

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CÂMPUS RIO VERDE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA
ESTUDO DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE COMPOSTOS
BIOATIVOS PARA CONTROLE DE *RHIPICEPHALUS*
MICROPLUS (ACARI: IXODIDAE)

Autor: Priscila Fernanda Pereira Barbosa
Orientador: Dr. Fabiano Guimarães Silva

RIO VERDE - GO

Fevereiro - 2016

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CÂMPUS RIO VERDE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA
ESTUDO DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE COMPOSTOS
BIOATIVOS PARA CONTROLE DE *RHIPICEPHALUS*
MICROPLUS (ACARI: IXODIDAE)

Autor: Priscila Fernanda Pereira Barbosa
Orientador: Dr. Fabiano Guimarães Silva

Dissertação apresentada como parte
das exigências para obtenção do
título de MESTRE EM
AGROQUÍMICA no Programa de
Pós-Graduação em Agroquímica do
Instituto Federal de Educação,
Ciência e Tecnologia Goiano -
Câmpus Rio Verde - Área
de concentração Agroquímica
Orgânica

RIO VERDE - GO

Fevereiro - 2016

Orientador: Prof. Dr. Fabiano Guimarães Silva

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agroquímica,
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Câmpus de
Rio Verde, 2016.

Biografia.

Inclui índice de tabelas, figuras e lista de símbolos, siglas, abreviações e
unidades.

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CÂMPUS RIO VERDE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA
ESTUDO DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE COMPOSTOS
BIOATIVOS PARA CONTROLE DE *RHIPICEPHALUS*
MICROPLUS (ACARI: IXODIDAE)

Autor: Priscila Fernanda Pereira Barbosa
Orientador: Prof. Dr. Fabiano Guimarães Silva

TITULAÇÃO: Mestre em Agroquímica

APROVADA: de de 2016.

Rômulo Davi Albuquerque Andrade
(Membro externo)
IFG – Câmpus Luiziana

Thony Assis Carvalho
(Membro interno)
IF Goiano – Câmpus Ceres

Dr. Fabiano Guimarães Silva
(Orientador)
IF Goiano – Câmpus Rio Verde

AGRADECIMENTOS

Sou grata primeiramente a Deus, por me dar a vida e a oportunidade de ingressar nos estudos de maneira satisfatória.

Agradeço ao meu pai Walter Barbosa de Jesus, embora não esteja mais comigo, sempre me incentivou a estudar, ele sempre dizia que o conhecimento adquirido é a única coisa que ninguém pode nos tirar. Sou grata também à minha mãe Luzia Pereira de Sousa, por estar sempre ao meu lado me apoiando em momentos bons e ruins.

Ao Instituto Federal Goiano - Câmpus Rio Verde e ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica. Ao laboratório QUIMERA e seus integrantes, que me auxiliaram durante os testes experimentais.

Sou grata aos professores que acompanharam meu trabalho, entre eles, o professor Dr. Rômulo Davi Albuquerque Andrade, que sempre acompanhou, orientou o desenvolvimento do projeto e esteve ao meu lado ao longo do mestrado. E, sou grata também ao meu orientador professor Dr. Fabiano Guimarães Silva, por disponibilizar em ser meu orientador e ajudar a concluir o mestrado com êxito.

Agradeço também à Fabiana Fernandes e Alef Galvão Pereira, por disponibilizar animais infestados para coleta de carrapato e ao manejo com os animais infestados, respectivamente. Além disso, a amizade destes me encorajou a enfrentar os obstáculos durante os procedimentos.

Por fim sou grata à minha família, inclusive minha tia Ivanilda de Sousa Ferreira, por me apoiar de todas as maneiras possíveis e aos meus amigos.

Muito Obrigada!

BIOGRAFIA DO AUTOR

Priscila Fernanda Pereira Barbosa, filha de Luzia Pereira de Sousa e Walter Barbosa de Jesus, nascida em 14 de março de 1992, natural de Santa Helena de Goiás - GO.

Em março de 2014, graduou-se em Licenciatura em Química pelo Instituto Federal Goiano – Câmpus Rio Verde Goiás. Em março de 2014 ingressou no Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Agroquímica pelo Instituto Federal Goiano – Câmpus Rio Verde sob a orientação do Professor Dr. Fabiano Guimarães Silva.

Esta tem por objetivo continuar os estudos fazendo doutorado na área de Química e posteriormente contemplar o cargo de professor em alguma universidade ou instituição federal.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1 <i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf- Capim-Limão.....	5
1.2 <i>Azadiracht indica</i> L – Neem.....	7
1.3 <i>Melia azedarach</i> - Santa bárbara.....	9
1.4 <i>Pouteria gardneriana</i> Radlk- Guapeva.....	10
1.5 <i>Anacardium othonianum</i> Rizz- Caju-do-cerrado.....	11
1.6 Nanomaterial- Quitosana.....	12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	16
2. OBJETIVOS.....	22
3. CAPÍTULO 1 Avaliação da aplicação de nanopartículas poliméricas para a liberação controlada do extrato etanólico das folhas de guapeva (<i>Pouteria gardneriana</i> Radlk) no controle do <i>Rhipicephalus microplus in vitro</i>	24
RESUMO.....	24
CHAPTER1 Evaluation of polymeric nanoparticles application for controlled release of ethanol extract from guapeva leaves (<i>Pouteria gardneriana</i> Radlk) in <i>Rhipicephalus microplus in vitro</i> control.....	25
ABSTRACT.....	25
3.1 INTRODUÇÃO.....	25
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29

3.4 CONCLUSÃO.....	37
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
4. CAPÍTULO 2: Controle de <i>Rhipicephalus microplus</i> por acaricida orgânico a partir das folhas de <i>Melia azedarach</i> suportado em nanoesfera de quitosona.....	40
RESUMO.....	40
CHAPTER 2: <i>Rhipicephalus microplus</i> control by organic acaricide from <i>Melia azedarach</i> leaves supported on chitosan nanosphere.....	41
ABSTRACT.....	41
4.1 INTRODUÇÃO.....	41
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.4 CONCLUSÃO.....	53
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
5. CONCLUSÃO GERAL.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
INTRODUÇÃO	
Figura 1. Estrutura do metabólito secundário presente na <i>Cymbopogon citratus</i>	6
Figura 2. Estrutura da molécula azadiractina presente na <i>Azadiracht indica</i>	8
Figura 3. Estrutura de um tanino condensado.....	11
Figura 4. Reação da desacetilação da quitina.....	12
Figura 5. Estrutura química da quitosana.....	14
CAPÍTULO 1	
Figura 1. Espectro da nanopartícula de quitosana no FTIR.....	30
Figura 2. Espectro do extrato de guapeva no FTIR.....	31
Figura 3. Espectro do extrato ancorado em quitosana noFTIR.....	31
Figura 4. Espectro de infravermelho dos pontos da variação de condutividade obtidos da titulação condutimétrica.....	32
Figura 5. Curvas de titulação condutimétrica.....	33
Figura 6. pH e condutividade da solução durante a titulação condutimétrica.....	34
Figura 7. Nanopartícula produzida a partir de sistema de Spray-dry pelo método de gelificação em NaOH.....	35
Figura 8. Representação da taxa de redução em porcentagem das massas dos ovos após 14 dias do início do tratamento.....	36
Figura 9. Ovopostura para o tratamento controle, extrato bruto e concentração de 0,4% após 14 dias do início do bioensaio.....	37

CAPÍTULO 2

Figura 1. Espectro da nanopartícula de quitosana no FTIR.....	46
Figura 2. Espectro do extrato de santa bárbara no FTIR.....	47
Figura 3. Espectro do extrato ancorado em quitosana no FTIR.....	48
Figura 4. Espectro de infravermelho dos pontos da variação de condutividade obtidos da titulação condutimétrica.....	49
Figura 5. Curvas de titulação condutimétrica.....	49
Figura 6. pH e condutividade da solução durante a titulação condutimétrica.....	51
Figura 7. Nanopartícula produzida a partir de sistema de Spray-dry pelo método de gelificação em NaOH.....	51
Figura 8. Representação da taxa de redução em porcentagem das massas dos ovos após 14 dias do início do tratamento.....	52
Figura 9. Ovopostura para o tratamento controle, extrato bruto e concentração de 0,2% após 14 dias do início do bioensaio.....	53

RESUMO

DA BARBOSA, Priscila Fernanda Pereira. Instituto Federal Goiano - Câmpus Rio Verde – GO, fevereiro de 2016. **Produção de nanopartículas poliméricas para estudo de liberação controlada de compostos bioativos para controle de *Rhipicephalus microplus* (acari: ixodidae)**. Orientador: Fabiano Guimarães Silva. Coorientadora: Ana Carolina Ribeiro Aguiar.

O controle do carrapato *Rhipicephalus microplus* é realizado principalmente por acaricidas químicos, porém a utilização destes de maneira incorreta tem fortalecido a resistência das cepas e deixando resíduos na carne e no leite. A substituição destes por compostos ativos que possuem a mesma funcionalidade é uma alternativa atraente e viável neste contexto. Estes compostos se encontram de forma natural em espécies vegetais fazendo parte do seu metabolismo, podendo ser sintetizados ou extraídos de suas plantas respectivas. O uso de produtos naturais tem se tornado grande alvo de pesquisas, principalmente espécies nativas do cerrado brasileiro. Contudo os produtos fitoterápicos podem melhorar o perfil de eficácia por prolongar seu tempo de ação sobre o animal. Neste contexto a utilização de materiais poliméricos que tenham a capacidade de adsorver e liberar o princípio ativo de maneira controlada pode aumentar a eficácia do produto. Os objetivos do presente projeto compreenderam produzir cinco extratos vegetais a partir das espécies *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, *Pouteria gardneriana* Radlk, *Anacardium othonianum* Rizz, *Melia azedarac* e *Azadiracht indica* L, produzir nanoesferas de quitosana com a finalidade de ancorar o material vegetal, realizar testes

de liberação controlada para verificação da melhor faixa de pH para liberação dos extratos e por fim conduzir testes *in vitro* nas teleóginas do carrapato para verificação da toxicidade de cada extrato vegetal produzido. O material vegetal foi coletado no câmpus Rio Verde do Instituto Federal Goiano, no estado de Goiás, Brasil e submetido à secagem em estufa com circulação de ar forçada na temperatura de 40°C, triturado em moinho de facas até a obtenção de um pó fino. O extrato etanólico foi obtido por extração a frio. Produziu-se as nanoesferas de quitosana pelo sistema “Spray-drying” e posteriormente, ancorou-se os extratos no nanomaterial obtido. Testes no FTIR e UV-Vis foram realizados com as alíquotas coletadas no processo de titulação. Preparou-se soluções a partir dos extratos nas concentrações de 0,2; 0,4 e 1 % (massa/massa) para conduzir os testes *in vitro*. Seis teleoginas foram fixadas em placas de petri e previamente tratadas com os tratamentos citados acima, além do tratamento controle (etanol) e extrato bruto. Todos os testes foram realizados em triplicata. Os parâmetros observados foram de mortalidade e taxa de redução na massa dos ovos. Observou-se que o processo de liberação controlado foi eficaz para todas as espécies, pois maiores liberações do material ocorreram entre pH 5 e 7, tornando o acaricida orgânico junto ao nanomaterial aplicável em bovinos. Nos testes *in vitro* para o tratamento do extrato bruto a taxa de mortalidade foi de 100 % e nos três tratamentos das soluções a taxa de redução da massa dos ovos variou entre 30 a 100 %, sendo que para as espécies *Pouteria gardneriana* Radlk e *Melia azedarac* esta taxa proporcionou resultados semelhantes ao extrato bruto nas concentrações 0,4 e 0,2 %, respectivamente.

Palavras-chave: acaricida orgânico, liberação controlada, nanoesfera.

ABSTRACT

Barbosa, Priscila Fernanda Pereira. Federal Goiano Institute - Campus Rio Verde – GO. Production of polymeric nanoparticles to study bioactive compounds controlled release in the *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) control. Advisor: Fabiano Guimarães Silva. Co-advisor: Ana Carolina Ribeiro Aguiar.

The *Rhipicephalus microplus* tick control is mainly performed by chemical acaricides, which incorrect use has strengthened the strains resistance and left residues in meat and milk. The replacement of these by active compounds that have the same functionality is an attractive and viable alternative in this context. These compounds are found naturally in vegetal species as part of their metabolism, and may be synthesized or extracted from their respective plants. The natural products use has becoming big target of research, especially Brazilian cerrado native species. But those phytotherapeutic products can improve the efficacy profile for prolonging his time acting on the animal. In this context the polymeric materials use that have the capacity to adsorb and release the active ingredient in a controlled way can increase the product effectiveness. The objectives of this project included produce five plant extracts from the species *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, *Pouteria gardneriana* Radlk, *Anacardium othonianum* Rizz, *Melia azedarac* and *Azadiracht indica* L, produce chitosan nanospheres in order to anchor the plant material, conduct controlled release tests to verify the best pH range for extracts release and finally conduct *in vitro* tests on tick engorged females in order to check the toxicity of each plant extract produced. The plant material was collected on the campus

Rio Verde of the Federal Goiano Institute in the State of Goias, Brazil and dried in an oven with forced air circulation at 40 °C, ground in a Wiley mill to obtain a fine powder. The ethanol extract was obtained by cold extraction. It was produced chitosan nanospheres by the "Spray-drying" system and then anchored the extracts obtained in the nanomaterial. Tests on FTIR and UV-Vis were performed with aliquots collected in the titling process. It was prepared solutions from the extracts in 0,2; 0,4 and 1% concentrations to conduct *in vitro* tests. Six engorged females were fixed in petri plates and previously treated with treatments mentioned above, in addition to the control (ethanol) and raw extract. All tests were performed in triplicate. The parameters observed were mortality and the mass of eggs reduction rate. It was observed that the controlled release process was effective for all species, because greater material release occurred between pH 5 and 7, becoming organic acaricide with the nanomaterial applicable in cattle. *In vitro* tests for raw extract treatment the mortality rate was 100% and the three treatment solutions the mass eggs reduction rate ranged from 30 to 100%, and for *Pouteria gardneriana* Radlk and *Meliaazedarac* species this rate achieved results similar to the raw extract at concentrations of 0.4 and 0.2%, respectively.

Key words: Organic acaricide, Controlled release, Nanosphere

1. INTRODUÇÃO

A utilização de compostos químicos para o controle de pragas é uma estratégia utilizada em larga escala por vários países, porém o uso inadequado dos mesmos acarreta em resistência, problemas relacionados a saúde animal, resíduos na carne e no leite. Neste contexto a busca por princípios ativos botânicos tem se tornado alvo de muitas pesquisas, mostrando ser uma alternativa viável para o controle de pragas.

Espécies vegetais desenvolvem mecanismos de defesa naturalmente, tais como: os metabólitos secundários e óleos essenciais, desempenhando atividade inseticida, tais compostos estudados isoladamente mostram toxicidade adequada para a morte ou inibição da proliferação de organismos indesejados (ZOUBIRI e BAALIOUAMER 2011).

O ácaro *Rhipicephalus microplus* é um ectoparasita proveniente de regiões tropicais e subtropicais, conhecido como carrapato, é responsável pela transmissão de doenças virais, bacterianas e protozooses, anemia e redução no ganho de peso em bovinos, principalmente em raças de origem europeia. Esse exige um único hospedeiro para a sua evolução, no qual realiza todas as mudas, apresentando no seu ciclo biológico, duas fases: uma parasitária e uma fase de vida livre (NETO et al., 2006).

Este ácaro pertence à família ixodidae, caracterizados principalmente por apresentarem escudo dorsal, com nítido dimorfismo sexual e utiliza apenas um animal em seu ciclo vital, bovinos e equinos são os hospedeiros principais, mas cervídeos e pequenos ruminantes domésticos também podem ser atacados. Os sítios de predileção no hospedeiro são a região ventral do corpo, do pescoço e peito do animal até a genitália. Carrapatos imaturos podem ser encontrados nos ouvidos (NETO et al., 2006)

O seu controle é realizado por quimioterápicos vinculado a danificação do sistema nervoso central do carrapato. No Brasil existem seis classes principais de acaricidas, os organofosforados, as formamidas, os piretroídes sintéticos, os fenilpirazóis, as lactonas macrocíclicas e as benzoí fenil ureias (Fluazuron), que são administrados por contato ou de forma sistêmica (ZAMAN et al., 2012).

Estima-se que o país gaste cerca de R\$ 800 milhões de reais com produtos químicos para o controle do carrapato, contudo a infestação deste em bovinos no Brasil aproxima-se de 80% (GRISI et al., 2002). A explicação para este fato está relacionada ao manejo destes produtos, que na maioria das vezes é realizado pelo próprio produtor e sem nenhuma orientação técnica.

A escolha de qual acaricida a ser utilizado, deve ser feita levando em conta o índice de resistência das cepas de carrapatos da região, utilizando o teste de resistência aos acaricidas (biocarrapaticidograma). Esse teste é recomendado para detecção de sensibilidade ou resistência das teleóginas (fêmeas ingurgidas) ao carrapaticida (CAMILLO et al., 2009)

A ivermectina é um endectocida pertencente ao grupo químico das lactonas macrocíclicas (LM) desde 1981, utilizado no controle de parasitas internos e externos do gado brasileiro. É uma das classes químicas mais utilizadas como carrapaticida (FOX et al., 2006).

Contudo, relata-se a resistência por este princípio ativo em regiões do estado do Rio Grande do Sul e São Paulo (KLAFKE et al., 2012). Testes de imersão larval (LIT) e testes de pacote larval (LPT) foram conduzidos em algumas propriedades rurais das regiões citadas acima. Observou-se que na maioria das populações analisadas ocorreu resistência a ivermectina. A explicação para este fato foi dada pelo manejo realizado nas fazendas, que se baseou na pulverização de 2 a 6 vezes por ano durante cerca de 3 anos, acarretando assim na seleção de cepas resistentes ao medicamento (KLAFKE et al., 2012).

Estudos recentes do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (RS) apontaram para cepas multirresistentes a todos os princípios ativos comercializados no país de acordo com o compêndio brasileiro de produtos veterinários (SINDAN, 2013). Até o presente estudo não havia relatos de resistência pelo princípio ativo derivado do benzilfenilúreia, o fluazuron, carrapaticida que tem mecanismos diferentes das lactonas macrocíclicas (LM), agindo diretamente na incorporação da quitina pela cutícula do carrapato, tratando assim de um inibidor em crescimento, tendo efeito direto sobre a

reprodução do ácaro. Os testes conduzidos demonstraram que há cepas de carrapatos multirresistentes na região sul do país, até mesmo pelo fluazuron (RECK et al., 2014).

Entende-se que a resistência é acarretada pelo uso constante e prolongada do mesmo princípio ativo, induzindo a seleção de indivíduos resistentes por partes dos parasitas. Um das alternativas é a associação de medicações e/ou modificações na concentração dos mesmos. Esses meios têm sido opções para superar a indisponibilidade de novas moléculas no mercado que sejam nocivas ao ectoparasita (CANAVACI et al., 2006).

Tratando-se de combinações entre princípios ativos, Reck et al (2014) relatou resistência pelas combinações entre os organofosforados (OP) e piretroídes sintéticos (SP), destacando pelos princípios ativos Clorpirifós e Cipermetrina, respectivamente (RECK et al., 2014). Tal resistência havia sido previamente constatada em anos anteriores em regiões tropicais, no caso a Austrália (NOLAN et al., 1989).

Outras publicações relataram doses discriminadas para a indução total ou a inibição parcial da eclosão larval pelo Fluazuron de 200 ppm. Porém em testes com cepas que não foram expostas a nenhum tipo acaricida, houve a redução da eclosão larval em 99% em dosagem de 50 ppm e redução larval de 50% para cepas que haviam sido expostas a algum princípio ativo para mesma dosagem (RECK et al., 2014). Considerando tal informação, entende-se que há necessidade de testes de reprodutibilidade e o estabelecimento de doses discriminadas para diagnosticar a resistências. Altas dosagens sem a confirmação da necessidade das mesmas estão entre um dos fatores para a ocorrência de cepas resistentes no país.

Além da resistência a produtos químicos, ressalta-se que a utilização dos mesmos gera resíduos podendo ser encontrados na carne e no leite, sendo assim prejudicial para os consumidores. Relata-se a ocorrência de problemas de saúde relacionada à ingestão de resíduos de produtos veterinários, tais como doenças respiratórias, cardíacas, do sistema nervoso central e efeitos adversos a gravidez (SILVA et al., 2012)

Em virtude da resistência a acaricidas comerciais e os efeitos dos resíduos destes em produtos de origem animal, a busca por novas estratégias de controle tem se fortalecido cada vez mais, apontando para pesquisas e futura aplicação de compostos orgânicos biodegradáveis de espécies nativas que apresentam potencial bioativo ou que segundo o conhecimento empírico demonstram toxicidade para os carrapatos.

Diversas espécies nativas do cerrado brasileiro apresentam potencial para serem utilizadas como fontes renováveis de matéria-prima para produção de novos biocidas que apresentem eficácia no combate às pragas e minimize o prejuízo causado pelos produtos convencionais. Algumas espécies vegetais desenvolvem mecanismos de defesa tais como os metabólitos secundários e óleos essenciais desempenhando atividade inseticida, tais compostos estudados isoladamente mostram toxicidade adequada para a morte ou inibição da proliferação de organismos indesejados (ZOUBIRI e BAALIOUAMER 2011).

O produto das plantas pode ser obtido através da raiz, caule, folhas, sementes ou até mesmo do fruto. Isto depende de estudos e testes para verificação da toxicidade dos compostos presentes nos tecidos, órgãos ou células das espécies em questão. Aguilar et al. (2009) compararam a atividade acaricida das raízes e folhas da *P. alliacea* e concluíram que apenas as raízes apresentavam potencial bioativo (AGUILAR et al., 2009).

As plantas são capazes de sintetizar substâncias que são essenciais para funções básicas vitais, como por exemplo, na divisão, respiração, estocagem, crescimento celular e reprodução. Tais compostos são denominados metabólitos primários, sendo essenciais para a sobrevivência da planta. Outros compostos ainda sintetizados fazem parte do metabolismo secundário das plantas podendo atuar como antibióticos, antifúngicos e antivirais. Esses protegem assim, as plantas, de ataque de patógenos e apresentam atividades antigerminativas ou tóxicas para outras plantas, apresentando papel importante na adaptação das plantas ao meio ao ambiente e fazendo com que as mesmas tenham boa interação com o ecossistema (FUMAGALLI et al., 2008).

A classificação destes compostos secundários é dada através de sua rota biossintética, podendo ser classificados por grupos principais de compostos fenólicos, terpenos e alcaloides. Cada grupo apresenta funções ou atividades biológicas diferenciadas para as plantas. Os metabólitos secundários podem ser liberados no meio através dos tecidos vegetais por lixiviação, exsudação radicular, volatilização e decomposição de resíduos vegetais (FUMAGALLI et al., 2008).

A natureza se estabelece em um ciclo através do qual consegue o equilíbrio dinâmico entre consumidores e seu meio. Os sistemas de produção e consumo no país podem ter caráter sustentável, desde que tais recursos sejam utilizados de forma correta, caso contrário, este sofre colapso e a demanda não será mais suprida pela necessidade do mercado, acarretando em mudanças climáticas, perda da biodiversidade e alteração

em ciclos gasosos importantes para a vida no planeta. Dessa forma, o desenvolvimento sustentável de produtos naturais deve ser rigorosamente controlado para que não haja prejuízos para natureza.

Com o avanço da ciência, a utilização de produtos renováveis para o controle de pragas, pode alcançar resultados surpreendentes no que diz respeito a eficiência de moléculas tóxicas. O uso da nanotecnologia associada à molécula com ação acaricida promove atraente linha de pesquisa para controle do ácaro no rebanho brasileiro (CARAMORI et al., 2004).

Assim, o fácil acesso a plantas nativas do cerrado e a utilização de um polímero de baixo custo, faz com que o produto a ser desenvolvido se torne atrativo para os produtores rurais, pois, uma vez comprovada sua eficácia, os logros dos resultados serão mais aparentes do que os produtos ineficientes e de alto custo que existem no mercado.

Uma das formas de obtenção desses sistemas consiste no ancoramento de moléculas, metais e pesticidas na superfície da quitosana. A liberação controlada possui princípio básico de liberar lentamente o material ancorado, permitindo a diminuição das perdas do produto, bem como e melhoria da eficácia do material químico.

Dessa foram, para a tecnologia de liberação controlada de extratos ativos, a quitosana se encaixa perfeitamente por ser um biopolímero hidrofílico adsorvente. Além disso, a quitosana é caracterizada por ser um material biocompatível e biodegradável, e por isso, são encontradas diversas aplicações com este biopolímero (LIU et al., 2008).

Desse modo, propõe-se caracterizar e utilizar nanopartículas poliméricas funcionalizadas com extratos obtidos da folha de cinco espécies do cerrado, capim-limão [*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf], guapeva (*Pouteria gardneriana* Radlk), cajude-àrvore-do-cerrado (*Anacardium othonianum* Rizz), santa bárbara (*Melia azedarach*) e neem (*Azadiracht indica* L.), no controle do *R. microplus*. Para tanto, serão produzidas nanopartículas poliméricas ativadas para avaliar a eficiência dos fitoterápicos carrapaticidas no controle do *R. microplus*, através da liberação controlada.

1.1 *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf- Capim Limão

O *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf é uma erva aromática perene pertencente à família Poaceae que é constituída por cerca de 30 gêneros (THANGAM et al., 2014). A origem desta planta é asiática, assim como outras espécies do gênero *Cymbopogon*. SP. sendo encontrada também em regiões tropicas e subtropicais. No Brasil é conhecida

popularmente por capim-limão, capim-cidreira ou capim-santo. O nome básico capim é dado de acordo com a folhagem da espécie, pois crescem de forma frondosa e robusta formando touceiras de até 1 metro de altura ou mais (DUARTE et al., 2004).

A utilização desta espécie na medicina popular é muito comum, por causa de suas propriedades, por exemplo, antimicrobiana, antiviral, e potencial antioxidante e ainda relatam efeitos preventivos ao câncer (THANGAM et al., 2014).

Estudos realizados por Thangam et al. (2014) comprovaram a atividade antioxidante e anticâncer do *Cymbopogon citratus*, observando que o extrato aquoso da planta inibe a proliferação de células cancerígenas (THANGAM et al., 2014).

Além do emprego medicinal, esta espécie é utilizada como agente aromatizante na perfumaria e na cosmética devido a presença de óleo essencial. O principal constituinte desse óleo é o citral (47% a 85%) formado pela mistura de dois aldeídos monoterpênicos estereoisômeros: geranial e neral, representado na Figura 1. Em menor proporção já foram identificados outros componentes, como canfeno, citronelal, citronelol, farnesol, geraniol, limoneno, linalol, mentol, mirceno, nerol, α -pineno, β -pineno e terpineol. Entre os constituintes fixos estão os alcaloides, saponinas e os flavonoides (SILVA et al., 2008).

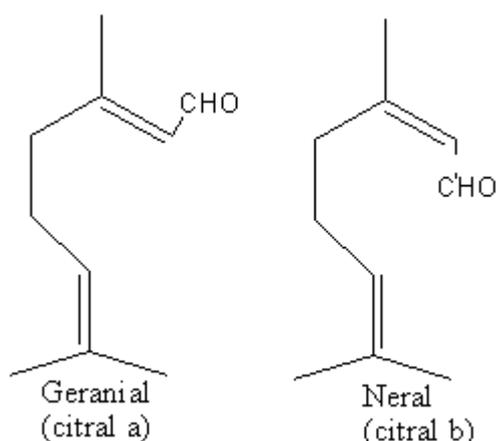


Figura 1. Estrutura do metabólito secundário presente na *Cymbopogon citratus*.

Fonte: SILVA, 2008.

Estudos sugerem que a atividade antibacteriana de *C. citratus* está principalmente nos componentes α - e β -citral presentes no óleo. As atividades antimicrobianas e antifúngicas foram comprovadas em 22 espécies de microrganismos,

além da propriedade inseticida, principalmente larvicida, bem como, repelente de insetos (COSTA et al., 2005).

Tanto o óleo essencial das folhas secas quanto o extrato etanólico da espécie interferem no desenvolvimento do carrapato *R. microplus*. Concentrações acima de 5% do óleo reduzem em 100% a eclodibilidade dos ovos e concentrações acima de 2% do extrato etanólico reduzem em 25%, sendo que diluído na proporção de 50% de água e 50% de etanol a eficácia do produto aumenta para 47%, considerando estes testes que são realizados em *in vitro*. A explicação do aumento da ação biocida utilizando o etanol como solvente pode ser dada pelo efeito potencializador, aumentando a constituição apolar da mistura (AGNOLIN et al., 2014).

A utilização do óleo na concentração de 2% para testes *in vivo* sob pulverização costal em animais infestados com o ácaro reduziu em 66% a infestação após o 14º dia após o tratamento. Em comparação com o produto químico que teve eficácia de 100% após o 3º dia após o tratamento, o resultado do produto natural foi inferior. Assim, é possível que na avaliação *in vivo* possa haver melhor condição de volatilidade, em virtude da aplicação do produto sob aspersão, implicando na formação de pequenas gotículas facilitando a volatilização devido ao aumento da superfície específica (AGNOLIN et al., 2014).

1.2 *Azadiracht indica* L – Neem

Azadiracht indica é uma árvore pertencente à família Meliaceae, conhecida popularmente como Neem. Existem duas espécies do gênero *Azadiracht*, sendo nativa da Índia, porém se adapta bem em regiões tropicais e subtropicais, podendo ser encontrada no Brasil (HOSSAIN et al., 2003).

A azadiractina é um dos principais compostos presentes na semente da *Azadiracht indica*. Este é um tetranortriterpenoide ativo conhecido por interromper a metamorfose e inibir a alimentação de outros insetos. As propriedades da Azadiractina começaram a ser descobertas na década de 1950 na Índia quando gafanhotos destruíram várias plantações deixando intactas as espécies *Azadiracht indica* e *Melia azedarach* (BERNARDI et al., 2012).

Produtos derivados do Neem apresentam a vantagem de ter baixa toxicidade a animais de sangue quente e serem rapidamente degradados no solo e nas plantas. É classificado como um pesticida de baixo efeito residual. Em 2009 foi introduzida no

mercado brasileiro uma formulação comercial de azadiractina (Azamax®) sendo o único produto registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o controle de pragas na agricultura (AGROFIT, 2011).

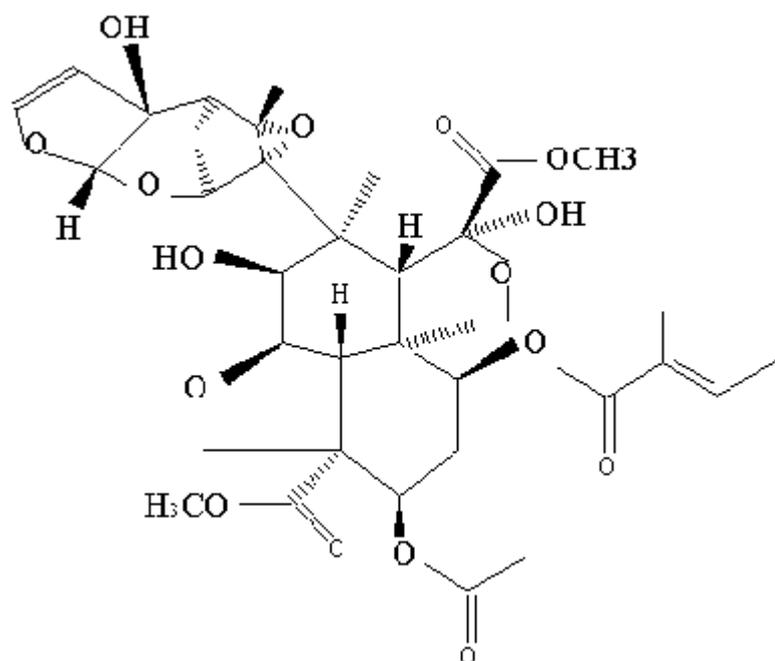


Figura 2. Estrutura da molécula azadiractina presente na *Azadiracht indica*.

Fonte: VALENTE, 2007.

Além da azadiractina, foram isolados 24 compostos ativos do Neem que possuem atividade biológica, atuando diretamente no comportamento e no crescimento dos artrópodes. Essa variedade de componentes reduz de modo significativo a ocorrência de fenômenos de tolerância e resistência ao fitoterápico (VALENTE et al., 2007).

As frutas dessa espécie também possuem compostos ativos, chegando a 40% de azadiractina em comparação com o óleo essencial das sementes. Comprovou-se o efeito inibitório sobre a vitelogenina durante o processo de oogênese de artrópodes (GIGLIOTTI et al., 2011.)

Utiliza-se o extrato aquoso das folhas secas do Neem para o controle do ectoparasita *R. microplus*. Testes *in vivo* foram realizados por Valente et al. (2007) que comparou a eficácia do extrato aquoso do Neem por meio de aplicação dorsal e o produto químico abamectina (Abm) tópica. A avaliação do efeito de cada acaricida foi realizada por meio da infestação média de cada animal nos dias 0, 15 e 30 após a

aplicação de cada produto. Verificou-se a redução significativa no dia 30° para o tratamento orgânico. Na forma como foi usada neste teste, a solução aquosa de folhas de Neem pode substituir a abamectina dentro do programa zootécnico de controle dos carrapatos em bovinos (VALENTE et al., 2007).

Denardi et al (2010) utilizaram o extrato aquoso do Neem em duas concentrações diferentes com o objetivo de observar o efeito do extrato no sistema reprodutor do carrapato, resultando em diferença significativa entre as cepas tratadas e as de controle (DENARDI et al., 2010). Outros autores demonstraram que o extrato inibe a ovoposição das teleóginas tratadas pelo teste de imersão, diminuindo a quantidade de carrapatos no hospedeiro. O princípio ativo encontrado nesta espécie pode ser administrado na alimentação dos bovinos como forma de prevenção (LANDAU et al., 2009). Comprovando assim a eficiência na utilização desta espécie como acaricida.

1.3 *Melia azedarach*- Santa bárbara

A santa bárbara conhecida também como cinamomo é uma árvore de grande porte pertencente á família *Meliaceae*, tendo como origem a Índia, porém é comum ser encontrada em regiões tropicais e subtropicais. Utilizada para extração de madeira e para vários fins médicos (SOUSA et al., 2011). A atividade desta planta foi avaliada em mais de 400 espécies de insetos, nas quais mais de 100 ocorrem no Brasil (BRUNHEROTTO et al., 2010).

Relatam-se os efeitos do extrato da santa bárbara em várias espécies de insetos. As plantas da família *Meliaceae* são conhecidas como fontes potenciais de propriedades inseticidas. A eficácia da utilização do extrato etanólico foi verificada por Al-Mehmadi e Al-Khalaf (2010) no controle das larvas do mosquito *Culex quinquefasciatus*. Os autores observaram bloqueio no desenvolvimento do mosquito pela indução da mortalidade das larvas 24 e 48 horas após o tratamento. Tal resultado pode ser explicado pela presença de limonoides nas folhas e sementes da espécie. Assim o extrato etanólico é uma alternativa para substituição dos inseticidas sintéticos convencionais no controle do mosquito *Cx. quinquefasciatus* (AL-MEHMADI e AL-KHALAF 2010).

Borges et al. (2013), avaliando a eficácia do extrato do fruto maduro no controle do carrapato *R. microplus* com diferentes solventes, verificaram alta taxa de mortalidade para larvas e inibição da oviposição. Concluíram que os melhores solventes extratores

são aqueles de baixa polaridade e a melhor concentração do extrato foi de 0,25%, tanto para morte larval e inibição da proliferação do ácaro (BORGES et al., 2013).

Alguns fatores podem influenciar na atuação de extratos naturais no controle de pragas. Entre eles podem se destacar a utilização de frutos maduros ou verdes. Sabe-se também que existe forte influência biogeográfica na composição química de diversas plantas, inclusive para a *M. azedarach*. Outro fator que afeta a bioatividade dos extratos é o tempo de armazenamento até o processamento deste (SOUSA et al., 2008)

Pensando nesses fatores Sousa et al. (2008) compararam a ação dos frutos maduros e verdes no controle do *R. microplus*, bem como a interferência do período de armazenamento dos frutos ou dos extratos em sua atividade acaricida. Diante dos resultados obtidos os autores concluíram que os frutos verdes tiveram maior influência nos testes de imersão e pacote larval para teleógenas e larvas, respectivamente. Houve inibição da oviposição e alta taxa de mortalidade para as larvas. Observaram também que o tempo de armazenamento teve efeito negativo para o tratamento, apontando para a degradação dos compostos ativos (SOUSA et al., 2008).

1.4 *Pouteria gardneriana* Radlk- Guapeva

A guapeva é uma árvore de grande porte pertencente á família das Sapotáceas e ao gênero *Pouteria*, que abrange várias espécies. É considerada árvore frutífera do cerrado possuindo características básicas na arborização e na alimentação de animais nativos do seu meio por produzir frutos anualmente. Por estas características, a árvore é bem utilizada em plantios para a recuperação de áreas degradadas.

Os compostos mais abundantes presentes nesta espécie são os compostos fenólicos, principalmente os taninos. Os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Estão amplamente distribuídos no reino vegetal, englobando desde moléculas simples até outras com alto grau de polimerização. Os taninos são encontrados em muitas frutas, sendo caracterizados como compostos fenólicos de alto peso molecular (ROCHA et al., 2011).

Os taninos desempenham função de proteção para as plantas contra ataque de herbívoros, diminuindo assim a taxa de predação por estes. Pesquisas sobre atividade biológica dos taninos evidenciaram a importante ação contra determinados microrganismos, como agentes carcinogênicos e causadores de toxicidade hepática.

Estes compostos são muito reativos, formam pontes de hidrogênio intra e intermolecular. São solúveis em água e em solventes polares (MONTEIRO et al., 2005).

Plantas ricas em taninos são utilizadas na medicina no tratamento de diarreia, hipertensão e antisséptico. Por serem quimicamente reativos, os taninos precipitam proteínas tendo assim efeito antimicrobiano e antifúngico. Os taninos auxiliam em processos de cura de feridas por formar camada protetora sobre tecidos epiteliais lesionados (PANSERA et al., 2003).

A molécula dos taninos são muito reativas devido aos oxigênios presente em toda sua estrutura, podendo fazer até doze ligações com proteínas. Essa molécula está representada na Figura 3. Em virtude da habilidade de se ligar as proteínas e outras macromoléculas, os taninos também apresentam atividade tóxica. Ayres et al. (1997) constataram a mortalidade de insetos após o tratamento com taninos condensados, pela ação tóxica destes e pela inibição da digestibilidade (AYRES et al., 1997).

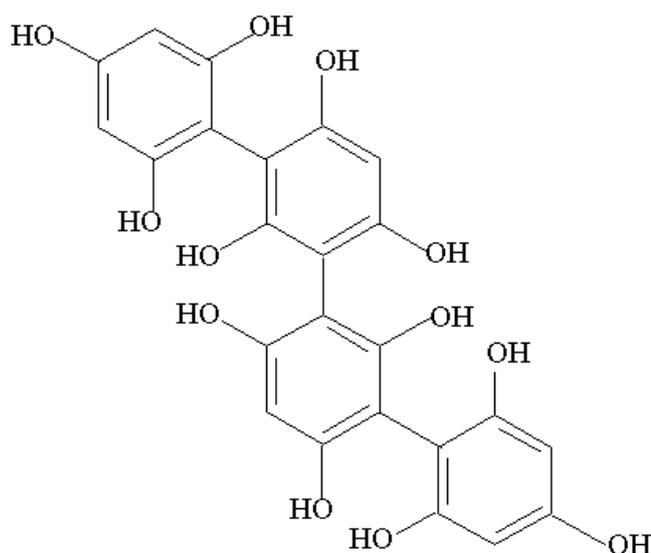


Figura 3. Estrutura de um tanino condensado.

Fonte: ROCHA , 2011.

Considerando o alto teor de compostos fenólicos e taninos condensados nas frutas e folhas da guapeva (ROCHA et al., 2011) e o entendimento que esses compostos apresentam atividade tóxica, essa espécie se torna interessante para o estudo e verificação da atividade do extrato das folhas no controle do *R. microplus*.

1.5 *Anacardium othonianum* Rizz- Caju-do-cerrado

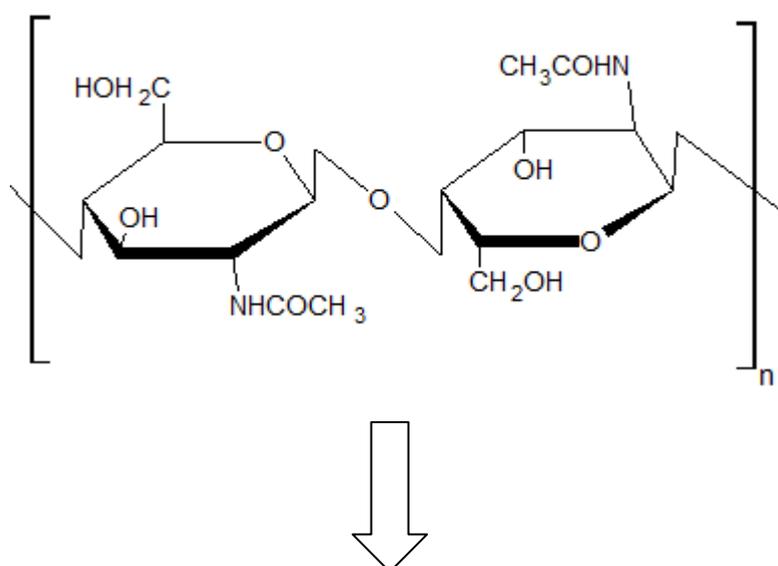
A *Anacardium othonianum* é uma espécie nativa da região nordeste do Brasil, na qual os frutos contêm compostos importantes tais como vitamina C, compostos fenólicos, açúcares e alguns minerais (cálcio, fósforo e ferro). Pertencente à família Anacardiaceae e ao gênero *Anacardium*, representada por 11 espécies, cuja espécie em questão é conhecida por seus valores nutricionais e econômicos (BARBOSA et al., 2014).

A cultura de caju tem importância econômica e social para país, pois participa de um mercado mundial bilionário, movimentando mais de 2,4 bilhões de dólares por ano, empregando mais de 1,2 milhões de pessoas no seu produto principal, a amêndoa da castanha-de-caju (EMBRAPA).

Dentre os compostos químicos encontrados nesta espécie, destacam-se os flavonoides e compostos fenólicos totais que desempenham função antioxidante. Os antioxidantes se destacam por prevenir a formação e a ação das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que se associam ao dano oxidativo (BROINIZI et al., 2008).

1.6 Nanomaterial- Quitosana

A quitosana é um biopolímero derivado do processo de desacetilação da quitina via hidrólise enzimática ou tratamento alcalino. Neste processo há a retirada do grupamento (CH_3CO) representado na Figura 4.



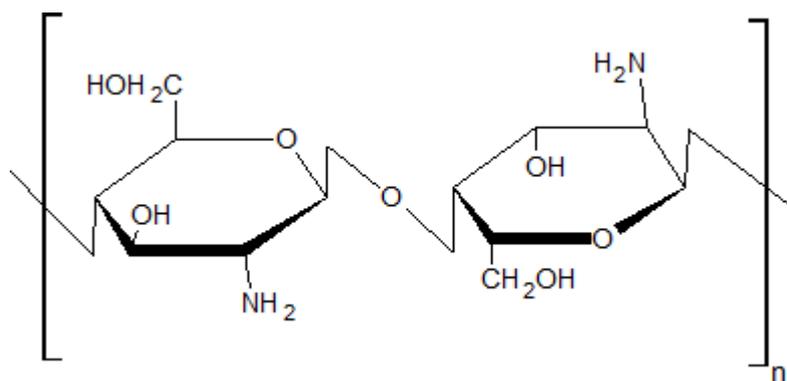


Figura 4. Reação da desacetilação da quitina.

Fonte: SILVA et al., 2006.

Considerado polissacarídeo catiônico em condições de pH neutro ou básico, contém grupamentos amino e acetoamino, considerada uma molécula muito reativa tornando-a mais suscetível a modificações estruturais. Em pH ácido o grupo amino pode sofrer protonação tornando a quitosana solúvel em água (LIU et al., 2008).

A utilização da quitosana e a pesquisa por novas aplicações têm crescido muito em diversas áreas como na agricultura e indústria de alimentos, mas, especialmente, na indústria farmacêutica, no desenvolvimento de cosméticos e biomateriais, tais como géis, filmes e membranas poliméricas (SILVA et al., 2006).

A sua estrutura química é formada por copolímeros beta - (1-4) - glicose -D- 2-amino-2-desoxi e beta - (1-4) - acetamida -2 desoxi -D- glicose (WEBSTER et al., 2007). A quitosana é um biopolímero considerada biodegradável, não tóxico e encontrada diretamente em alguns microrganismos, sendo a sua maior obtenção através do processo de desacetilação da quitina (GOMES et al., 2010).

A matéria-prima para a produção da quitina são rejeitos de crustáceos, sendo esses considerados materiais baratos e de fácil acesso. O processo da obtenção da quitosana envolve alguns tratamentos, sendo eles a desproteinização, desmineralização e por fim a desacetilação da quitina. O grau de desacetilação determina a quantidade de grupos amínicos na cadeia polimérica, sendo que, uma extensão acima de 50% de desacetilação define a entidade química quitosana (MOURA et al., 2006).

A quitosana é insolúvel em água, dissolvendo-se em soluções aquosas de ácidos orgânicos, como acético, e em alguns ácidos inorgânicos, como exemplo, o ácido clorídrico diluído, resultando em soluções viscosas (AHMED, 2014). A solubilidade da quitosana está relacionada com a quantidade de grupos amino protonados ($-\text{NH}_3^+$) na cadeia polimérica.

Devido a estrutura da quitosana (Figura 5), a utilização se torna muito favorável nos estudos de fixação de compostos, além da liberação controlada desses no meio desejado. Estudos realizados por Lucena et al. (2013) demonstram que a capacidade adsorptiva da quitosana modifica com tioacetamida na remoção de corantes têxteis. Os autores verificaram que a utilização da quitosana removeu 90% dos corantes presentes em solução (LUCENA et al., 2013).

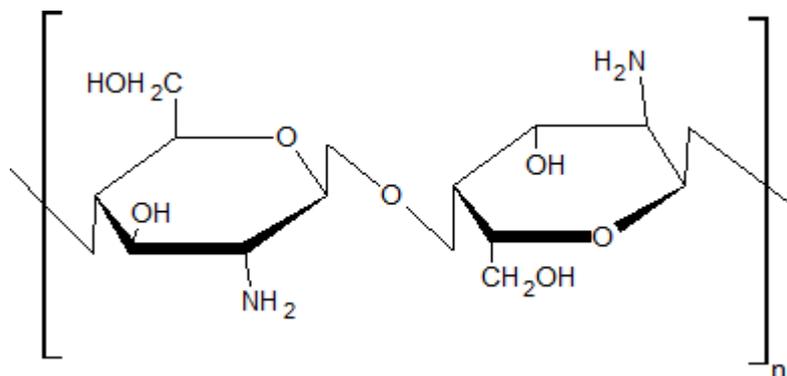


Figura 5. Estrutura química da quitosana.

Fonte: SILVA et al., 2006.

A utilização da quitosana em forma de flocos ou pó em processos de adsorção é muito frequente, porém apresenta desvantagens nestas formas, tais como, a solubilidade em meio ácido inviabilizando processos de reciclagem, baixa área superficial interna que limita o acesso aos sítios reativos não expostos diminuindo assim a capacidade adsorptiva e a velocidade de adsorção (LUCENA et al., 2013).

Os problemas citados acima podem ser minimizados aumentando a área superficial dos sítios de adsorção (grupos amino) fazendo alterações na estrutura do biopolímero, por produzir micro e nanopartículas (LUCENA et al., 2013).

Existem diferentes métodos de preparação das nanopartículas de quitosana. A seleção de alguns métodos depende de fatores tais como o tamanho da partícula desejada, estabilidade química e térmica dos agentes ativos, perfil cinético da liberação, estabilidade do produto final e toxicidade associada ao produto final. Agnihotri et al. (2004) discutem em sua revisão metodologias para o preparo do nanomaterial, considerando sempre a natureza da molécula ativa e tipo de liberação desejada (AGNIHOTRI et al., 2004).

Bulmer et al. (2012) propuseram a produção e caracterização de nanopartículas utilizando o método de gelificação e condensação da quitosana para ancorar o medicamento eritropoietina, verificando assim relação entre a eficácia do método de

produção e a liberação do composto ativo. Os autores concluíram que o método utilizado conferiu a produção de esferas em escala nanométrica, aumentando assim a eficiência do material, o ancoramento do medicamento nos sítios da quitosana foi confirmado, pois o peso molecular aumentou e se verificou a liberação controlada do medicamento, demonstrando assim o potencial da quitosana como material ancorante (BULMER et al., 2012).

Menegucci et al. (2014) trabalharam com quitosana combinada com materiais magnéticos que confere a quitosana vantagens tais como a detecção por técnicas de imagem, controlabilidade por um campo magnético externo e aquecimento térmico utilizado na liberação do composto ativo (MENEGUCCI et al., 2014).

A nanopartícula magnética de quitosana tem sido amplamente utilizada em aplicações biomédicas pela sua grande superfície de contato, facilidade de ser conjugada com biomoléculas e fácil manipulação por um campo magnético externo. Foi observado que ao utilizar a quitosana como material ancorante vinculado ao elemento magnético houve a liberação controlada do 5-hidroxitriptofano que é um precursor químico da biossíntese de importantes neurotransmissores (MENEGUCCI et al., 2014).

A literatura está repleta de estudos e comprovação da utilização da quitosana como material ancorante para liberação controlada de princípios ativos. O objetivo da liberação controlada de extratos solúveis é permitir que a concentração deste seja mantida por tempo prolongado numa concentração eficaz, abaixo do nível em que a concentração é tóxica e acima do nível em que o composto é ineficaz, que na maioria dos casos utiliza uma única aplicação.

Considerando a busca crescente por novos produtos que sejam eficazes no controle de pragas, as plantas tem sido importante fonte para obtenção de substâncias com estruturas químicas diferentes dos produtos químicos convencionais, que apresentam problemas associados ao uso prolongado, como desenvolvimento acelerado da resistência ao princípio ativo e problemas de contaminação, como presença de resíduos nos produtos de origem animal.

Nesse sentido, o uso de extratos vegetais de plantas e a aplicação de métodos cientificamente controlados no combate aos carrapatos dependem fundamentalmente do desenvolvimento de protocolos eficientes e competitivos. Uma das alternativas para melhorar a eficácia da aplicação destes extratos é a liberação controlada de químicos utilizando materiais inteligentes.

O princípio da liberação controlada visa a diminuição no uso de princípios ativos para aplicações diversas sem, contudo, perder a eficiência do produto aplicado. Assim, a união da nanotecnologia munida da liberação controlada de químicos funcionais, extrapola as perspectivas de melhoria ambiental, bem como a diminuição de resíduos gerados pela aplicação adequada dos produtos.

2- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v.100, p. 5- 28, 2004.

AGNOLIN, C.A.; OLIVO, C.J. ; PARRA, C. L. C. Efeito do óleo de capim limão (*Cymbopogon flexuosus* Stapf) no controle do carrapato dos bovinos. **Rev. Bras. Pl. Med., Campinas**, v.16, n.1, p.77-82, 2014.

AGROFIT. **Site Ministério da Agricultura e Pecuária**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 8 ago. 2015.

AGUILAR, J. A. R.; CABALLERO, A. A.; VIVAS, R. I. R.; ARGAEZ, R. B.; VAZQUEZ, Z. G.; GONZALEZ, M. M. Acaricidal activity of extracts from *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae) against the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v.9 p. 299-303, 2011.

AHMED, S.; AHMAD, M.; IKRAM, S. Chitosan: A Natural Antimicrobial Agent- A Review. **Journal of Applicable Chemistry**, v. 3, p. 493-503, 2014.

AL-MEHMADI, R. M.; AL-KHALAF, A. A. Larvicidal and histological effects of *Melia azedarach* extract on *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae). **Journal of King Saud University**, v. 22, p. 77–85, 2010.

AYRES, M. P.; CLAUSEN, T. P.; MACLEAN, S. F.; REDMAN, A. M.; REICHARDT, P. B. Diversity of structure and antiherbivore activity in condensed tannins. **Ecology**, v.78, p. 1696- 1712, 1997.

BARBOSA, V. M.; WACZUK, E. P.; KAMDEM, J. P.; ABOLAJI, A. O.; LACERDA, S. R.; COSTA, J. G. M.; MENESES, I. R. A.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; ROCHA, J. B. T. R.; POSSER, T. Phytochemical constituents, antioxidant activity, cytotoxicity and osmotic fragility effects of Caju (*Anacardium microcarpum*). **Industrial Crops and Products**, v. 55, p. 280-288, 2014.

BERNARDI, D.; GARCIA, M. S.; BOTTON, M. Efeito da azadiractina sobre *Chaetosiphon fragaefolli* (Cokerell, 1901) (Hemiptera: Aphididae) na cultura do morangueiro. **Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal**, v. 34, n. 1, p. 093-101, 2012.

BORGES, L. M. F. et al. *In vitro* efficacy of extracts of *Melia azedarach* against the tick *Boophilus microplus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 17, n. 2, p. 228-231, 2013.

BRUNHEROTTO, R.; VENDRAMIM, J. D.; ORIANI, M. A. G. Efeito de Genótipos de Tomateiro e de Extratos Aquosos de Folhas de *Melia azedarach* e de Sementes de *Azadirachta indica* sobre *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Neotropical Entomology**, v. 39, n.5, p.784-791, 2010.

BROINIZI, P. R. B.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.; SILVA, A. M. O.; TORRES, R. P.; AZEREDO, H. M. C.; ALVES, R. E.; MANCINI-FILHO, F. Propriedades antioxidantes em subproduto do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale L.*): efeito sobre a lipoperoxidação e o perfil de ácidos graxos poliinsaturados em ratos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 4, 2008.

CAMILLO, G.; VOGEL, F. F.; SANGIONE, L. A.; CANDORE, G. C.; FERRARI, R. Eficiência *in vitro* de acaricidas sobre carrapatos de bovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.39, n.2, p.490-495, 2009. CARAMORI,

S. S.; LIMA, C. S.; FERNANDES, K. F. Biochemical characterization of selected plant species from Brazilian Savannas. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 2, p. 253-259, 2004.

COSTA, L.C.B.; CORRÊA, R.M.; CARDOSO, J.C.W.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; FERRI, P.H. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. **Horticultura Brasileira**, v.23, n.4, p.956-959, 2005.

DUARTE, M. R.; ZANETI, C. C. Estudo farmacobotânico de folhas de capim-limão: *Cymbopogon citratus* (DC.) STAPP, POACEAE. **Visão Acadêmica Curitiba**, v. 5, n. 2, p. 117-124, 2004.

DINARDI, S. W.; BECHARA, G. H.; OLIVEIRA, P. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. *Azadirachta indica* A. Juss (neem) induced morphological changes on oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick females. **Experimental Parasitology**, v.126, n. 10 p. 462–470, 2010.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISAS AGROPECUÁRIAS (EMBRAPA). **Cultivo do Cajueiro**. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Caju/CultivodoCajueiro/>> Acesso em: 25 nov. 2015.

FUMAGALI, E.; GOLÇALVES, R. A. C.; SILVA, M. F. P.; VIDOTI, G. J.; OLIVEIRA, A. J. B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.10, p 627-641. 2008.

GIGLIOTI, R.; FORIM, M. R.; OLIVEIRA, H. N.; CHAGAS, A. C. S.; FERREZINI, J.; BRITO, L. G. FALCOSKI, T. O. R. S.; ALBUQUERQUE, L. G.; OLIVEIRA, M. C. S. *In vitro* acaricidal activity of neem (*Azadirachta indica*) seed extracts with known azadirachtin concentrations against *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v.18, n. 3, p.309– 315, 2011.

GOMES, L. P.; OLIVEIRA, C. I. R.; SILVA, M. C.; ANDRADE, C. T.; AGUILA, E. M.; SILVA, J. T.; PASCHOALIN, V. M. F. Purificação e caracterização da quitinase de uva (*Vitis vinifera* L. cv Red globe) para a produção de quitosana a partir de quitina de camarão. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1882-1886, 2010.

KLAFKE, G.M; CASTRO-JANER, E.; MENDES, M.C.; NAMINDOME, A.; SCHUMAKER, T.T.S. Applicability of in vitro bioassays for the diagnosis of ivermectin resistance in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v.184, n.9, p.212-220, 2012.

LANDAU, S.Y.; PROVENZA, F. D.; GARDNER, D. R.; PFISTER, J. A.; KNOPPEL, E. L.; PETERSON, C.; KABABYA, D.; NEEDHAM, G. R.; VILLALBA, J. J. Neem-tree (*Azadirachta indica* Juss.) extract as a feed additive against the American dog tick (*Dermacentor variabilis*) in sheep (*Ovis aries*). **Veterinary Parasitology**, v.165, p. 311-317, 2009.

LIU, Z.; JIAO, Y.; WANG, Y.; ZHOU, C.; ZHANG, Z. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.7, p. 1650-1662, 2008.

LUCENA, G. L.; SILVA, A. G.; HONÓRIO, L. M. C., SANTOS, V. D. Remoção de corantes têxteis a partir de soluções aquosas por quitosana modificada com tioacetamida. **Ambi-Agua**, Taubaté, v. 8, n. 1, p. 144-154, 2013. (<http://dx.doi.org/10.4136/ambi-agua.973>)

MENEGUCCI, J. S.; SANTOS, M. K.M M. S.; DIAS, D. J. S.; CHAKER, J.; SOUSA, M. H. One-step synthesis of magnetic chitosan for controlled release of 5-hydroxytryptophan. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v.6, p. 1-8, 2014.

MONTEIRO, J. R.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L. Taninos: Uma abordagem da química á ecologia. **Química Nova**, Vol. 28, No. 5, 892-896, 2005.

NETO, S. F., & TOLEDO-PINTO, E. A. Análise da eficiência de carrapaticidas contra *Boophilus microplus* em gado leiteiro. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 3, p. 1-7, 2006.

NOLAN, J., WILSON, J.T., GREEN, P.E., BIRD, P.E. Synthetic pyrethroid resistance in field samples in the cattle tick (*Boophilus microplus*). **Aust.Vet**, v.66, p. 179–182, 1989.

PANSERA, M. R.; SANTOS, A. C. A.; PAESE, K.; WASUM, R.; ROSSATO, M.; ROTA, L. D.; PAULETTI, G. F.; SERAFINI, L. A. Analise de taninos taotais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no Nordeste do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, n.17-22, 2003

RECK, J.; KLAFKE, G. M.; WEBSTER, A.; SCHEFFER, B. D.A; SOUZA, U. A. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: A field tick population resistant to six classes of acaricides. **Veterinary Parasitology**, v.1, p. 128- 136, 2014.

SILVA, C. B.; GUTERRES, S. S.; WEISHEIMER, V.; SCHAPOVAL, E. E. S. Antifungal Activity of the Lemongrass Oil and Citral Against *Candida* spp. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 1, p. 63-66, 2008.

ROCHA, W. S.; LOPES, R. M.; SILVA, D. B.; VIERA, R. F.; SILVA, J. P.; AGNOSTINI-COSTA, T. S. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 4, p. 1215-1221, 2011.

SILVA, H. C.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v.29, n. 4, p.776-785, 2006.

SOUSA. L. A. D.; SOARES, S. F.; FERRI, P. H.; BORGES, L. M. F. Avaliação da eficácia de extratos oleosos de frutos verdes e maduros de cinamomo (*Melia azedarach*)

sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI: IXODIDAE). **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 17, n.1, p. 36-40, 2008.

SOUSA, L. A. D.; JÚNIOR, H. B. P.; SOARES, S. F.; FERRI, P. H.; RIBAS, P.; LIMA, E. M.; FURLONG, J.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; PERINOTTO, W. M. S.; BORGES, L. M. F. Potential synergistic effect of *Melia azedarach* fruit extract and *Beauveria bassiana* in the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in cattle infestations. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 10, p. 320- 324, 2011.

VALENTE, M.; BARRANCO, A.; SELLAIVE-VILLAROEL, A. B. Eficácia do extrato aquoso de *Azadiracta indica* no controle de *Boophilus microplus* em bovino. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.59, n.5, p.1341-1343, 2007

WEBSTER, A. MERRILL, D. GRANT, H. D. Metal complexation of chitosan and its glutaraldehyde cross-linked derivative. **Carbohydrate reaserch**, v. 342, p. 1189–1201, 2007.

ZAMAN, M. A.; IQBAL, Z.; ABBAS, R. Z.; KHAN, M. N.; MUHAMMAD, G.; YOUNUS,. M.; AHMED, S. In vitro and in vivo acaricidal activity of a herbal extract. **Veterinary Parasitology**, v.5, p.431-436, 2012.

ZOUBIRI, S.; BAALIOUAMER, A. Potentiality of plants as source of insecticide principles. **Journal of Saudi Chemical Society**, 2011.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo do trabalho foi produzir nanopartículas de quitosana para o estudo da liberação controlada de extratos seis vegetais do cerrado para o controle do ácaro *R. microplus*.

2.2 Objetivos específicos

- Produzir nanopartículas de quitosana ativadas como material ancorante.
- Caracterizar grupos funcionais com atividade eletrônica ancorante por Infravermelho por transformada de Fourier FTIR;
- Realizar estudos morfológicos através da técnica de Microscópio eletrônico de varredura MEV;
- Realizar titulação condutimétrica para verificar a melhor faixa de pH para o ancoramento e para liberação controlada;
- Realizar testes da capacidade ancorante das nanopartículas ativadas com os extratos solúveis;
- Realizar testes de liberação controlada dos extrativos solúveis dos fitoterápicos por titulação condutimétrica;

- Avaliar a bioatividade de cada espécie em estudo no controle de *R. microplus* nas nanopartículas de quitosana;
- Avaliar a aplicação do extrato vegetal de cada espécie em estudo no controle de *R. microplus in vitro*.
- Avaliar estatisticamente os dados das mortes dos carrapatos pelos testes *in vitro*.

CAPÍTULO I

(Normas de acordo com a revista African Journal of Biotechnology)

Avaliação da aplicação de nanopartículas poliméricas para a liberação controlada do extrato etanólico das folhas de guapeva (*Pouteria gardneriana* Radlk) no controle do *Rhipicephalus microplus in vitro*

Resumo: O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação acaricida do extrato etanólico da espécie *Pouteria gardneriana* Radlk no controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*. Além da avaliação da nanoesfera de quitosana na adsorção e liberação do extrato como proposta de melhorar o perfil fitoterápico do carrapaticida. O extrato etanólico foi obtido por extração a frio das folhas secas desta planta. Nanoesferas de quitosana foram obtidas pelo método de inversão de fases. Análises de titulação condutimétrica, UV-Vis e FTIR foram conduzidas com os materiais para avaliação da capacidade ancorante da quitosana. Na experimentação *in vitro*, utilizou-se fêmeas ingurgitadas para cada tratamento, que consistiu no controle, extrato bruto e três tratamentos com as concentrações crescentes de 0,2; 0,4 e 1%. Verificou-se a eficácia do produto orgânico para a concentração 0,4%, observando redução na massa dos ovos em comparação ao grupo controle. O nanomaterial mostrou ser capaz de ancorar e liberar a carrapaticida de forma gradativa em regiões de pH entre 5 e 6, tornando viável para aplicação em bovinos, prolongando o tempo de exposição entre o ácaro e o acaricida.

Palavras-chave: liberação controlada, extrato de guapeva e controle do carrapato.

Evaluation of polymeric nanoparticles application for controlled release of ethanol extract from guapeva leaves (*Pouteria gardneriana* Radlk) in *Rhipicephalus microplus in vitro* control

Abstract: The objective of this study was to evaluate the ethanol extract acaricide action from *gardneriana* *Pouteria* Radlk specie in the *Rhipicephalus Microplus* tick control. As well as the to chitosan nanosphere evaluation on the extract adsorption and release, as a proposal to raise the acaricide phytotherapeutic profile. The ethanol extract was obtained by cool extraction from this plant dried leaves. Chitosan nanospheres were obtained by the phase inversion method. Conductometric titration, UV-Vis and FTIR analysis were conducted with the materials to evaluate the chitosan anchoring ability. In the *In vitro* test was used engorged females for each treatment, which consisted of the control, raw extract and three treatments with increasing concentrations of 0.2; 0.4 and 1%. It was found the organic product effectiveness for 0.4% concentration by observing reduction in the eggs mass compared to control group. The nanomaterial proved to be able to anchor and release the insecticide gradually in pH between 5 and 6 regions, which makes it feasible for use in cattle, prolonging the exposure time between the mite and acaricide.

Key words: controlled release, guapeva extract, tick control.

3.1 Introdução

O carrapato *R. microplus* é considerado o principal parasita de bovinos e responsável pela diminuição da produtividade, acarretando em prejuízos estimados em 2 bilhões de dólares por ano. O parasitismo deste pode comprometer tanto a qualidade como produção da carne e do leite pela inoculação de toxinas nos hospedeiros, transmissão de doenças e prejuízos relacionados ao controle deste ácaro (MORAIS-URANO et al., 2012).

A maioria dos carrapatos, aproximadamente 95% da população, está presentes na vegetação, na qual se encontram as fêmeas ingurgitadas em postura, ovos em incubação e larvas esperando o hospedeiro durante essa fase de vida livre. Apenas 5% estão parasitando os bovinos (larvas, ninfas e adultos). Porém a maioria dos estudos e tratamentos de controle estão direcionados para esses 5%, pois se trata do estágio que

causa os prejuízos diretos (espoliação sanguínea e suas consequências) e indiretos (complexo Tristeza Parasitária Bovina) aos bovinos (NETO et al., 2006).

O uso de acaricidas químicos constitui o principal instrumento no controle do carrapato. No Brasil, destacam-se seis classes principais de ixodicidas, apresentando os grupos e os princípios ativos comercializados. Porém a utilização inadequada dos mesmos tem gerado resistência nas cepas, podendo ser explicada pela seleção e recombinações de genes resistentes em populações de carrapatos expostas a pressões de seleção por carrapaticidas (HOCAYEN & PIMENTA 2013).

A demanda dos consumidores por carne e leite livre de resíduos químicos e a busca por novas moléculas que apresentam toxicidade adequada para o controle do carrapato, são razões para o aumento do interesse em espécies de plantas que possuem potencial bioativo. Nesse contexto extratos vegetais de algumas espécies do cerrado brasileiro são alvos de pesquisa (HOCAYEN & PIMENTA 2013).

A guapeva é uma árvore de grande porte pertencente á família das Sapotáceas e ao gênero *Pouteria*. Os metabólitos secundários mais abundantes nesta espécie são os compostos fenólicos, destacando-se os taninos. Sabe-se que os taninos são moléculas muito reativas e que apresentam atividade toxicológica para algumas espécies de insetos, assim tornando-a interessante para o estudo e verificação da atividade do extrato das folhas no controle do *R. microplus* (MONTEIRO et al., 2005).

O acaricida orgânico apresenta muitas vantagens, pois possui baixa toxicidade, não deixa resíduos na carne e no leite, sua fonte é renovável, além de ser considerado biodegradável (AGNOLIN et al., 2014). Contudo os produtos fitoterápicos podem melhorar o perfil de eficácia por prolongar seu tempo de ação sobre o animal. Neste contexto a utilização de materiais poliméricos que tenham a capacidade de adsorver e liberar o princípio ativo de maneira controlada pode aumentar a eficácia do produto (SAHA et al., 2013).

A quitosana é um biopolímero obtido pela reação da desacetilação da quitina, o segundo polímero natural mais abundante na natureza. Esse polímero possui propriedades bioquímicas e físico-químicas, considerado biodegradável, biocompatível, não tóxico além de ser um produto de baixo custo. Apresenta várias aplicações tais como na adsorção de íons, na indústria farmacêutica e alimentícia, precursor para obter moléculas funcionalizadas, remoção de metais pesados e corantes de afluentes, entre outras aplicações (WITT et al., 2010).

Considerando o potencial bioativo de algumas espécies do cerrado brasileiro, a atividade toxicológica do grupo dos taninos e a presença destes na espécie *Pouteria gardneriana* Radlk, o objetivo deste trabalho foi verificar a eficácia do extrato etanólico das folhas desta planta juntamente com a tecnologia da liberação controlada pela superfície da nanopartícula de quitosana.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Produção de nanoesferas

Preparou-se uma solução de quitosana a 5% (V/V) de ácido acético. A mistura formada ficou sob agitação até total homogeneização da solução. Preparou-se uma solução de NaOH a 10% em 100 mL. Padronizou-se a solução obtendo um fator de correção de 0,995. Introduziu-se a solução de quitosana em um sistema “spray drying” em que a amostra passou por um nebulizador para a formação de um aerossol a qual foi gelificada na forma de nanoesferas de quitosana. Após a obtenção das nanoesferas, as mesmas foram lavadas até alcançar pH 7. Posteriormente ficaram expostas à temperatura ambiente para a secagem (DIAS et al., 2008). Este método é conhecido como inversão de fases.

3.2.2 Produção do extrato vegetal

3.2.2.1 Coleta de folhas vegetais

Coletou-se as folhas da *P. gardneriana* no Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde – GO, (17° 48’ 16” S, 50° 54’ 19” W, 749 m altitude). Após a coleta as folhas foram separadas de seu caule e pesadas. Após a pesagem foram distribuídas em sacos de papel e colocadas em estufa com circulação forçada de ar a temperatura de até 40°C até secagem. O peso dos sacos de papel foi verificado diariamente até que o peso das mesmas permanecesse constante. As folhas secas obtidas foram trituradas em moinho de 4 facas até a obtenção de um pó fino para facilitar a extração.

3.2.2.2 Extração

Com as folhas secas e trituradas iniciou o processo de extração. Essas foram maceradas em 1,5 L de etanol em erlenmeyer contendo cerca de 300 g de massa vegetal. A cada 3 dias o solvente era substituído para alcançar maior extração. Este processo se

repetiu até que o solvente ficasse translúcido. O solvente foi volatilizado em evaporador rotatório, obtendo o EBS (extrato bruto seco).

3.2.3 Ancoramento e titulação condutimétrica

Para o ancoramento do extrato bruto na superfície das nanoesferas de quitosana utilizou-se 0,5g de nanoesfera e 1,0g de extrato bruto. Preparou-se a solução a 5% (V/V) de ácido clorídrico em 10 mL. Além das nanoesferas e extrato, adicionou-se 60 mL de água destilada na solução. Todo o sistema ficou sob agitação por 24 horas.

Utilizou-se um condutivímetro e um pHmetro para verificar a condutividade e pH do sistema antes e durante a titulação. A titulação foi iniciada quando atingido pH 2, então foram adicionadas pequenas quantidades (μL) de NaOH de forma gradativa no sistema. A medida que o pH e condutividade sofriam variações, retirava-se alíquotas a cada alteração na condutividade para análise posterior no espectrômetro no ultravioleta visível (UV-Vis) e no espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Todo procedimento foi realizado em triplicata.

3.2.4. Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As análises no FTIR Frontier Mid/Nir foram realizadas concomitantes a coleta das alíquotas durante a titulação. Observou-se a relação entre transmitância e comprimento de onda nos espectros. Para fins comparativos, analisou-se tanto as alíquotas quanto o extrato e a solução de quitosana a 5% e se observou o deslocamento das bandas energéticas.

3.2.5 Ultravioleta na Região visível (UV-Vis)

Durante as titulações condutimétricas, as alíquotas foram coletadas nos pontos de maior variação de condutividade e analisadas separadamente no UV-Vis PerkinElmer lambda 750 na qual se fez varredura completa do espectro (200 - 1000nm) para obter gradientes de absorbância das amostras. Para realizar as análises, utilizou-se 200 microlitros de cada amostra diluídos em 4 mL de etanol.

3.2.6 Análises por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para determinação morfológica das nanopartículas, realizou análise por MEV através do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), Jeol, JSM – 6610, equipado

com EDS, Thermo scientific NSS Spectral Imaging, utilizando metalizador BalTec SCD 050.

3.2.7 Teste *in vitro*

Para a experimentação *in vitro*, coletou-se teleóginas de *R. Microplus*, em bovinos naturalmente infestados, em uma fazenda nas proximidades do município de Rio Verde, Goiás. No laboratório, as mesmas foram lavadas, secas e separadas em cinco grupos. O estudo foi constituído de cinco tratamentos, sendo que o grupo I correspondeu ao grupo controle (etanol), grupo II correspondeu ao extrato bruto e os grupos III a V constituíram os grupos nos quais o extrato bruto foi diluído em etanol nas concentrações de 0,2; 0,4 e 1%. Para os tratamentos de III a V adicionou-se 0,5 gramas de nanoesfera de quitosana, cuja solução ficou sob agitação por 24 horas antes de iniciar os testes, para avaliação da capacidade ancorante e de liberação controlada do extrato pelas moléculas de quitosana.

As teleóginas foram imersas em 20 mL das soluções correspondentes a cada tratamento por cinco minutos. Após a imersão, as teleóginas foram secas em papel toalha e fixadas através de fita adesiva em placas de Petri, previamente identificadas. Seis teleóginas para todos os grupos, sendo realizado em triplicata. A seguir, estas foram levadas à estufa climatizada (27°C, UR>80%) por 14 dias. Após o período de postura, os ovos de cada teleógina foram transferidos separadamente para seringas com os bicos cortados, vedados com algodão, sendo, novamente, encaminhadas para a estufa e foram mantidas por 26 dias, para observação de eclosão dos ovos.

As avaliações foram realizadas em triplicata e os resultados são apresentados utilizando-se das médias. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.3 Resultados e Discussão

A radiação infravermelha quando absorvida por moléculas se converte em energia de vibração molecular. O espectro reflete o movimento vibracional e geralmente se apresenta em formas de bandas. A intensidade da banda é medida pela transmitância, sendo essa a razão da energia transmitida pela energia incidente. Quando as moléculas sofrem mudanças na sua estrutura, no caso, adsorção de moléculas vizinhas por sítios ativos, o espectro passa a ter características diferentes. Ocorre o deslocamento de

bandas, aumento de densidade eletrônica nos grupos, aumento nos picos de estiramento até o surgimento de novas bandas (ARAGÃO et al., 2008).

Nas Figuras 1 e 2, podem ser observados os espectros das nanopartículas de quitosana e o do extrato de guapeva. Observa-se bandas e picos de estiramento para a quitosana nas regiões de 3362 cm^{-1} e 1024 cm^{-1} , tais regiões correspondem deformação angular da ligação N-H, O-H e estiramento C-O. Observa-se na Figura 2 bandas e picos de deformação nas regiões de 3338 e 1046 cm^{-1} , compreendendo alguns funções orgânicas, por exemplo, grupos aromáticos, álcoois, fenóis, enóis e ácido carboxílico. O que pode ser explicado pelo constituinte principal da guapeva, os taninos, que apresentam anéis aromáticos com seus substituintes, principalmente os hidroxílicos.

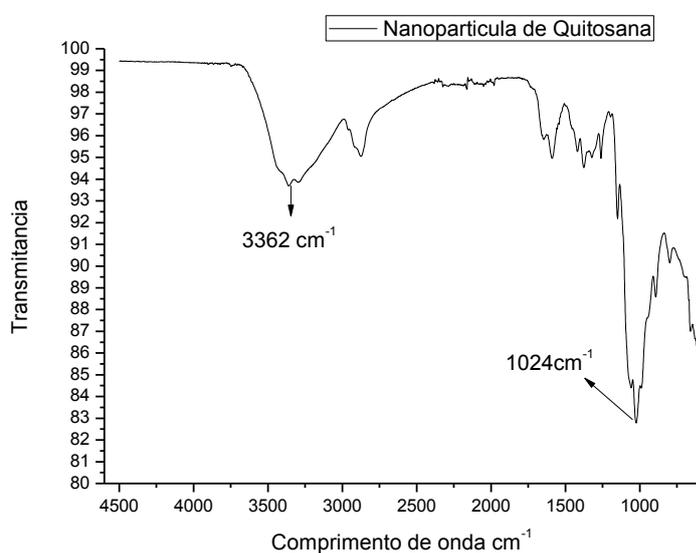


Figura1. Espectro da nanopartícula de quitosana no FTIR.

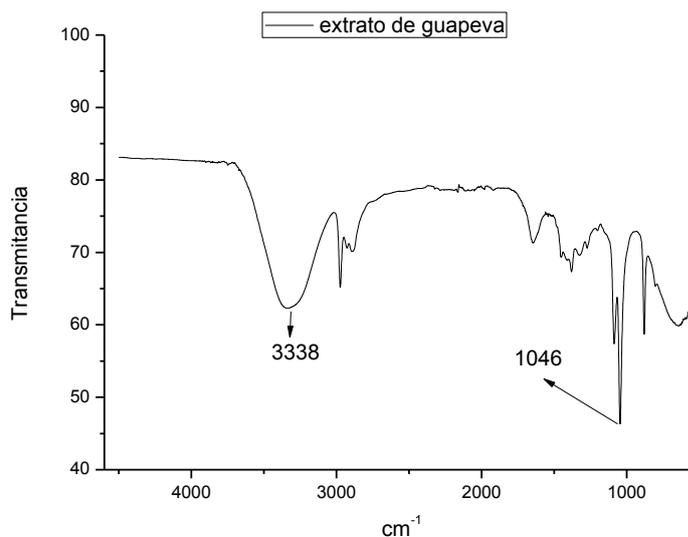


Figura 2. Espectro do extrato de guapeva no FTIR.

Em comparação com as figuras mencionadas, a Figura 3 demonstra o espectro do extrato ancorado em nanopartícula de quitosana. As bandas das regiões 3362 e 3338 cm⁻¹, da quitosana e do extrato, respectivamente, sofrem deslocamento, evidenciado pelo surgimento de uma nova banda na região 3353 cm⁻¹. Com relação aos picos de estiramento, observa-se que na região 1044 cm⁻¹ da Figura 3 ocorreu aumento na densidade eletrônica, aumento no pico de estiramento e consequentemente diminuição na intensidade de transmitância pelas interações ocorridas na superfície do polímero e nas moléculas presentes no extrato.

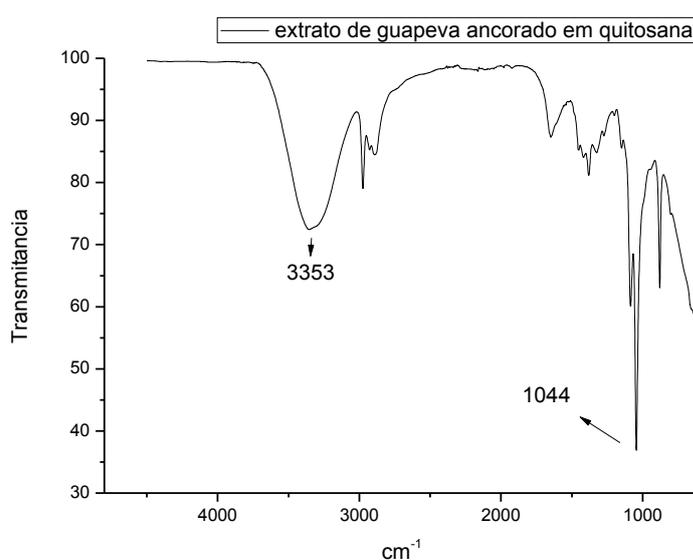


Figura 3. Espectro do extrato ancorado em quitosana no FTIR.

Além disso, a partir das análises de infravermelho realizadas com as alíquotas coletadas durante a titulação condutimétrica, percebe-se que as bandas do infravermelho são deslocadas. Picos característicos nas regiões de 3500, 1600 e 1000 sofrem aumento e diminuição na intensidade de transmitância por causa das interações ocorridas na superfície do polímero e as moléculas do extrato. Percebe-se maior densidade eletrônica para espectros que estavam em pH mais próximos do neutro, por exemplo, no pH 5,13 e 5,68. A densidade eletrônica está atrelada a liberação do composto orgânico pela matriz polimérica. As análises de FTIR justificam o surgimento de outros picos encontrados nas análises de UV-Vis, pois, as interações ocorridas durante o processo de liberação promovem a formação de espectros diferentes dos iniciais, antes do processo de titulação condutimétrica.

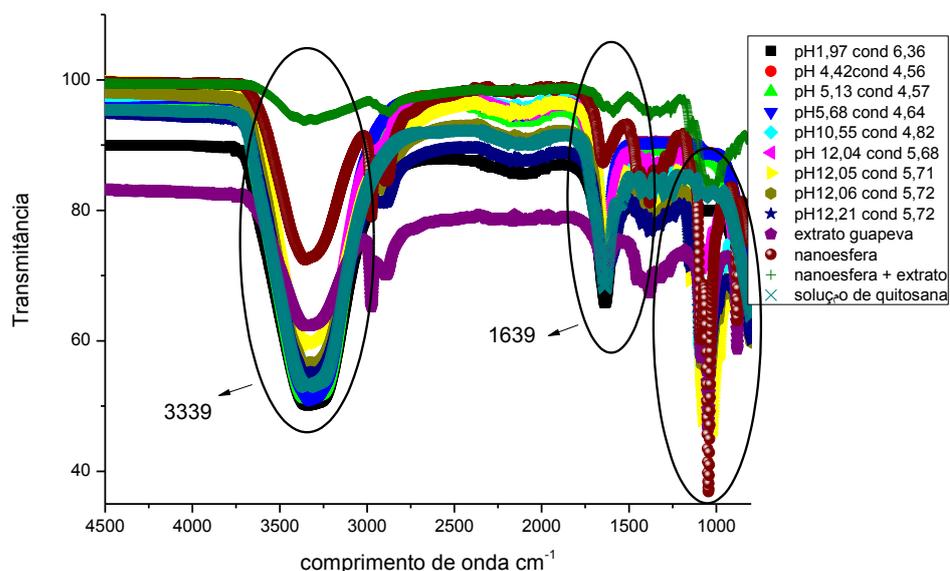


Figura4. Espectro de infravermelho dos pontos da variação de condutividade obtidos da titulação condutimétrica

Estudos realizados por Baroni et al. (2007) mostraram o mesmo comportamento para espectros de infravermelho da quitosana modificado com os reagentes glutaraldeído e epiclorigrina adsorvendo os íons de cromo. Os autores demonstram

modificações no espectro após a adsorção dos íons, concluindo que a adsorção deste afeta as ligações do grupo amino, sendo os átomos de nitrogênio os principais sítios de adsorção para os íons (BARONI et al., 2007).

Durante o processo de titulação, a condutividade da solução alterava de acordo com o volume de NaOH adicionado. Para maiores alterações, alíquotas foram coletadas e analisadas no UV-Vis. Dependendo do pH, o comportamento dos espectros alisados tomavam outra forma. O surgimento de picos é evidenciado na Figura 5, além do aumento da intensidade das bandas de absorbância UV de acordo com o pH da solução.

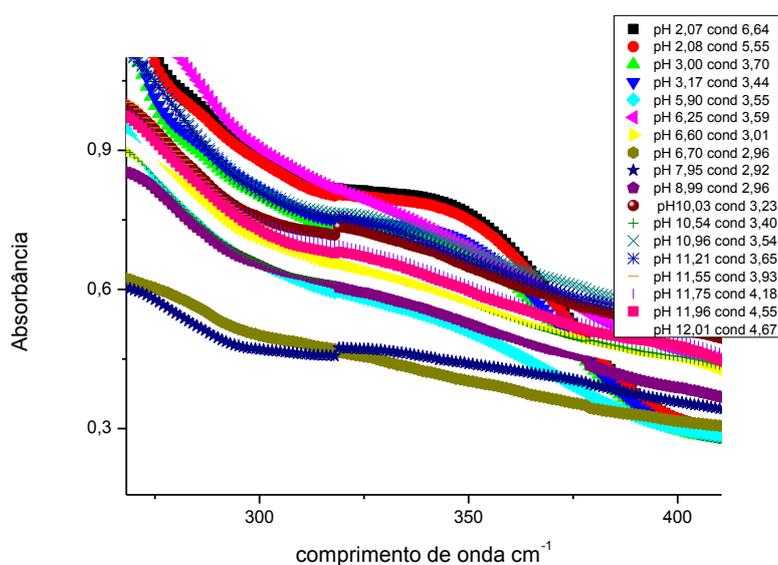


Figura 5. Curvas de titulação condutimétrica.

Na mesma figura é possível observar que os picos de absorbância chegaram a 0,80 e 0,79 em 331 cm^{-1} para o pH de 2,07 e 2,08, respectivamente. Isso corrobora com o fato de que em meio ácido a quitosana está mais protonada, e por meio dos maiores picos de absorbância observados no gráfico, afirma-se que a concentração de extrato adsorvido é maior. A protonação e desprotonação do grupo amina pela molécula de quitosana são responsáveis pela condutividade eletrônica da solução. Além disso, a maior ou menor concentração de extrato no meio é evidenciada pela diferença na condutividade.

Em contrapartida, observa-se diminuição da intensidade do pico em 300 cm^{-1} , quando a solução apresenta pH 6,70 e 7,95, sendo os valores de absorbância encontrado de 0,50 e 0,47, respectivamente. Outro pico notório para observação está o pH 6,25, neste ponto há aumento no pico de absorbância, inferindo assim no equilíbrio iônico da

solução, havendo maior concentração de extrato neste meio. A medida que a solução se torna mais alcalina a tendência do meio é ocorrer a desprotonação do grupo amina, assim liberando o material adsorvido. Quanto maior for a troca iônica da solução maior será a condutividade desta, isso ocorre naturalmente pela reação de neutralização ácido-base, porém com a adsorção do extrato pela superfície do polímero, a condutividade do meio aumenta e diminui, por consequência dos efeitos de adsorção e liberação do princípio ativo.

A relação entre condutividade e pH é demonstrada pelo gráfico a seguir (Figura 6). Observa-se que a condutividade da solução diminui, pelo fato do H^+ da solução ainda em pH ácido, está sendo consumido pelo OH^- da base, que, está sendo adicionada, porém, na faixa de pH entre 4,5 e 5, há aumento significativo da condutividade, que poderia ser explicado, pela liberação da molécula do extrato da superfície do biopolímero.

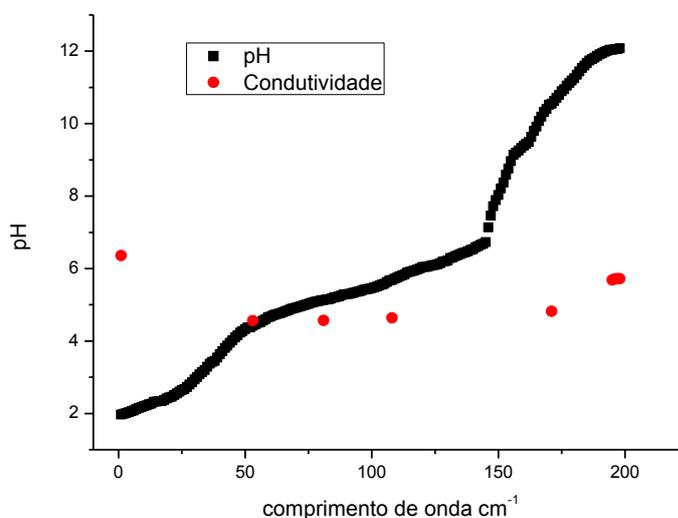


Figura 6. pH e condutividade da solução durante a titulação condutimétrica.

As imagens realizadas por MEV demonstram que a metodologia utilizada para produção de nanopartículas foi eficiente, apresentando uniformidade no tamanho das partículas, com cerca de 589 nm, conforme Figura 7.

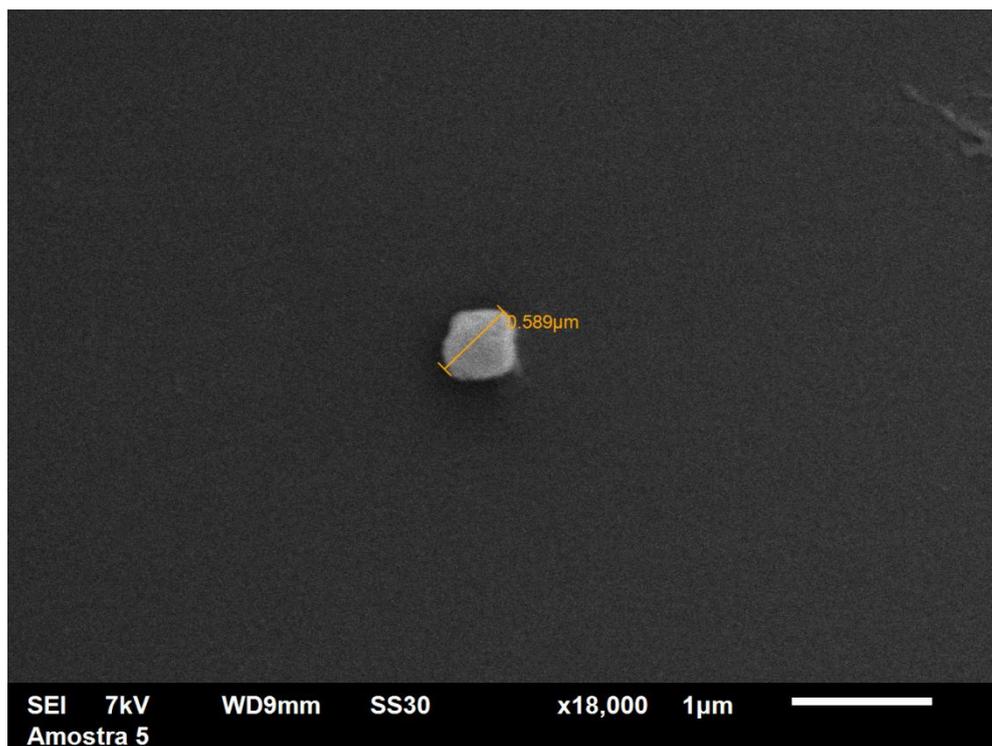


Figura 7: Nanopartícula produzida a partir de sistema de Spray-dry pelo método de gelificação em NaOH.

A determinação da toxicidade dos extratos, associada à liberação controlada realizada pelas nanopartículas, foi determinada através da contagem de mortes dos carrapatos em diferentes concentrações do extrato ancorado nas nanopartículas.

Observou-se que para o tratamento do extrato bruto ocorreu 100% de morte para todos os indivíduos, ou seja, na maior concentração, o extrato de guapeva age como carrapaticida eficiente.

Após 14 dias do início do bioensaio, os ovos da ovopostura foram coletados e pesados separadamente. É possível notar que a redução das massas dos ovos está associada à concentração utilizada no preparo dos tratamentos. O gráfico abaixo (Figura 8) relaciona a redução nas massas dos ovos e os tratamentos utilizados. Com exceção do tratamento 2 (extrato bruto), o tratamento 4, 0,4%, proporcionou maior porcentagem de redução da massa dos ovos.

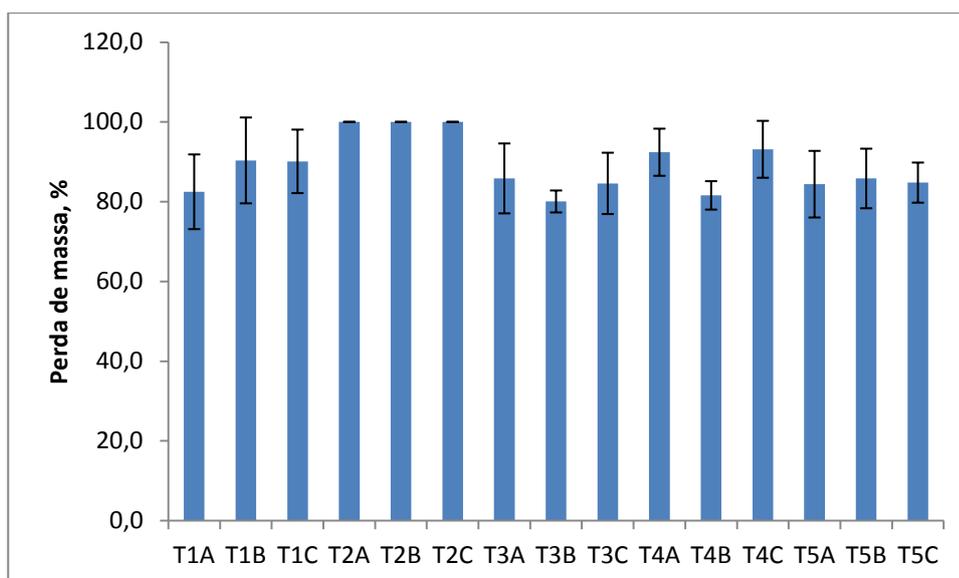


Figura 8: Representação da taxa de redução em porcentagem das massas dos ovos após 14 dias do início do tratamento. Barras obtidas através da média de cada população, realizado em triplicata para cada tratamento.

A Figura 9 representa a ovopostura para os diversos tratamentos. É notória a redução de massa dos ovos após a submissão ao tratamento contendo 0,4% de extrato em comparação com o controle, isto corrobora com os resultados do teste estatístico realizado, na qual apontou para a eficácia deste produto. Além disso, a morte para todos os indivíduos está representado Figura 9-2, entende-se que nesta concentração as moléculas ativas do extrato inibem totalmente o ciclo do parasita, porem a utilização deste se torna inviável por causa da quantidade de matéria-prima utilizada na sua produção.

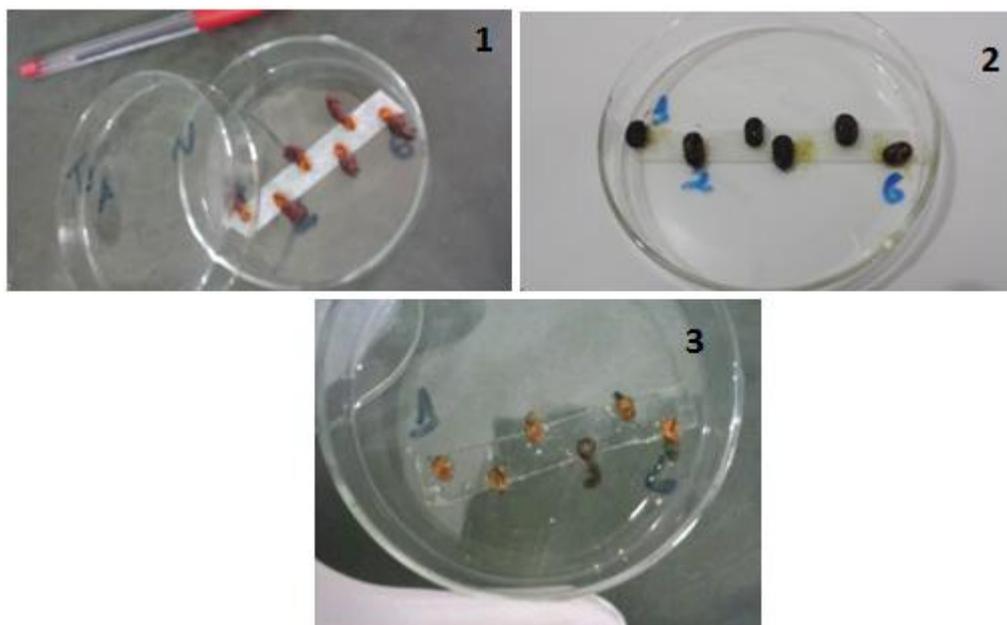


Figura 9: Ovopostura para o tratamento controle, extrato bruto e concentração de 0,4% após 14 dias do início do bioensaio.

Através dos resultados obtidos, foi possível determinar que na concentração de 0,4% do extrato, a redução na massa dos ovos dos carrapatos, associado ao número de mortes e a não ovopostura foi significativo pelo teste de Tukey a 5%, que comprovou a eficiência da técnica de liberação controlada do extrato da *P. guarneriana*.

3.4. Conclusão

A metodologia de Spray-drying é eficiente na produção de partículas em escala nanométrica.

A aplicabilidade da quitosana como material ancorante e no estudo de liberação controlada se mostrou eficaz. Os resultados obtidos demonstraram a eficiência deste biopolímero em ancorar o extrato da *P. guarneriana*.

Na faixa de pH 5 a 6 houve maior liberação de extrato, promovendo a liberação lenta do princípio ativo, aumentando o tempo de exposição entre o ácaro e o acaricida.

Os testes *in vitro* realizados com os cinco tratamentos diferentes apontaram para a eficácia do produto orgânico. Quando utilizado o extrato bruto, todos os indivíduos morreram antes de ocorrer a desova. Para os tratamentos diluídos a medida que a concentração aumentava a massa dos ovos da desova diminuía, assim na concentração

de 0,4%, tratamento 4, os resultados obtidos foram considerados significativos pelo teste de Tukey a 5%.

3.5 Referências Bibliográficas

AGNOLIN, C.A.; OLIVO, C.J. ; PARRA, C. L. C. Efeito do óleo de capim limão (*Cymbopogon flexuosus* Stapf) no controle do carrapato dos bovinos. **Rev. Bras. Pl. Med., Campinas**, v.16, n.1, p.77-82, 2014.

ARAGÃO, B. J. G.; MESSADDEQ, Y. Peak separation by Derivative Spectroscopy Applied to FTIR Analysis of Hydrolized Silica. **Journal of the Brazilian chemical Society**, v. 19, n. 8, p. 1582-1594, 2010.

AYRES, M. P.; CLAUSEN, T. P.; MACLEAN, S. F.; REDMAN, A. M.; REICHARDT, P. B. Diversity of structure and antiherbivore activity in condensed tannins. **Ecology**, v.78, p. 1696- 1712, 1997.

BARONI, P.; VIERA, R. S.; MENEGHETTI, E.; SILVA, M. G. C.; BEPPU, M. M. Evaluation of batch adsorption of chromium ions on natural and crosslinked chitosan membranes. **Journal of Hazardous Materials**, n. 4, p. 1-9, 2007.

DIAS, F. S.; QUEIROZ, D. C. Um sistema simples para preparação de microesferas de quitosana. **Química Nova**, v.31, n. 1, p.160-163, 2008.

HOCAYEN, P.A.S.; PIMENTA, D.S. Extrato de plantas medicinais como carrapaticida de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Rev. Bras. Pl. Med., Campinas**, v.15, n.4, supl.I, p.627-631, 2013.

MONTEIRO, J. R.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L. Taninos: Uma abordagem da química á ecologia. **Química Nova**, Vol. 28, No. 5, 892-896, 2005.

MORAIS-URANO, R. P.; CHAGAS, A. C. S.; BERLINCK, R. G. S. A. Acaricidal action of destruxins produced by a marine-derived *Beauveria felina* on the bovine tick

Rhipicephalus (Boophilus) microplus. **Experimental Parasitology**, v.132, n.8, p.632-366, 2012.

NETO, S. F., & TOLEDO-PINTO, E. A. Análise da eficiência de carrapaticidas contra *Boophilus microplus* em gado leiteiro. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 3, p. 1-7, 2006.

ROCHA, W. S.; LOPES, R. M.; SILVA, D. B.; VIERA, R. F.; SILVA, J. P.; AGNOSTINI-COSTA, T. S. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 4, p. 1215-1221, 2011.

SAHA, A. K.; RAY, S. D. Effect of cross-linked biodegradable polymers on sustained release of sodium diclofenac-loaded microspheres. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 4, 2013.

WITT, M. A.; BARRA, G. M. O.; BERTOLINO, J. R.; PIRES, A. T. N. Crosslinked Chitosan/Poly(Vinyl Alcohol) Blends with Proton Conductivity Characteristic. **Journal of the Brazilian chemical Society**, v. 21, n. 9, p.1692-1698, 2010.

CAPÍTULO II

(De acordo com as normas da revista African Journal of Biotechnology)

Controle de *Rhipicephalus microplus* por acaricida orgânico a partir das folhas de *Melia azedarach* ancorado em nanoesfera de quitosona

Resumo: O controle do carrapato *Rhipicephalus microplus* é realizado principalmente por produtos químicos, porém a utilização de acaricidas orgânicos apresentam vantagens superiores em relação os produtos convencionais. Plantas nativas do cerrado brasileiro são conhecidas por seu potencial bioativo, devido a esse fato, o objetivo deste trabalho foi avaliar ação acaricida de uma espécie nativa do cerrado, *Melia azedarach*, conhecida por Santa Bárbara no controle do ácaro. Além da avaliação da nanoesfera de quitosana na adsorção e liberação do extrato como proposta de melhorar o perfil fitoterápico do carrapaticida. O extrato etanólico foi obtido por extração a frio das folhas secas desta planta. Nanoesferas de quitosana foram obtidas pelo método de inversão de fases. Análises de titulação condutimétrica, UV-Vis e FTIR foram conduzidas com os materiais para avaliação da capacidade ancorante da quitosana. Na experimentação *in vitro*, utilizou-se fêmeas ingurgitadas para cada tratamento, que consistiu no controle, extrato bruto e três tratamentos com as concentrações crescentes de 0,2; 0,4 e 1%. Verificou-se a eficácia do produto orgânico para a concentração 0,2%, observando redução na massa dos ovos em comparação com ao grupo controle. O nanomaterial se mostrou capaz de ancorar e liberar a carrapaticida de forma gradativa em regiões de pH entre 6 e 7, tornando viável para aplicação em bovinos, prolongando o tempo de exposição entre o ácaro e o acaricida.

Palavras-chave: acaricida orgânico, *Melia azedarach*, quitosana.

***Rhipicephalus microplus* control by organic acaricide from *Melia azedarach* leaves anchored on chitosan nanosphere**

Abstract: The *Rhipicephalus microplus* tick control is mainly performed by chemicals products, but organic acaricides use has higher advantages compared to conventional products. Brazilian cerrado native plants are known for their bioactive potential, due to this fact, the objective of this study was to evaluate the acaricide action of native cerrado specie, *Melia azedarach*, known as Santa Barbara in the mite control. As well as the chitosan nanosphere was evaluated on the extract adsorption and release, as a proposal to raise the acaricide phytotherapeutic profile. The ethanol extract was obtained by cool extraction from this plant dried leaves. Chitosan nanospheres were obtained by the phase inversion method. Conductometric titration, UV-Vis and FTIR analysis were conducted with the materials to evaluate the chitosan anchoring ability. In the *In vitro* test was used engorged females for each treatment, which consisted of the control, raw extract and three treatments with increasing concentrations of 0.2; 0.4 and 1%. It was found the organic product effectiveness for 0.2% concentration by observing reduction in the eggs mass compared to control group. The nanomaterial proved to be able to anchor and release the insecticide gradually in pH between 6 e 7 which makes it feasible for use in cattle, prolonging the exposure time between the mite and acaricide.

Key words: organic acaricide, *Melia azedarach*, chitosan.

4.1 Introdução

O carrapato *Rhipicephalus Microplus* é um ectoparasita hematófago responsável por danos relacionados a pecuária em países localizados nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. No Brasil, muitas raças de bovinos, principalmente as europeias, são susceptíveis ao desenvolvimento das fases parasitárias deste carrapato, e existem ainda variações climáticas muito favoráveis a sobrevivência e desenvolvimento dos seus estágios não parasitários (JÚNIOR e OLIVEIRA 2005).

O controle deste ácaro é realizado principalmente por produtos químicos, administrados por contato ou de forma sistêmica, com o objetivo de combater as fases parasitárias do mesmo. O uso incorreto desses carrapaticidas (práticas individuais de combate, sem aplicar as recomendações baseadas em métodos adequados de manejo dos carrapaticidas) induz a resistência de cepas, o crescimento e fortalecimento dessas aos princípios ativos administrados. Dessa forma, percebe-se a ineficácia de alguns acaricidas químicos, além desses deixarem resíduos na carne e no leite dos hospedeiros (BROGLIO-MICHELETTI 2009).

A necessidade de métodos mais seguros e mais eficazes no combate ao *R. microplus* tem estimulado a busca de novos acaricidas a partir de extratos vegetais. Assim, acredita-se que a utilização de extratos vegetais de forma isolada ou associada a outros métodos de aplicação possa conduzir ao desenvolvimento mais lento de resistência, além da redução de resíduos na e carne e no leite, pois os carrapaticidas botânicos são biodegradáveis (IANNACONE e LAMAS 2002).

Nesse sentido a santa bárbara (*Melia azedarach*) conhecida também como cinamomo é uma árvore de grande porte pertencente a família Meliaceae. A atividade inseticida desta planta foi avaliada em mais de 400 espécies de insetos, nas quais mais de 100 ocorrem no Brasil. A atividade inseticida desta planta é pela presença de compostos biologicamente ativos, os triterpenoides (BRUNHEROTTO et al., 2010).

Testes de imersão de teleóginas e pacote larval realizados com os extratos vegetais a partir das folhas, frutos verdes de maduros desta espécie, demonstraram eficácia no controle do carrapato, pois houve inibição da oviposição e alta taxa de mortalidade para as larvas (SOUSA et al., 2008). Assim esta planta se torna alvo de muitos estudos a cerca de seu potencial bioativo, apresentando variabilidade de compostos químicos que podem causar a morte ou impedir que o ciclo do carrapato ocorra (CHIFFELLE et al., 2009).

Além da aplicação do carrapaticida orgânico, o perfil de um novo acaricida pode ser melhorado com a utilização de tecnologia que promove a liberação controlada do princípio ativo de forma gradativa. Neste contexto, o uso de biopolímeros para este fim é uma proposta atraente, em se tratando de matéria-prima natural, degradável e de baixo custo.

A quitosana é um biopolímero derivado do processo da desacetilação da quitina via hidrólise enzimática ou tratamento alcalino. Considerada um polissacarídeo catiônico em condições de pH neutro ou básico, contém grupamentos amino e

acetoamino, considerada uma molécula muito reativa tornando-a mais suscetível a modificações estruturais. Por causa da estrutura da quitosana, a utilização se torna muito favorável nos estudos de fixação de compostos, além da liberação controlada desses no meio desejado (LIU et al., 2008).

Considerando o potencial bioativo da espécie *Melia azedarach*, o objetivo deste trabalho foi verificar a eficácia do extrato etanólico das folhas desta planta juntamente com a tecnologia da liberação controlada pela superfície da nanopartícula de quitosana.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Produção de nanoesferas

Preparou-se solução de quitosana a 5% (V/V) de ácido acético. A mistura formada ficou sob agitação até total homogeneização da solução. Preparou-se solução de NaOH a 10% em 100 mL. Padronizou-se a solução obtendo um fator de correção de 0,995. Introduziu-se a solução de quitosana em um sistema “spray drying” e a amostra passou por um nebulizador para a formação de aerossol e foi condensada na forma de nanoesferas de quitosana. Após a obtenção das nanoesferas, as mesmas foram lavadas até alcançar pH 7. Posteriormente ficaram expostas a temperatura ambiente para a secagem (DIAS et al., 2008). Este método é conhecido como inversão de fases.

4.2.2 Produção do extrato vegetal

4.2.2.1 Coleta de folhas vegetais

Coletou-se as folhas da *Melia azedarach* no período da manhã nas proximidades do Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde – GO (17° 48’ 16” S, 50° 54’ 19” W, 749 m altitude). Após a coleta as folhas foram separadas de seu caule e pesadas. Após a pesagem foram distribuídas em sacos de papel e colocadas em estufa com circulação forçada de ar a temperatura de até 40°C até secagem das folhas. O peso dos sacos de papel foi verificado diariamente até que o peso das mesmas permanecesse constante. As folhas secas obtidas foram trituradas em moinho de quatro facas até a obtenção de um pó fino para facilitar a extração.

3.2.2.2 Extração

Com as folhas secas e trituradas, iniciou-se o processo de extração. Essas foram maceradas em 1,5 L de etanol em erlenmeyer contendo cerca de 300 g de massa vegetal. A cada 3 dias o solvente era substituído para alcançar maior extração. Este processo se repetiu até que o solvente ficasse translúcido. O solvente foi volatilizado em evaporador rotatório, obtendo-se o EBS (extrato bruto seco).

3.2.3 Ancoramento e titulação condutimétrica

Para o ancoramento do extrato bruto na superfície das nanoesferas de quitosana utilizou-se 0,5g de nanoesfera e 1,0g de extrato bruto. Preparou-se solução a 5% (V/V) de ácido clorídrico em 10 mL. Além das nanoesferas e extrato, adicionou-se 60 mL de água destilada na solução. Todo o sistema ficou sob agitação por 24 horas.

Utilizou-se um condutivimetro e um pHmetro para verificar a condutividade e pH do sistema antes e durante a titulação. A titulação foi iniciada quando atingido pH 2, se adicionou então pequenas quantidades (μL) de NaOH de forma gradativa no sistema. A medida que o pH e condutividade sofriam variações, retirava-se alíquotas a cada alteração na condutividade para análise posterior no espectrômetro no ultravioleta visível (UV-Vis) e no espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Todo procedimento foi realizado em triplicata.

3.2.4. Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As análises no FTIR Frontier Mid/Nir foram realizadas concomitantes a coleta das alíquotas durante a titulação. Observou-se a relação entre transmitância e comprimento de onda nos espectros. Para fins comparativos, analisou-se tanto as alíquotas quanto o extrato e a solução de quitosana a 5% e observou-se o deslocamento das bandas energéticas.

3.2.5 Ultravioleta na Região visível (UV-Vis)

Durante as titulações condutimétricas, as alíquotas foram coletadas nos pontos de maior variação de condutividade e analisadas separadamente no UV-Vis PerkinElmer lambda 750 fazendo varredura completa do espectro (200 - 1000nm) para obter gradientes de absorbância das amostras. Para realizar as análises, utilizou-se 200 microlitros de cada amostra diluídos em 4 mL de etanol.

3.2.6 Análises por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para determinação morfológica das nanopartículas, realizou análise por MEV através do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), Jeol, JSM – 6610, equipado com EDS, Thermo scientific NSS Spectral Imaging, utilizando metalizador BalTec SCD 050.

3.2.7 Teste *in vitro*

Para a experimentação *in vitro*, coletou-se teleóginas de *R. Microplus*, em bovinos naturalmente infestados, em uma fazenda nas proximidades do município de Rio Verde, Goiás. No laboratório, as mesmas foram lavadas, secas e separadas em cinco grupos. O estudo foi constituído de cinco tratamentos, sendo que o grupo I correspondeu ao grupo controle (etanol), grupo II correspondeu ao extrato bruto e os grupos III a V constituíram os grupos nos quais o extrato bruto foi diluído em etanol nas concentrações de 0,2; 0,4 e 1%. Para os tratamentos de III a V adicionou-se 0,5 gramas de nanoesfera de quitosana, cuja solução ficou sob agitação por 24 horas antes de iniciar os testes, para avaliação da capacidade ancorante e de liberação controlada do extrato pelas moléculas de quitosana.

As teleóginas foram imersas em 20 mL das soluções correspondentes a cada tratamento por cinco minutos. Após a imersão, as teleóginas foram secas em papel toalha e fixadas através de fita adesiva em placas de Petri, previamente identificadas. Seis teleóginas para todos os grupos, sendo realizado em triplicata. A seguir, estas foram levadas à estufa climatizada (27°C, UR>80%) por 14 dias. Após o período de postura, os ovos de cada teleóginas foram transferidos separadamente para seringas com os bicos cortadas, vedados com algodão, sendo, novamente, encaminhadas para a estufa e foram mantidas por 26 dias, para observação de eclosão dos ovos.

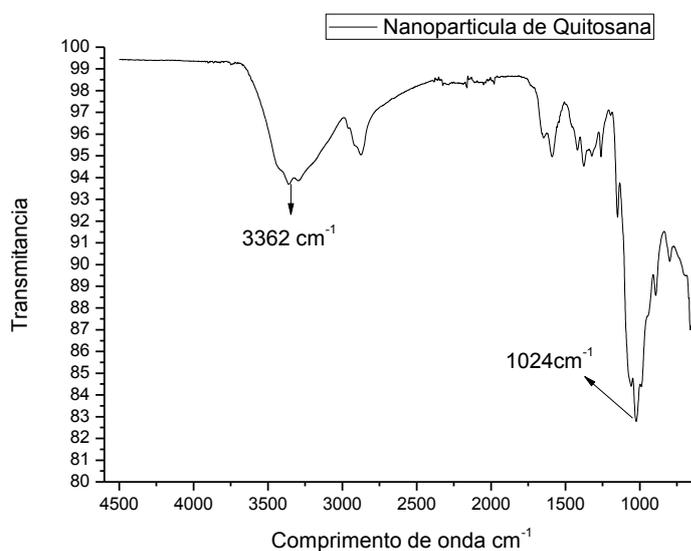
As avaliações foram realizadas em triplicata e os resultados são apresentados utilizando-se das médias. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.3 Resultados e Discussão

As Figuras de 1 a 3 correspondem os espectros da nanopartícula de quitosana, o extrato da *Melia azedarach* e o extrato ancorado na nanoesfera de quitosana,

respectivamente. Observa-se na Figura 1, bandas e picos de estiramento para a nanoesfera de quitosana nas regiões de 3362 cm^{-1} e 1024 cm^{-1} , tais regiões correspondem a deformação angular da ligação N-H, O-H e estiramento C-O. Na Figura 2 as regiões notórias são as 3377 , 2924 , 1696 e 1047 cm^{-1} , nas quais a primeira região é indicativa da presença da ligação O-H em função de álcoois, cetonas e ácidos carboxílicos, a segunda região corresponde a ligação C-H, a terceira corresponde o estiramento da dupla carbono-oxigênio e a última o estiramento C-O de álcoois, ésteres e outros (ARAGÃO et al., 2008).

Todas essas regiões encontradas no espectro do extrato de santa bárbara estão relacionadas a classe de metabólito principal encontrado nessa espécie, os triterpenos. Os triterpenos são um dos grupos de terpenos mais estruturalmente diversificados, nessa classe, existem mais de 40 mil estruturas diferentes, com vários compostos que servem como importantes agentes farmacêuticos. A estrutura dos triterpenos é consideravelmente grande, contendo algumas funções orgânicas principais, tais como, álcool, ésteres, éter e ácido carboxílico (SILVA et al., 2014).



Figural1. Espectro da nanopartícula de quitosana no FTIR.

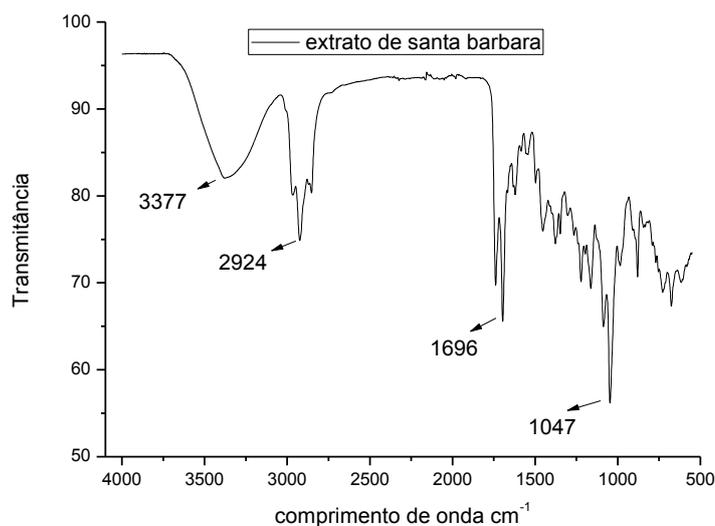


Figura 2. Espectro do extrato de santa bárbara no FTIR.

Quando o extrato de *Melia azedarach* é ancorado na nanopartícula de quitosana o espectro toma outra forma, surgem novas bandas e picos com relação ao espectro da nanopartícula sem a espécie ancorada. Na Figura 3, pode-se observar este espectro, na qual a região 3362 cm⁻¹ apresentada na Figura 1, sofre deslocamento, com o aparecimento de uma banda na região 3398 cm⁻¹. O pico 1024 cm⁻¹ também sofre deslocamento, aparecendo novo pico na região 1034 cm⁻¹. Além disso, outros picos apresentados na Figura 2 sofrem aumento e diminuição na intensidade de transmitância devido às interações ocorridas na superfície do polímero e as moléculas do extrato (Figura 3).

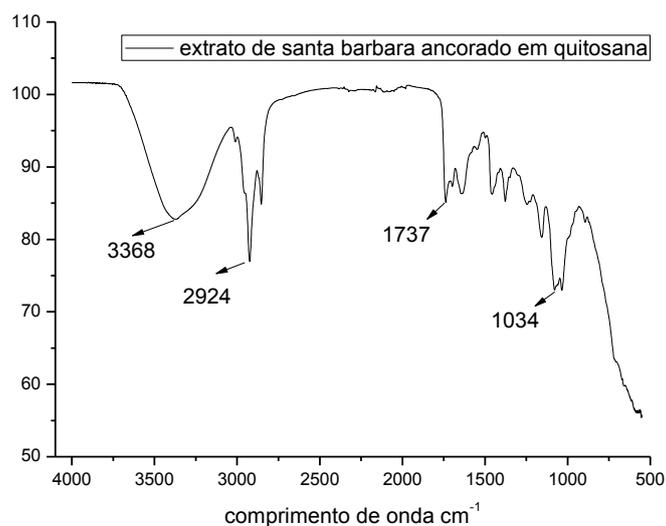


Figura 3. Espectro do extrato ancorado em quitosana no FTIR.

Durante o processo de titulação condutimétrica alíquotas do meio reacional foram coletadas e analisadas no FTIR e UV-Vis. Na análise de FTIR observou-se o aumento e redução da densidade eletrônica dos grupamentos à medida que o pH do meio alterava. Na Figura 4, pode-se observar essa mudança de densidade eletrônica em função da alteração do pH. Percebe-se maior densidade eletrônica para espectros que estavam em pH mais próximos do neutro, por exemplo, no pH 5,95 e 6,43. Os picos nas proximidades das regiões 3500, 1400 e 1000 cm^{-1} sofreram aumento e redução na intensidade da transmitância em função da densidade eletrônica. Entende-se que quanto mais denso for o pico maior será a quantidade de grupamentos adsorvidos do extrato naquela faixa de pH. E de acordo com os resultados obtidos, entre o pH 5 e 6 observou-se maior concentração de extrato e melhor estabilidade da molécula de quitosana

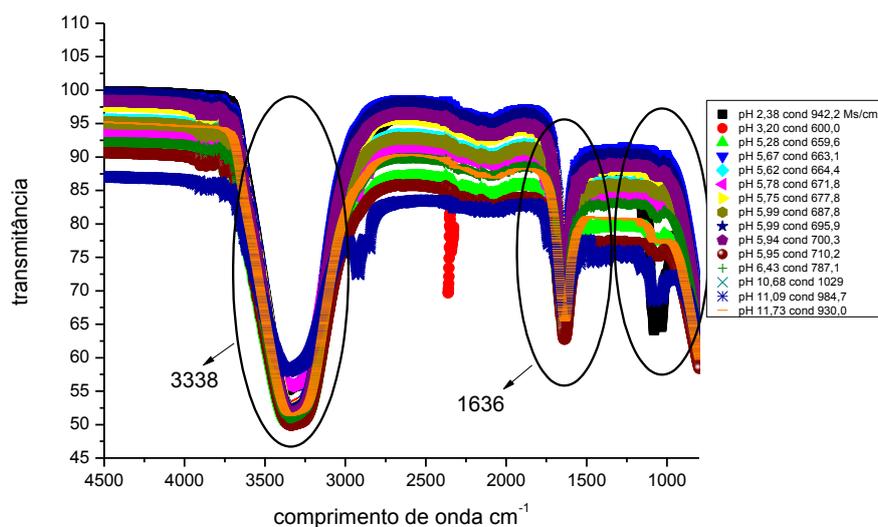


Figura4. Espectro de infravermelho dos pontos da variação de condutividade obtidos da titulação condutimétrica.

Boddu et al. (2007) realizaram estudos acerca da capacidade de sorção de íons metálicos, Arsênio III e Arsênio V pela superfície quitosana. Uma das análises realizadas pelo grupo envolvia análise de FTIR da quitosana antes e após a sorção. Os resultados obtidos apontaram para diferenças no espectro após a sorção, em que houve deslocamento das bandas características da quitosana e aumento da intensidade de transmitância. Os autores apontaram como possível explicação para esse efeito, a quantidade de grupos funcionais presente na quitosana após o processo de sorção (BODDU et al., 2007).

O efeito de adsorção e liberação do extrato pela matriz polimérica foi avaliado também, pela análise no UV-Vis, pelas alíquotas coletadas durante o processo da titulação condutimétrica. O surgimento de novos picos pode ser observado na Figura 5, além do aumento nas bandas de absorvância de acordo com o pH da alíquota analisada.

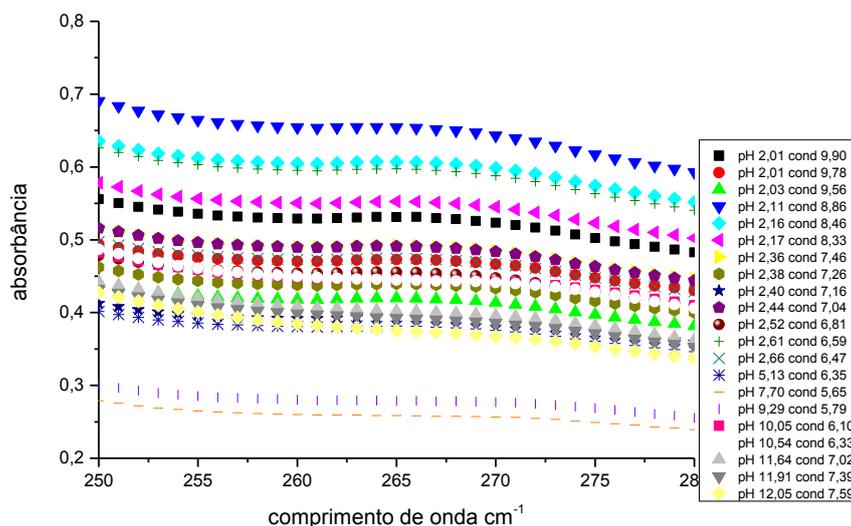


Figura 5. Curvas de titulação condutimétrica.

Na região 265 cm^{-1} observa-se maiores picos de absorvância, nas quais os valores encontrados foram de 0,65 e 0,60 para pH 2,11 e 2,16, respectivamente. Nesses pontos, as moléculas de quitosana estavam protonadas em virtude do pH do meio estar ácido. O grupo amina é responsável pela protonação e desprotonação da molécula, assim nesse pH, pode-se ter maior concentração de extrato adsorvido. A mudança de condutividade da solução é ocasionada pelos efeitos de adsorção e liberação, neste caso de íons H^+ ou moléculas do extrato.

Em geral, nota-se que os picos de absorvância decrescem a medida que a solução se torna mais básica, porém o último pico observado foi verificado sob pH 7,40, na região 265 cm^{-1} com o valor de absorvância de 0,25. Em meio básico ocorre a desprotonação do grupo amina, liberando, se no caso estiver adsorvido o extrato. Neste ponto então a concentração de extrato em solução está maior, devido sua liberação para o meio e a estrutura de nanoesfera de quitosana se torna estável.

Os resultados apresentados na Figura 6, corroboram com os resultados encontrados na análise de UV-Vis. Este gráfico representa as condições de condutividade em função do pH, a partir do volume de NaOH adicionado na solução extrato/nanoesfera de quitosana. A condutividade diminui e aumenta com a adição de hidróxido de sódio, porém, em um determinado ponto, o pH e a condutividade se convergem. A partir desse instante a condutividade passa a aumentar. O ponto de convergência está entre H 6 e 7, em que se verificou maior concentração de extrato liberado.

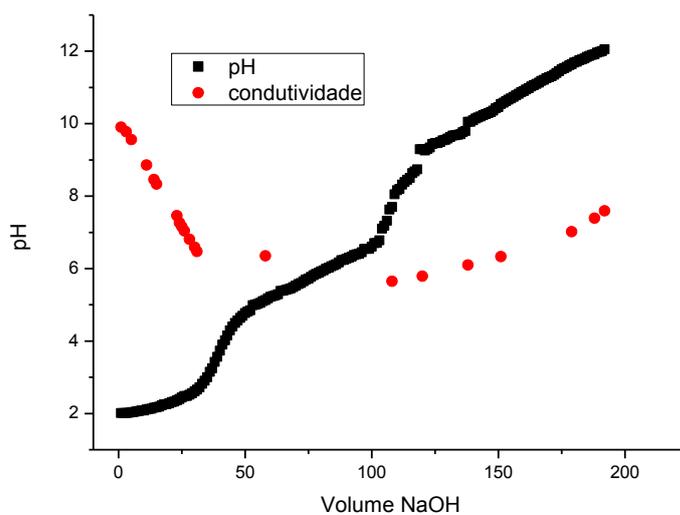


Figura 6. pH e condutividade da solução durante a titulação condutimétrica.

As imagens realizadas por MEV demonstram que a metodologia utilizada para produção de nanopartículas foi eficiente, apresentando uniformidade no tamanho das partículas, com cerca de 589 nm, conforme Figura 7.

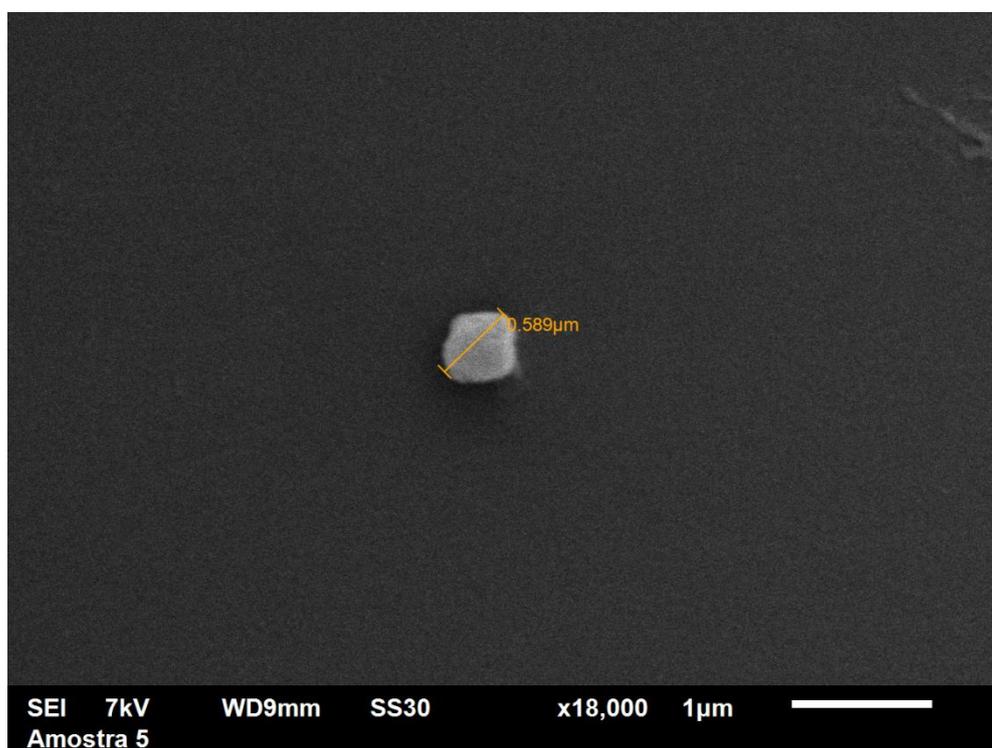


Figura 7: Nanopartícula produzida a partir de sistema de Spray-dry pelo método de gelificação em NaOH.

A mortalidade foi observada para alguns indivíduos para alguns tratamentos, porém é notório a porcentagem de mortalidade para o tratamento 2 (extrato bruto). Para este bioensaio ocorreu 100% de morte para todos os indivíduos. Porém o uso deste como carrapaticida se torna inviável pela quantidade de matéria vegetal utilizada na sua obtenção.

Em relação a oviposição, os tratamentos demonstraram grande potencial na redução de massas de ovos. A taxa de redução na massa dos ovos variou entre 30 a 100% (Figura 8). Evidenciou-se o efeito do aumento da concentração, uma vez que a taxa de redução da massa dos ovos aumentou com o aumento da concentração do extrato.

Esses resultados obtidos estão parcialmente em concordância com os obtidos por Borges et al. (2003), que utilizaram *Melia azedarach* (Meliaceae) a 0,25% observando *in vitro* inibição total da oviposição em fêmeas ingurgitadas imersas no extrato bruto dos frutos maduros extraídos com diferentes solventes. Além disso, observaram elevada taxa de mortalidade de larvas e alta eficácia sobre fêmeas ingurgitadas. Embora o extrato não tenha matado as fêmeas adultas, inibiu total ou parcialmente a produção de ovos, diferentemente do que se observou, pois a mortalidade de fêmeas nesse bioensaio foi elevada, principalmente para o extrato bruto.

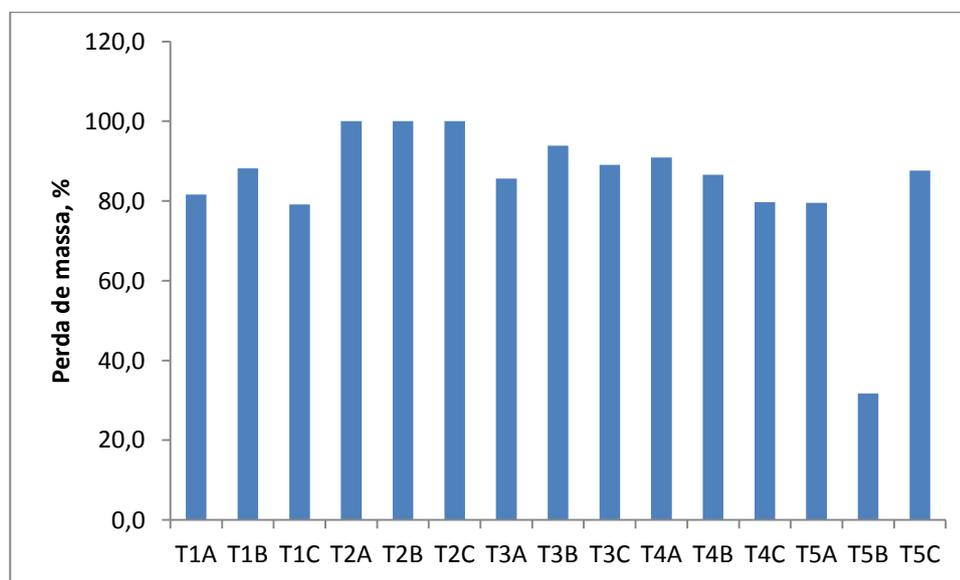


Figura 8: Representação da taxa de redução em porcentagem das massas dos ovos após 14 dias do início do tratamento. Barras obtidas através da média de cada população, realizado em triplicata para cada tratamento.

Pelo teste estatístico realizado com os dados obtidos também é possível observar pelo gráfico acima a semelhança entre o tratamento 2 e 3, correspondendo a maior e menor concentração de extrato. Apontando que mesmo para a menor concentração utilizada neste trabalho, o extrato da *Melia azedarach* é eficaz para o controle do *Boophilus Microplus*.

As Figuras abaixo (9) representadas por 1, 2 e 3, correspondem ao tratamento controle, extrato bruto e concentração de 0,2%, respectivamente. É evidente que a ovopostura para o tratamento de concentração 0,2% diminuiu bastante em relação ao controle e que para o extrato bruto não ocorreu ovopostura, mas sim a morte dos carrapatos após 7 dias da imersão.

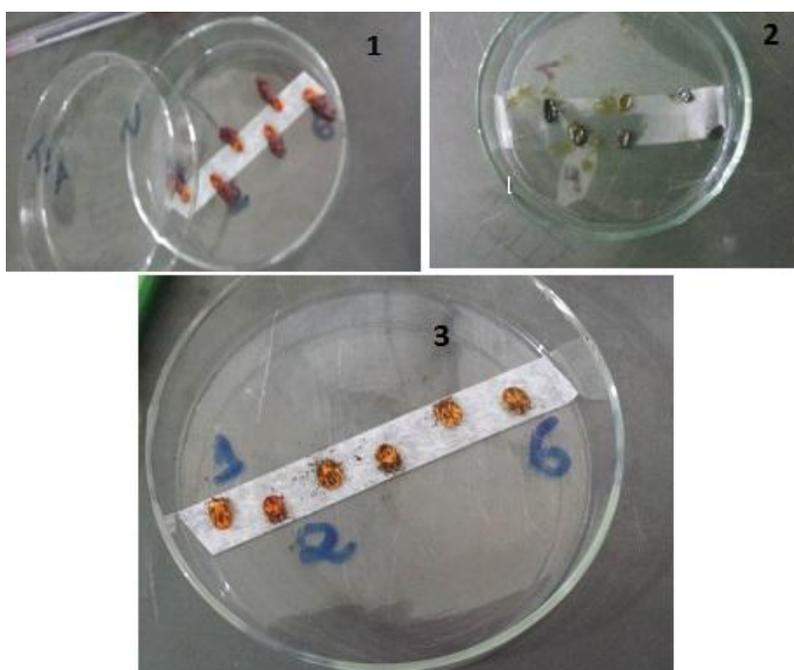


Figura 9: Ovopostura para o tratamento controle, extrato bruto e concentração de 0,2% após 14 dias do início do bioensaio.

4.4 Conclusão

O processo de produção de nanopartícula de quitosana pelo método de inversão de fases junto ao sistema “Spray-drying” foi eficaz.

A nanoesfera de quitosana se mostrou um biopolímero eficaz na adsorção e liberação do extrato de *Melia azedarach*. A liberação controlada é mais evidenciada nas faixas de pH entre 6 e 7, que comprovam a eficiência do material utilizado para melhorar o perfil do carrapaticida orgânico.

Para o extrato bruto houve 100% de mortalidade para todos os indivíduos e para alguns tratamentos observou morte, porém não foi tão significativo. Com relação a redução da das massas dos ovos, a porcentagem variou ente 30 a 100%, sendo que na maioria dos tratamentos a porcentagem estava entre 80 a 100%. O tratamentos de 0,2% foi significativo pelo teste de Tukey a 5%, comprovando a eficiência da técnica de liberação controlada do extrato da *Melia azedarach* e a sua atividade acaricida.

4.5 Referências Bibliográficas

ARAGÃO, B. J. G.; MESSADDEQ, Y. Peak separation by Derivative Spectroscopy Applied to FTIR Analysis of Hydrolized Silica. **Journal of the Brazilian chemical Society**, v. 19, n. 8, p. 1582-1594, 2010.

BODDU, V. M.; ABBURI, K.; TALBOTT, J. L.; SMITH, E. D.; HAASCH, R. Removal of arsenic (III) and arsenic (V) from aqueous medium using chitosan-coated biosorbent. **Water Research**, n. 4, 2007.

BORGES, L. M. F. et al. *In vitro* efficacy of extracts of *Melia azedarach* against the tick *Boophilus microplus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 17, n. 2, p. 228-231, 2003.

BROGLIO-MICHELETTI, S. M. F.; DIAS, N. S.; VALENTE, E. C. N.; SOUZA, L. A.; LOPES, D. O. P.; SANTOS, J. M. Ação de extrato e óleo de nim no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) em laboratório. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 44-48, 2010.

BRUNHEROTTO, R.; VENDRAMIM, J. D.; ORIANI, M. A. G. Efeito de Genótipos de Tomateiro e de Extratos Aquosos de Folhas de *Melia azedarach* e de Sementes de

Azadirachta indica sobre *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Neotropical Entomology**, v. 39, n.5, p.784-791, 2010.

CHIFFELEEE, I. G.; HUERTA, A. F.; LIZANA, D. R. Physical and chemical characterization of *Melia azedarach* L. fruit and leaf for use as botanical insectide. **Chilean journal of agricultural research**, v. 69, n. 1, p. 38-45, 2009.

DIAS, F. S.; QUEIROZ, D. C. Um sistema simples para preparação de microesferas de quitosana. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p.160-163, 2008.

IANNACONE, J.; LAMAS, G. Efecto de dos extractos botánicos y un insecticida convencional sobre el depredador *Chrysoperla externa*. **Manejo Integrado de Plagas y Agroecología**, v. 65, p. 92-101, 2002.

JÚNIOR, D. A. C.; OLIVEIRA, P. R.; Avaliação *in vitro* da eficácia de acaricidas sobre *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) de bovinos no município de Ilhéus, Bahia, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.6, p.1386-1392, 2005,

LIU, Z.; JIAO, Y.; WANG, Y.; ZHOU, C.; ZHANG, Z. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.7, p. 1650-1662, 2008.

SILVA, F. C.; DUARTE, L. P.; VIEIRA FILHO, S. A. Celastráceas: Fontes de Triterpenos Pentacíclicos com Potencial Atividade Biológica. **Revista Virtual Química**, v. 6, n. 5, p. 1205-1220, 2014.

SOUSA. L. A. D.; SOARES, S. F.; FERRI, P. H.; BORGES, L. M. F. Avaliação da eficácia de extratos oleosos de frutos verdes e maduros de cinamomo (*Melia azedarach*) sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI: IXODIDAE). **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 17, n.1, p. 36-40, 2008.

CONCLUSÃO GERAL

De acordo com os objetivos propostos pelo trabalho, conclui-se que tanto a produção de extratos vegetais das cinco espécies e a produção das nanoesferas de quitosana foram satisfatórias. Obtendo extratos brutos, nestes contendo metabólitos secundários com ação biocida contra o carrapato *R. microplus*.

A verificação da liberação controlada dos princípios ativos realizada pela nanoesfera de quitosana foi confirmada durante o teste da titulação condutimétrica, na qual posteriormente alíquotas do teste foram analisadas no UV-Vis e FTIR. Nas análises de FTIR observou-se deslocamento de banda e aumento da densidade eletrônica dos grupamentos após o processo e conseqüentemente diminuição na transmitância. Evidenciou-se efeito similar para todas as espécies, a liberação do composto ativo entre pH 5 e 7.

Além disso, a análise no UV-vis corrobora com os resultados obtidos no FTIR, pois a concentração do extrato adsorvido pela molécula de quitosana é maior quando a solução está em pH ácido e a medida que o pH se aproxima do neutro a concentração do extrato se torna maior, sendo este liberado para o meio, efeito observado pelo aumento da condutividade da solução.

Os parâmetros observados nos testes *in vitro* foram os de mortalidade e oviposição após as teleóginas serem submetidas aos tratamentos. Para o tratamento com o extrato bruto a taxa de mortalidade foi de 100% para todos os indivíduos para todas as espécies. Embora não demonstrado a taxa de redução na massa dos ovos para os ensaios do caju, capim-limão e neem foram melhores nos tratamentos 4, 5 e 5, respectivamente. A taxa variou de 70 a 100%. Já para os artigos anexados, os ensaios da guapeva e santa bárbara apresentaram melhores resultados para os tratamentos 4 e 3, respectivamente, em que a taxa da redução dos ovos variou entre 85 a 100%.

Em virtude dos resultados gerais obtidos a aplicação dos extratos diluídos das espécies *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, *Pouteria gardneriana* Radlk, *Anacardium othonianum* Rizz, *Melia azedarach* e *Azadiracht indica* L. mesmo em baixa concentração, estes adsorvidos pelas moléculas de quitosana são eficazes no controle do carrapato *R. microplus*.