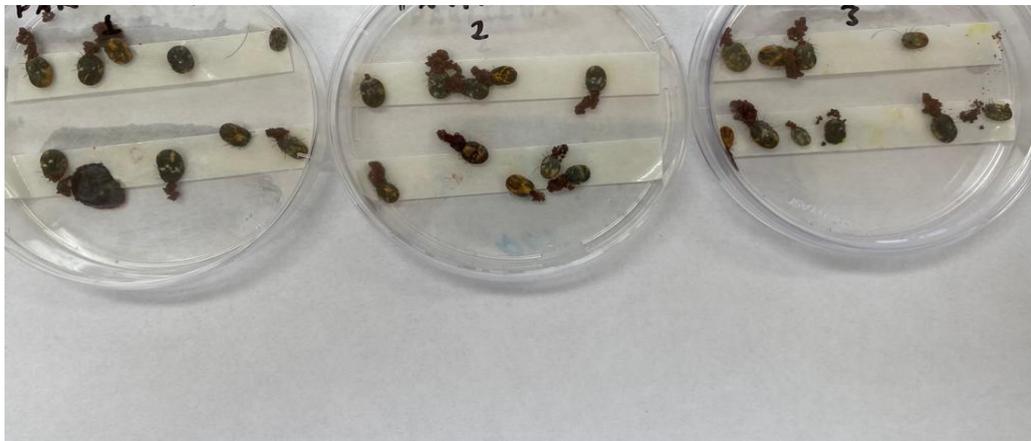
Controle

EP = Eficiência do Produto

Segundo a Tabela 4, o controle negativo (água destilada) não causou nenhum dano às teleóginas de *R. microplus*. O controle positivo Triatox (Amitraz), mostraram melhor eficácia nas nanoformulações de Naringenina que continham princípio ativo. Neste grupo, as Nanossistema 1 NAR, Nanossistema 2 NAR, Nanossistema 3 NAR foram as mais eficazes.

A análise da eclosão das massas de ovos (Figura 8) revelou que a Nanossistema 3 NAR foi a mais eficaz. Foram encontrados 30% de eclosão na Nanossistema 2 NAR, enquanto a Nanossistema 1 NAR apresentou 100%. A Nanossistema 3 NAR, não apresentaram eclosão. O teste indicou que a Nanossistema 3 NAR foi 100% eficaz no âmbito da eclosão e da eficiência reprodutiva, como no controle positivo e no controle negativo da massa de ovos. Estas descobertas sugerem que as nanoformulações podem ser uma ótima opção para o controle do *R. microplus*, e estimulam a realização de mais estudos para avaliar a sua eficiência em outros ácaros.

**Figura 8-** Teste de imersão de adultos em triplicata com eclosão das teleoginas



Fonte: Próprio autor, 2023.

A nanotecnologia oferece possibilidades para o refinamento da resistência físico-química de agentes constituintes, tais como nanocarreadores, que podem aumentar a biodisponibilidade destes, promovendo uma liberação menos acelerada e direcionada, e assegurando-lhes segurança contra a decomposição precoce. Tais ferramentas também podem reforçar os processos de absorção/propagação tecidual e reduzir possíveis efeitos deletérios, tornando-se um potencial apoio para intervir no combate a pragas agrícolas e irritações veterinárias. Dado que associações de diferentes classes de compostos químicos produzem geralmente resultados mais eficazes do que aqueles alcançados por formulações (Figura 9) em um único princípio ativo (VINTURELLE et al., 2021).

**Figura 9-** Eficiência do produto teleóginas de *R. microplus*.



Fonte: Próprio autor, 2023.

### 5.5 Teste de Imersão Larval

A análise da eficácia de um possível inseticida frente às larvas é de primeira grandeza. A partir de 1975, a FAO aconselha o emprego do teste de imersão larval, para o exame da resistência a carrapaticidas. Diante desse contexto (Tabela 5), foi realizado o teste de imersão larval com nanoformulações contendo naringenina.

**Tabela 5** - Os resultados do teste de imersão larval por grupo Controle negativo/ água\*; controle positivo/Triatox\*\*, Nanossistema 1, Nanossistema 1 NAR, Nanossistema 2, Nanossistema 2 NAR, Nanossistema 3, Nanossistema 3 NAR, em teste *in vitro* com larvas de *R. Microplus*, fornecendo informações sobre as médias e os desvio padrão.

Amostras	Réplica 1F	Réplica 2	Réplica 3
Controle/ água*	0	0	0
Controle/Triatox**	0	50	52
Nanossistema 1	0	0	0
Nanossistema 1 NAR	89	99	100
Nanossistema 2	56	65	72
Nanossistema 2 NAR	93	94	95
Nanossistema 3	0	0	0
Nanossistema 3 NAR	78	82	96

Fonte: Próprio autor, 2023.

A Tabela 5, revelou que o controle negativo, ou seja, água destilada, não apresentou efeito deletério sobre as larvas de *R. microplus*. Por outro lado, o controle positivo, Triatox (Amitraz), resultou em 100% de mortalidade das larvas, atendendo aos parâmetros estabelecidos pela FAO (95%). Esses resultados evidenciam que a formulação de nanomaterial contendo o princípio ativo Naringenina foi eficaz. A nanoformulação de Nanossistema 2 NAR\*, foi responsável pela mortalidade de 95% das larvas, enquanto a Nanossistema 3 NAR\*, atingiu 100% de mortalidade. Já a formulação de Nanossistema 1 NAR\*, resultou em 96% de mortalidade. Assim, os resultados do teste de imersão larval mostraram que ambas as nanofórmulações foram eficazes para o princípio ativo.

Assim, pode-se afirmar que as formulações eficazes, tem uma grande importância para o aumento da permeação do princípio ativo, pois elas permitem a deposição de substâncias na cutícula da pele, gerando um efeito oclusivo que impede as trocas gasosas. Desta forma, é possível aproveitar a quantidade maior de fármaco já existente na pele, contribuindo assim para

a eficácia do produto.

A naringenina, é facilmente absorvida pelo organismo e, por isso, apresenta uma boa biodisponibilidade. A quantidade deste composto químico varia conforme o tipo de família, gênero e da espécie da planta, e pode ainda ser encontrado em diferentes quantidades dependendo do órgão vegetal (Machado et al.,2008).

Após a análise dos resultados obtidos no teste TIL e TIA, foi possível constatar que as nano formulações produzidas por meio de diferentes polímeros e tensoativos apresentam ações farmacológicas promissoras. No entanto, fatores físicos-químicos ainda necessitam de estudos mais aprofundados.

### **5.6 Teste de germinação da alface**

**Tabela 5** - Teste de germinação da alface das nano formulações contendo Nanossistema 1, Nanossistema 1 NAR, Nanossistema 2, Nanossistema 2 NAR, Nanossistema 3, Nanossistema 3 NAR e Controle negativo água em alface *Lactuca sativa*. Brasília- Df (Reencanto das Emas).

Amostras	Quarto dia		Sétimo dia	
	Crescimento %	Plântula -mm	Crescimento %	Plântula-mm
<b>Controle/ água*</b>	<b>40%</b>	<b>1,28 mm ± 2,73 mm</b>	<b>86%</b>	<b>3,65mm± 14,63mm</b>
<b>Nanossistema 1</b>	<b>69%</b>	<b>2,73mm ± 4,99mm</b>	<b>73%</b>	<b>5,04 mm±13,83mm</b>
<b>Nanossistema 1 NAR</b>	<b>72,5%</b>	<b>3,40mm ± 6,56mm</b>	<b>76%</b>	<b>5,81mm±11,21m m</b>
<b>Nanossistema 2</b>	<b>67%</b>	<b>2,30mm ± 4,86mm</b>	<b>75%</b>	<b>5,04 mm±11,89mm</b>
<b>Nanossistema 2 NAR</b>	<b>70%</b>	<b>2,80mm ± 5,32mm</b>	<b>78%</b>	<b>5,04 mm±13,53mm</b>
<b>Nanossistema 3</b>	<b>28%</b>	<b>1,06mm±1,42mm</b>	<b>65%</b>	<b>1,18mm±2,56m m</b>
<b>Nanossistema 3 NAR</b>	<b>31%</b>	<b>1,53mm ±3,16mm</b>	<b>68%</b>	<b>3,21mm±11,52m m</b>

Fonte: Próprio autor, 2023

De acordo com as exigências estabelecidas na Instrução Normativa n.º 42 de 2019, do Ministério da Agricultura (Brasil, 2016), as sementes de alface da espécie *Lactuca sativa L.*, pertencentes à categoria C1, devem mostrar um índice de Germinação (IG) mínimo de 70% para sementes básicas e 80% para sementes certificadas de primeira e segunda geração (C1 e C2) e sementes das classes não certificadas (S1 e S2). É importante que os produtores e consumidores cumpram essa normativa a fim de colher os benefícios dessa variedade de semente. É crucial que todas as partes envolvidas na produção e comercialização dessas sementes sigam rigorosamente as regras para garantir que os padrões de qualidade sejam cumpridos adequadamente.

Nesses testes, como esperado a Nanossistema 3 NAR mostrou um crescimento de

68%, enquanto a Nanossistema 3 sem naringenina alcançou 65% quando expostas às condições de temperatura e umidade relativa específicas, segundo o método de Maguire (1962). Logo, os resultados obtidos foram muito satisfatórios, demonstrando que a nanoformulação Nanossistema 1 e Nanossistema 2 com e sem fármaco pode ser extremamente eficaz para aumentar a germinação de sementes e conseguir um maior aproveitamento das mesmas.

Ao analisar os resultados das outras composições, pode-se ver que a % verificada nos testes de germinação foi muito elevada, ultrapassando os 70% exigidos pela Instrução Normativa n.º 42 de 2019. Portanto, eles superaram as expectativas e mostraram que a aplicação de nano formulações Nanossistema 1 NAR e Nanossistema 2 NAR (Figura 10), pode ser uma excelente alternativa para melhorar a germinação das sementes assim como a água como controle negativo.

**Figura 10** -Teste de germinação da alfaca.



Fonte: Próprio autor, 2023.

## 6 CONCLUSÃO

O desenvolvimento de nanossistemas contendo Naringenina como alternativa foi eficaz para o controle de carrapatos na pecuária e ácaros na agricultura. Após os testes realizados para avaliar a atividade acaricida do teste TIL e TIA, os nanossistemas mostrou-se eficaz na morte das teleóginas e das larvas do *Rhipicephalus microplus* (carrapato bovino).

No que se refere à germinação de alface (*Lactuca sativa*), vale destacar que todos os nanossistemas contendo fármaco não inibiram o crescimento das sementes. Entretanto, os Nanossistemas 1 NAR e 2 NAR estimularam o crescimento das sementes, tornando-se eficazes e estando conformes as exigências estabelecidas na Instrução Normativa n.º 42/2019 do Ministério da Agricultura.

Diante disso, pode-se concluir que todos os parâmetros utilizados apresentaram características satisfatórias para a produção de nanossistemas. No entanto, destaca-se o Nanossistema 3 NAR por apresentar uma metodologia de produção de menor custo. Desenvolvido por meio da técnica de microemulsificação, esse nanossistema permite a obtenção de nanogotas de naringenina com propriedades físico-químicas e biológicas eficazes.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, R. Z.; ZAMAN, M. A.; COLWELL, D. D.; GILLEARD, J.; IQBAL, Z. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. **Veterinary Parasitology**, v. 203, n. 1-2, p. 6-20, 2014.
- ABOELHADID SM, ARAFA WM, MAHROUS LN, FAHMY MM, KAMEL AA Detecção molecular da resistência de *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* contra deltametrina no Egito médio. **Veterinario. Parasitol. Reg. Viga. Rep.** 2018;13:198–204. doi: 10.1016/j.vprsr.2018.06.008. - DOI – PubMed
- ADENUBI, O. T. et al. Pesticidal plants as a possible alternative to synthetic acaricides in tick control: a systematic review and meta-analysis. **Industrial Crops and Products**, v. 123, p. 779-806, 2018. DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.06.075.
- ALI, A. et al. Nanoemulsion: An Advanced Vehicle for Efficient Drug Delivery. **Drug Research**, v. 67, n. 11, p. 617–631, 2017.
- ANUALPEC, 2013. **Anuário da Pecuária Brasileira**. São Paulo: Informa Economics FNP, 2013.
- BARBOSA, HM; NASCIMENTO, JN; ARAÚJO, TAS; DUARTE, FS; ALBUQUERQUE, UP; VIEIRA, JRC; SANTANA, ERBDE; YARA, R.; LIMA, CSA; GOMES, DA Toxicidade aguda e efeito citotóxico do extrato etanólico da casca de *Spondias tuberosa* arruda: Avaliação hematológica, bioquímica e histopatológica. **Um. Acad. Bras. Ciênc.** 2016 , 88 , 1993–2004.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Determinações adicionais – número de sementes sem casca e número de sementes com casca. In: Regras para análise de sementes. **Brasília: SNAD/ DNDV/CLAV**, 1992. cap.8, item 8.4 e 8.5, p.195.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Teste de sanidade de sementes. In: Regras para análise de sementes. **Brasília: SNAD/DNDV/CLAV**, 1992. cap.9, p.203-212.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS**, 2009. 399 p.
- BROGLIO-MICHELETTI, SÔNIA MARIA FORTI et al. Extratos de plantas no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) em laboratório. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* [online]. 2009, v. 18, n. 4 [Acessado 1 Junho 2023], pp. 44-48. Disponível em: <https://doi.org/10.4322/rbpv.01804008>. Epub 12 Abr 2012. ISSN 1984-2961. <https://doi.org/10.4322/rbpv.01804008>.
- CARDOSO, O.C; FERREIRA-NUNES, C.R.; CUNHA-FILHO, M.; GRATIERI, T.; GELFUSO, G.M. In situ gelling microemulsion for topical ocular delivery of moxifloxacin and betamethasone. **J. Mol. Liq.** 2022, 360, 119559.
- DOS SANTOS CARDOSO, Alana et al. Terpenos em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Atividade acaricida e inibição da acetilcolinesterase. **Parasitologia veterinária** , v. 280, p. 109090, 2020.
- DRUMMOND, R. O.; ERNST, S. E.; TREVINO, J. L.; GLADNEY, W. J.; GRAHAM, O. H.

*Boophilus annulatus* and *B. microplus*: **Laboratory tests of insecticides**. **Journal of Economic Entomology**, v. 66, n. 1, p. 130-133, 1973.

FAO. Resistance Management and Integrated Parasite Control in Ruminants – Guidelines, Module 1 – **Ticks: Acaricide Resistance: Diagnosis, Management and Prevention**. **Food and Agriculture Organization, Animal Production and Health Division, Rome**, p. 25–77, 2004.

GALVÃO, WA; BRAZ FILHO, R.; CANUTO, KM; RIBEIRO, PRV; CAMPOS, AR; MOREIRA, ACOM; SILVA, SO; MESQUITA FILHO, FA; SANTOS, SAAR; JÚNIOR, JM; e outros Atividade gastroprotetora e anti-inflamatória integradas à composição química de *Myracrodruon urundeuva* Allemão-Uma proposta conservacionista para a espécie. **J. Ethnopharmacol.** 2018 , 222 , 177–189.

GRISI L., MASSARD C. L., MOYA BORJA G.E. & PEREIRA J.B. 2002. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, v.21, n.125, p.8-10.

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. D. S.; BARROS, A. T. M. D.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H. D.; LEÓN, A. A. P. D.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, 2014. 150-156 p.

GUGLIELMONE, A. A.; NAVA, S. Divergent environmental preferences and areas of sympatry of tick species in the *Amblyomma cajennense* complex (Ixodidae). **International Journal Parasitology**. v. 44, n. 14, Set. 2014. 1081-1809 p.

HERNÁNDEZ-AQUINO E, MURIEL P. Beneficial effects of naringenin in liver diseases: Molecular mechanisms. **World J Gastroenterol**. 2018 Apr 28;24(16):1679-1707. doi: 10.3748/wjg.v24.i16.1679. PMID: 29713125; PMCID: PMC5922990.

ISTA – INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. Seed Health Testing. In: International rules for seed testing. ed.2008. **Bassersdorf**, 2008. cap.7, p.7.1-7.4.

ISTA – INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. Testing seeds by weighed replicates. In: International rules for seed testing. ed.2008. **Bassersdorf**, 2008. cap.13, p.13.1-13.4.

KRAWCZAK, F. S.; BINDER, L. C.; OLIVEIRA, C. S.; COSTA, F. B.; MORAES-FILHO, J.; MARTINS, T. F.; SPONCHIADO, J.; MELO, G. L.; GREGORI, F.; POLO, G.; OLIVEIRA, S. V.; LABRUNA, M. B. Ecology of a tick-borne spotted fever in southern Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 70, n. 2, 2016b. 219-229 p.

KUMAR, M. et al. Techniques for formulation of nanoemulsion drug delivery system: A review. **Preventive Nutrition and Food Science**, v. 24, n. 3, p. 225–234, 2019.

KUMAR, R. et al. Ultrasound processed nanoemulsion: A comparative approach between resver- atrol and resveratrol cyclodextrin inclusion complex to study its binding inter- actions, antioxidant activity and UV light stability. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 37, p. 478–489, 2017.

LALU, L. et al. Novel nanosystems for the treatment of ocular inflammation: Current paradigms and future research directions. **Journal of Controlled Release**, v. 268, p. 19–39, 2017.

LASANO, NF; HAMID, AH; KARIM, R.; DEK, MSP; SHUKRI, R.; SHAZINI RAMLI, N. Composição nutricional, propriedades antidiabéticas e identificação de compostos ativos usando UHPLC-ESI-orbitrap-MS/MS em casca e semente de *Mangifera odorata* L. **Molecules** 2019 , 24 , 320.

LEAL, B. F.; ALZUGARAY, M. F.; SEIXAS, A.; VAZ, I. D. S.; FERREIRA, C. A. S. Characterization of a glycine-rich protein from *Rhipicephalus microplus*: tissue expression, gene silencing and immune recognition. **Parasitology**, 2017. 1-12 p.

LUZ, H. R.; MCINTOSH, D.; FURUSAWA, G. P.; FLAUSINO, W.; ROZENTAL, T.; LEMOS, E. R.; LANDULFO, G. A.; FACCINI, J. L. H. Infection of *Amblyomma ovale* with *Rickettsia* species Atlantic rainforest in Serra do Mar, São Paulo State, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 6, 2016. 1265-1267 p.

MARTINS,C.C.; CALDAS,I.G.R.; MACHADO,C.G.; VIEIRA, I.G. Vermiculita como substrato para o teste de germinação de sementes de barbatimão. **Ciência Florestal (UFMS. Impresso)**, v. 21, p. 419-424, 2011.

MARUYAMA S. R.; GARCIA, G. R.; TEIXEIRA, F. R.; BRANDÃO, L. G.; ANDERSON, J. M.; RIBEIRO, J. M. C.; VALENZUELA, J. G.; HORACKOVA, J.; VERÍSSIMO, C. J.; KATIKI, L. M.; BANIN, T. M.; ZANGIROLAMO, A. F.; GARDINASSI, L. G.; FERREIRA, B. R.; DE MIRANDA-SANTOS, I. K. F. Mining a differential sialotranscriptome of *Rhipicephalus microplus* guides antigen discovery to formulate a vaccine that reduces tickinfestations. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, 2017. 206 p.

MASCARIN, G. M. et al. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 165, p. 46-53, 2019. DOI: 10.1016/j.jip.2018.01.001

MATO MOFO EP, ESSOP MF, OWIRA PMO. Citrus fruit-derived flavonoid naringenin and the expression of hepatic organic cation transporter 1 protein in diabetic rats treated with metformin. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**. 2020 Sep;127(3):211-220. doi: 10.1111/bcpt.13407. Epub 2020 Apr 3. PMID: 32180335.

MURRELL, A.; BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: *Ixodidae*). **Systematic Parasitology**, v. 56, n. 1, 2003. 169-172 p.

NAVA, S.; BEATI, L.; LABRUNA, M. B.; CÁCERES, A. G.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* (Ixodidae: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 3, 2014. 252-276 p.

OLIVEIRA, M.C.S.; GIGLIOTI, R. FORIM, M.R.; CALURA, F. H.; OLIVEIRA, H.N.; CHAGAS, A. C. S.; BRITO, L.G. Uso de extratos de Nim (*Azadirachta indica*) no controle do carrapato *Rhipicephalus* **Rev. Ciên. Vet. Saúde Públ.**, v. 3, n. 1, p. 014-022,

2016.

PATEL, N. et al. Development of loteprednol etabonate-loaded cationic nanoemulsified in-situ ophthalmic gel for sustained delivery and enhanced ocular bioavailability. **Drug Delivery**, v. 23, n. 9, p. 3712–3723, 2016.

PATEL, N. et al. Development of loteprednol etabonate-loaded cationic nanoemulsified in-situ ophthalmic gel for sustained delivery and enhanced ocular bioavailability. **Drug Delivery**, v. 23, n. 9, p. 3712–3723, 2016.

PEDRO A. GRANADOS, et al, Application of hot-melt extrusion in the complexation of naringenin with cyclodextrin using hydrophilic polymers, **Advanced Powder Technology**, PEDRO A. GRANADOS, LUDMILA A.G. PINHO, LIVIA L. SA-BARRETO, TAIS GRATIERI, GUILHERME M. GELFUSO, MARCILIO CUNHA-FILHO, Application of hot-melt extrusion in the complexation of naringenin with cyclodextrin using hydrophilic polymers, **Advanced Powder Technology**, Volume 33, Issue 1, 2022, <https://doi.org/10.1016/j.appt.2021.11.032>.

PEREIRA, M. C.; LABRUNA, M. B. ; SZABO, M. P. J.; KLAFKE, G. M. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Biologia, controle e resistência. 1ed. São Paulo: **MedVet Livros**, 2008. v.1. 169p.

PÉREZ DE LEÓN A A, MITCHELL RD, 3º, Watson DW Ectoparasitas do gado. Veterinario. Clin. N. Am. **Comida Anim. Praticar**. 2020;36:173–185. doi: 10.1016/j.cvfa.2019.12.004. - DOI – PubMe

PIRES, A. V; Piracicaba: FEALQ, 2010 v. II, (761-1510) p. Por Leonardo Massolli Lemos e Marcel Kenzo V. Onizuka - **Departamento Técnico Ourofino**.

PORTO, A.S. Desenvolvimento de nanoemulsão o/a a base de óleo de copaíba, incorporadas com nanopartículas magnéticas de zinco.2015.106P. **Dissertação (Mestrado Nanociência e Nanobiotecnologia)** Universidade de Brasília, Distrito Federal.

QUEIROZ, JMG; SUZUKI, MCM; MOTTA, APR; NOGUEIRA, JMR; CARVALHO, EM Aspectos populares e científicos do uso de espécies de Eugenia como fitoterápico. **Rev. Fitos**. 2015 , 9 , 73–159.

RADKE, A.K.; REIS, B.B.; GEWEHR, E.; ALMEIDA, A.S.; TUNES, L.M. & VILLELA, F.A. (2016) – Alternativas metodológicas do teste de envelhecimento acelerado em sementes de coentro. **Ciência Rural**, vol. 46, n. 1, p. 95-99. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20140188>

RANAWAT P, BAKSHI N. Naringenin; a bioflavonoid, impairs the reproductive potential of male mice. **Toxicol Mech Methods**. 2017 Jul;27(6):417-427. doi: 10.1080/15376516.2017.1296048. Epub 2017 Apr 10. PMID: 28395574.

RECK, J.; MARTINS, J. R. Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 1, 2017. 73-80 p.

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, n. 1, p. 53-62, 2001.

SAHIN Z, OZKAYA A, CUCE G, UCKUN M, YOLOGLU E. Investigation of the effect of naringenin on oxidative stress-related alterations in testis of hydrogen peroxide-administered rats. **J Biochem Mol Toxicol**. 2017 Sep;31(9). doi: 10.1002/jbt.21928. Epub 2017 May 3. PMID: 28467669

SANTOS, et al., Avaliação da ação de extratos vegetais com potencial atividade carrapaticida. (2018). **Pubvet**. 12. 1-7. 10.31533/pubvet.v12n8a157.1-7.

SANTOS, I. L. V. L.; SILVA, C. R. C. Pesquisas aplicadas em farmácia. 1. ed. Campina Grande: **Editores Science**, 2022.

SHAH, J. et al. Nanoemulsion based vehicle for effective ocular delivery of moxifloxacin using experimental design and pharmacokinetic study in rabbits. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 5, p. 230, 2019.

SHAH, J. et al. Nanoemulsion based vehicle for effective ocular delivery of moxifloxacin using experimental design and pharmacokinetic study in rabbits. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 5, p. 230, 2019.

SHAW, R. D. Culture of an organophosphorus resistant strain of *Boophilus microplus* (Canestrini) and assessment of its resistance spectrum. **Bulletin of Entomological Research**, v. 56, n. 3, p. 398-405, 1966.

SILVA, F. F. A. da.; ALVES, C. C. F.; OLIVEIRA FILHO, J. G.; VIEIRA, T. M.; CROTTI, A. E. M.; MIRANDA, M. L. D. Chemical constituents of essential oil from *Murraya paniculata* leaves and its Application to in vitro biological control of the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Food Science and Technology**, AHEAD, p. 1-5, 2019.

SINGH, Y. et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 252, p. 28–49, 2017.

SOLAK KA, SANTOS RR, VAN DEN BERG M, BLAAUBOER BJ, ROELEN BA, VAN DUURSEN MB. Naringenin (NAR) and 8-prenylnaringenin (8-PN) reduce the developmental competence of porcine oocytes in vitro. **Reprod Toxicol**. 2014 Nov;49:1-11. doi: 10.1016/j.reprotox.2014.05.013. Epub 2014 Jun 4. PMID: 24905140.

SOUSA, ISABELLA C. et al. Development and validation of software that quantifies the larval mortality of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* cattle tick. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 13, n. 3, p. 101930, 2022.

SOUZA, E.L.; OLIVEIRA, S.; ALMEIDA, A.S.; MENEGHELLO, G.E.; GEWEHR, E. & TUNES, L.M. (2015) – Testes de vigor para avaliação da qualidade de sementes de grama bermuda. **Revista de la Facultad de Agronomía**, vol. 114, n. 2, p. 185-192.

STONE, B. F.; HAYDOCK, K. P. A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can). **Bulletin of Entomological Research**, v. 53, n. 3, p. 563-578, 1962.

TOLENTINO S, PEREIRA MN, CUNHA-FILHO M, GRATIERI T, GELFUSO GM.

Targeted clindamycin delivery to pilosebaceous units by chitosan or hyaluronic acid nanoparticles for improved topical treatment of acne vulgaris. **Carbohydr Polym.** 2021 Feb 1;253:117295. doi: 10.1016/j.carbpol.2020.117295. Epub 2020 Oct 22. PMID: 33278954.

TOSONI, A. et al, Aeschlimannii infection: first case with acute hepatitis and review of the literature. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, 2016. 20: 2630-2633

TUNES, L.M.; PEDROSO, D.C.; GADOTTI, G.I.; MUNIZ, M.F.B.; BARROS, A.C.S.A. & VILLELA, F.A. (2013) – Accelerated aging to assess parsley seed vigor. **Horticultura Brasileira**, vol. 31, n. 3, p. 457-460. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362013000300018>

UCHÔA, ADA; OLIVEIRA, WF; PEREIRA, APC; SILVA, AG; CORDEIRO, BMPC; MALAFAIA, CB; ALMEIDA, CMA; SILVA, NH; ALBUQUERQUE, JFC; SILVA, MV; e outros Atividade Antioxidante e Perfil Fitoquímico de Extratos de Folhas de *Spondias tuberosa* Arruda. **Sou. J. Plant Sci.** 2015 , 06 , 3038–3044.

VIEIRA, A. W. M. Efeito do fungo *Metarhizium anisopliae* em associação ou não a acaricida sobre cepa do carrapato *Rhipicephalus microplus* resistente a acaricidas: ensaios em laboratório e a campo. 2013. 97 f. **Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013**

VINTURELLE R, MATTOS C, MELONI J, LAMBERTI HD, NOGUEIRA J, VAZ JÚNIOR IS, ROCHA L, LIONE V, FOLLY E (2021) Evaluation of essential oils as an ecological alternative in the search for control *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports** 23: 100523.

VUDRIKO P, UMEMIYA-SHIRAFUJI R, TAYEBWA DS, BYARUHANGA J, BYAMUKAMA B, TUMWEBAZE M, XUAN X, SUZUKI H. Molecular Characterization of Octopamine/Tyramine Receptor Gene of Amitraz-Resistant *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *decoloratus* Ticks from Uganda. **Microorganisms.** 2022 Nov 30;10(12):2384. doi: 10.3390/microorganisms10122384. PMID: 36557637; PMCID: PMC9788083

WULFF, JUAN P. ET AL. Pyrokinin receptor silencing in females of the southern cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* is associated with a reproductive fitness cost. **Parasites & Vectors**, v. 15, n. 1, p. 1-17, 2022.