

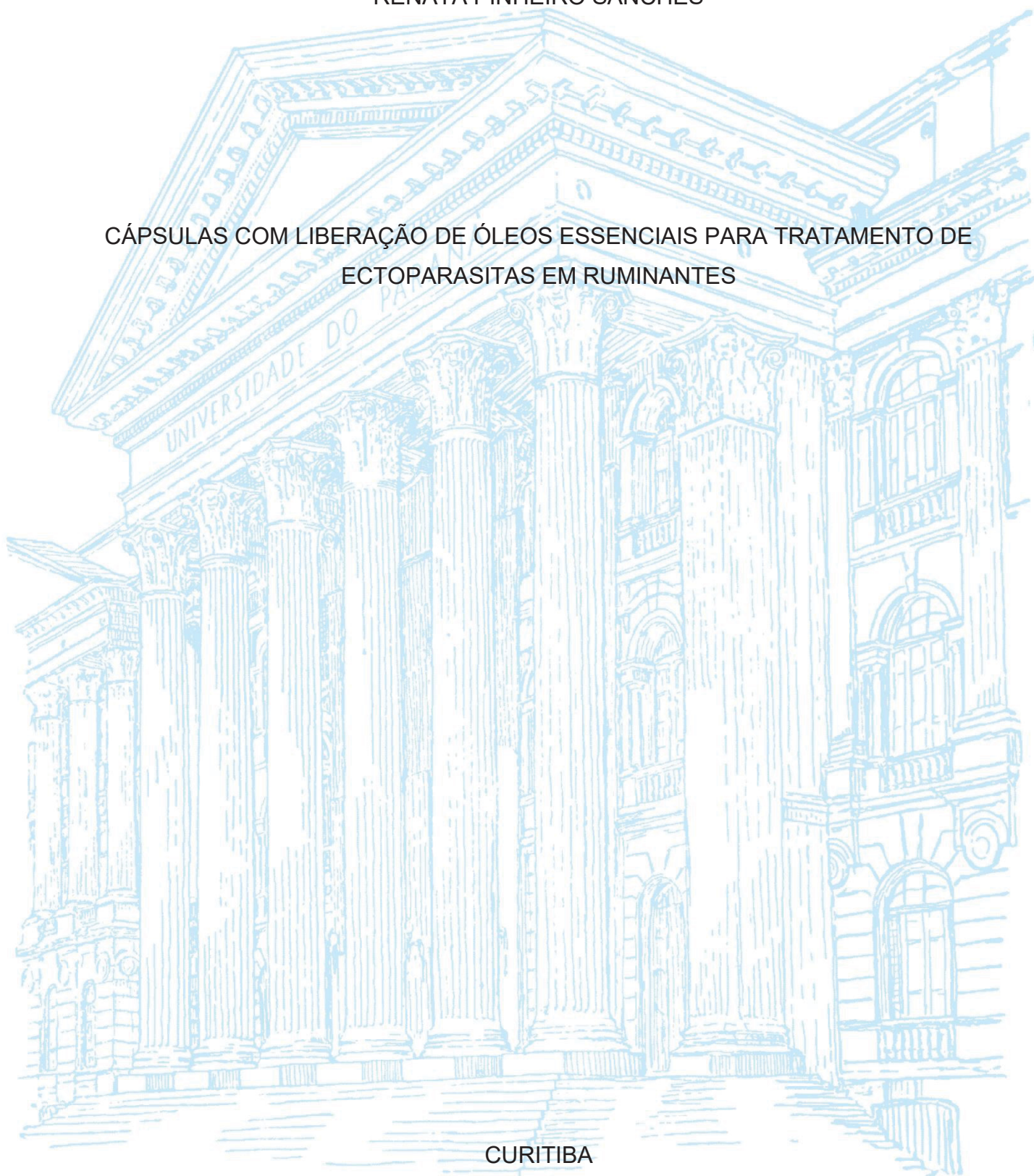
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RENATA PINHEIRO SANCHES

CÁPSULAS COM LIBERAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS PARA TRATAMENTO DE
ECTOPARASITAS EM RUMINANTES

CURITIBA

2022



RENATA PINHEIRO SANCHES

CÁPSULAS COM LIBERAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS PARA TRATAMENTO DE
ECTOPARASITAS EM RUMINANTES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Izabel Cristina Riegel Vidotti

Coorientadores: Prof. Dr. Marcelo Beltrão Molento
Dr. Bruno Campos da Silva

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Sanches, Renata Pinheiro

Cápsulas com liberação de óleos essenciais para tratamento de ectoparasitas em ruminantes / Renata Pinheiro Sanches. – Curitiba, 2022.
1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química.

Orientador: Izabel Cristina Riegel Vidotti

Coorientador: Marcelo Beltrão Molento

1. Cápsulas (Farmácia). 2. Essências e óleos essenciais. 3. Bergamota. 4. Acaricidas. 5. Carrapatos. I. Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Vidotti, Izabel Cristina Riegel. IV. Molento, Marcelo Beltrão. V. Título.

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA -
40001016026P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **RENATA PINHEIRO SANCHES** intitulada: **CÁPSULAS COM LIBERAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS PARA TRATAMENTO DE ECTOPARASITAS EM RUMINANTES**, sob orientação da Profa. Dra. IZABEL CRISTINA RIEGEL VIDOTTI MIYATA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 01 de Dezembro de 2022.

Assinatura Eletrônica

02/12/2022 08:31:10.0

IZABEL CRISTINA RIEGEL VIDOTTI MIYATA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

05/12/2022 10:47:58.0

ELISA SOUZA ORTH

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

05/12/2022 11:15:02.0

JULIANA BELLO BARON MAURER

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

CENTRO POLITÉCNICO - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-990 - Tel: (41) 3361-3006 - E-mail: cpgquim@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 239480

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 239480

À Solange, Elza e Sônia,
as mulheres da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a minha mãe, Solange, por ter sido meu exemplo de mulher forte, que não desiste do que quer e sempre vai à luta. Você é a minha maior inspiração e eu te agradeço do fundo do meu coração por ter investido na minha formação profissional e por me oferecer um colo sempre que eu preciso (mesmo que eu não mereça). À minha vó, Elza, por ter cuidado de mim a minha vida inteira e por demonstrar seu amor por mim através das refeições. Sou imensamente grata por todas as marmitas que eu trouxe de Itatiba para Curitiba. Agradeço também aos meus tios, Sônia e Amauri, por serem a base da nossa família. Sem vocês eu não teria chego até aqui.

Agradeço também ao meu namorado, Gustavo, pelo amor, cuidado, pela paciência e também por ter sido um dos maiores incentivadores para eu fazer um mestrado e ir atrás do que eu gosto.

À minha orientadora, Prof^a Izabel Vidotti, por ter me aceitado em seu grupo de pesquisa, por ser um exemplo de pesquisadora e profissional. E, principalmente, por sempre me lembrar que não existe resultado ruim, existe apenas resultados que não saíram de acordo com a ideia inicial. Obrigada por tanto.

Ao meu coorientador Dr. Bruno Campos da Silva, por sempre me socorrer nos procedimentos experimentais e por toda paciência ao transmitir o seu conhecimento. Sua contribuição foi imprescindível para a elaboração desse projeto. Um agradecimento especial por sempre acreditar em mim e no meu trabalho, mesmo quando eu mesma duvidei.

Ao meu coorientador Prof. Marcelo Molento, por ter aberto as portas do LPCV para mim e por ter trazido para a minha vida conhecimentos e experiências que eu nunca achei que ia ter. Obrigada pela paciência em me ensinar, pelo apoio, por sempre acreditar no projeto e me incentivar em todos os concursos que eu me inscrevi.

Agradeço também a técnica Ursula Yoshitani, por ter me acompanhado em todas as coletas de carrapatos, por ter me ensinado com zelo e paciência todos os testes biológicos. E, acima de tudo isso, pela amizade e companheirismo ao longo desses anos.

Às professoras Juliana Maurer e Sônia Zawadzki pelas contribuições na banca de exame de qualificação.

Às professoras Elisa Orth e Juliana Maurer pelo aceite em participar da avaliação de defesa deste trabalho.

A todos os meus amigos do GPMIn por me acolherem tão bem e por terem feito os meus dias muito mais alegres e divertidos. Em especial a Ana Caroline, Andrei, Bruna, Gabriela, Giuliana, Isabela, Jaqueline, José, Letícia, Maximiliano, Maira, Rafael, Raquel, Renata L, Sabrina, Tatiana e Vanessa. Obrigada por ouvirem minhas reclamações e me consolarem nos dias em que os experimentos não deram certo. O apoio de vocês foi muito importante em todo esse processo. Também agradeço a Letícia e ao Max, por serem alunos de iniciação científica tão dedicados e por embarcarem empolgados nesse mundo das cápsulas de alginato e quitosana.

Agradeço aos meus amigos da graduação na Unicamp, Bárbara, Naylil, Helena, Tatiana e Tomás, por estarem presentes na minha vida mesmo distante e por todo apoio ao longo de todos esses anos juntos. Um agradecimento especial para a Bárbara, por me aguentar com todas as minhas dúvidas básicas sobre química que eu não teria coragem de perguntar nem pro Google.

Agradeço também as minhas amigas de infância, Rafaela e Marina, por me ajudarem a construir minha história, por comemorarem juntas minhas vitórias e serem os melhores ombros quando eu preciso de ajuda.

Agradeço ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR (CME) pelas análises.

A CAPES pela bolsa concedida, que foi imprescindível para o desenvolvimento do meu mestrado.

Por fim, agradeço a todos aqueles que, por algum motivo eu tenha esquecido de mencionar, mas que de alguma forma contribuíram para que eu estivesse aqui hoje.

Muito obrigada!

“Do it or do not. There is no try.”

Master Yoda in *Star Wars: The Empire Strikes Back*

A reminder to commit oneself to something completely, win or lose.

RESUMO

Polímeros naturais como alginato e quitosana são bastante explorados para a encapsulação de ativos por serem biodegradáveis, biocompatíveis e capazes de responder a estímulos externos, como a variação do pH. Neste trabalho, esses polímeros foram utilizados para encapsular óleo essencial de bergamota (OEB) para o tratamento de carrapatos (*Rhipicephalus microplus*) em ruminantes por via oral. O OEB livre apresentou alta ação acaricida em teste *in vitro* com fêmeas ingurgitadas da espécie *Rhipicephalus microplus*, eliminando 99,7 % destas na concentração 6 % (m/V). O (R)-Limoneno, um dos componentes majoritários do OEB, demonstrou eficiência ainda maior, com 90,7 % a 1 % (m/V) e 100 % a partir da concentração 4 % (m/V). Esses resultados são promissores para o desenvolvimento de um tratamento com ativos naturais, algo completamente inédito do que está sendo ofertado comercialmente nesse ramo. O preparo das cápsulas foi feito pelas técnicas de gelificação ionotrópica e coacervação complexa e seus parâmetros experimentais foram estudados. Avaliou-se dois tipos de agentes reticulantes (M^{n+}), Fe^{3+} e Cu^{2+} e a proporção entre alginato/quitosana e entre alginato/ M^{n+} . Cápsulas com formato esférico e resistência mecânica foram obtidas com Fe^{3+} , 5:1 (m/m) alginato/quitosana e 1:0,05 (m/mol L⁻¹) alginato/ Fe^{3+} . As cápsulas apresentaram eficiência de encapsulação de 73 % (m/m) de OEB encapsulado. A matriz polimérica foi exposta ao pH 6,8 por 24h e pH 2 por 2h simulando as condições de pH encontradas no rúmen e no abomaso, respectivamente. O perfil cinético de liberação do OEB foi avaliado pelas equações de ordem zero, primeira ordem e Korsmeyer-Peppas, em ambos os meios. A liberação do OEB foi mais rápida em pH 2 do que em pH 6,8, comprovando que o sistema proposto é responsivo ao pH. Vale ressaltar que a matriz polimérica não perdeu a integridade após nenhum dos testes de liberação em função do pH, evidenciando a coesão da matriz polimérica das cápsulas. As cápsulas também foram avaliadas pelo teste *in vitro* de digestão ruminal, nas quais foram colocadas em contato com líquido ruminal por 24 h. Depois desse período, foi detectado que 87 % das cápsulas foram digeridas pelos microrganismos e bactérias presentes no rúmen. No entanto, cabe destacar que o teste foi feito em condições extremas e que as cápsulas foram desenvolvidas para passagem direta do rúmen para o abomaso.

Palavras-chave: microcápsulas, óleo essencial de bergamota, acaricida, carrapato bovino, pós-rúmen, cinética de liberação.

ABSTRACT

Natural polymers such as alginate and chitosan are widely explored for the encapsulation of actives because they are biodegradable, biocompatible and able to respond to external stimuli, such as pH variation. In this work, these polymers were used to encapsulate bergamot essential oil (BEO) for the oral treatment of ticks (*Rhipicephalus microplus*) in ruminants. The free BEO showed high acaricidal action in an in vitro test with engorged females of the *Rhipicephalus microplus* species, eliminating 99.7 % of these at a concentration of 6 % (m/V). (R)-Limonene, one of the major components of BEO, showed even greater efficiency, with 90.7 % at 1 % (m/V) and 100 % from 4 % concentration (m/V). These results are promising for the development of a treatment with natural actives, something completely unprecedented in what is being offered commercially in this field. The capsules were prepared using ionotropic gelling and complex coacervation techniques and their experimental parameters were studied. Two types of crosslinking agents (Mn^{2+} , Fe^{3+} and Cu^{2+} , and the ratio between alginate/chitosan and between alginate/ Mn^{2+} were evaluated. Capsules with spherical shape and mechanical resistance were obtained with Fe^{3+} , 5:1 (m/m) alginate/chitosan and 1:0.05 (m/mol L⁻¹) alginate/ Fe^{3+} . The capsules showed encapsulation efficiency of 73 % (m/m) of encapsulated BEO. The polymeric matrix was exposed to pH 6.8 for 24 h and pH 2 for 2 h simulating the pH conditions found in the rumen and abomasum, respectively. The kinetic profile of BEO release was evaluated by zero order, first order and Korsmeyer-Peppas equations, in both media. BEO release was faster at pH 2 than at pH 6.8, proving that the proposed system is pH responsive. It is noteworthy that the polymeric matrix did not lose its integrity after any of the deliberation tests as a function of pH, evidencing the cohesion of the polymeric matrix of the capsules. The capsules were also evaluated by the in vitro test of ruminal digestion, in which they were placed in contact with ruminal liquid for 24 h. After this period, it was detected that 87 % of the capsules were digested by microorganisms and bacteria present in the rumen. However, it should be noted that the test was carried out under extreme conditions and that the capsules were developed for direct passage from the rumen to the abomasum.

Keywords: microcapsules, bergamot essential oil, acaricide, bovine tick, post-rumen, release kinetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. a) Estrutura molecular do ácido β -D-manurônico (Bloco M). b) Estrutura molecular do α -L-gulurônico (Bloco G). c) Exemplo aleatório de uma cadeia de alginato.	26
Figura 2. Estrutura <i>egg-box</i> formada na interação entre o ácido gulurônico e o cátion Ca^{2+}	27
Figura 3. Estrutura molecular da quitosana.....	28
Figura 4. Ilustração do trato digestivo de ruminantes.....	29
Figura 5. Estrutura (R)-limoneno (esquerda) e (S)-limoneno (direita).	31
Figura 6. Fêmeas teleóginas de <i>Rhipicephalus microplus</i> acondicionadas em copos plásticos e separadas em grupos com peso homogeneamente distribuído.....	33
Figura 7. Teleóginas separadas e fixadas em fita dupla-face dentro da estufa controlada.	34
Figura 8. Placa com teleóginas após postura dos ovos. Em vermelho está destacado uma postura completa, com a teleóquina em formato “L”.	36
Figura 9. Bandeja contendo os envelopes do TPL antes do armazenamento em estufa climatizada.	37
Figura 10. Contagem das larvas vivas e mortas após 24 h por sucção com o auxílio da bomba à vácuo.....	37
Figura 11. Representação esquemática do preparo das cápsulas de alginato e quitosana.	41
Figura 12. Espectro UV-Vis do OEB em hexano (esquerda) e curva analítica (direita). A curva analítica relaciona a absorvância máxima do OEB em hexano em 307 (eixo y) e a sua respectiva concentração em g/mL (eixo x). .	42
Figura 13. Fluxograma realizado para a avaliação da estabilidade das cápsulas.....	44
Figura 14. Imagem da incubadora <i>in vitro</i> Dayse TE-150 aberta mostrando os 3 jarros utilizados para incubação dos saquinhos contendo as cápsulas em líquido ruminal.....	47
Figura 15. Representação esquemática do teste de digestão ruminal <i>in vitro</i>	47
Figura 16. Esquema representando a divisão da seção de resultados e discussão em 3 partes. Parte I: análise do OEB. Parte II: preparo e caracterização das cápsulas. Parte III: teste biológico de digestão ruminal.....	48

Figura 17. Cromatogramas obtidos por GC-MS para o OEB e o (R)-Limoneno (1 mg L ⁻¹ em hexano grau HPLC) em coluna SH-Rtx- 5MS (30m x 0,25mm; 0,25µm).....	48
Figura 18. Estrutura química dos compostos majoritários do OE de bergamota.....	49
Figura 19. Representação visual dos dados de eficiência do produto (%) (eixo y) por concentração % (m/V) do OEB e limoneno obtidos pelo biocarrapaticidograma.....	51
Figura 20. Perfil cromatográfico HPSEC obtido para o alginato de sódio.	54
Figura 21. Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, D ₂ O) da amostra de alginato de sódio (10 mg mL ⁻¹) a 70°C com as regiões A, B e C identificadas.	55
Figura 22. Cápsula de alginato, Fe ³⁺ , OEB e quitosana em papel milimetrado.....	57
Figura 23. Espectro de FTIR-ATR para o OEB, alginato (Alg), quitosana (Qui), cápsulas Alg/Fe ³⁺ /Qui com OEB e sem OEB (Alg/Fe ³⁺ /Qui*). Ao lado das setas estão as principais bandas e os referentes estiramentos.	59
Figura 24. Representação da proposta de troca iônica entre o íon Cu ²⁺ por K ⁺ em uma cadeia de alginato reticulada previamente com Cu ²⁺	60
Figura 25. Aspecto dos <i>beads</i> de alginato/M ⁿ⁺ (Fe ³⁺ , Al ³⁺ , Ce ³⁺ , Ca ²⁺ , Cu ²⁺ e Zn ²⁺) úmidos, secos e após imersão em pH 2, 10 e soluções de NaCl, FeCl ₃ , Al ₂ [SO ₄] ₃ , CuSO ₄ e ZnCl ₂	61
Figura 26. Análise qualitativa da absorvância das cápsulas de alginato e quitosana com Fe ³⁺ em tampão PBS 0,05 mol L ⁻¹ e CTAB 0,1 % (m/V) por 6 h e 24 h.	62
Figura 27. Perfil de liberação do OEB em PBS (a) e os ajustes cinéticos de ordem zero (b), primeira ordem (c) e Kosmeyer-Peppas (d).....	64
Figura 28. Perfil de liberação do OEB em FGS (a) e os ajustes cinéticos de ordem zero (b), primeira ordem (c) e Kosmeyer-Peppas (d).....	67
Figura 29. Concentração de Fe ³⁺ liberado das cápsulas após 24 h à 37°C em meio ácido (pH 1,2) e neutro (pH 7,4).....	69
Figura 30. Comparação dos cromatogramas obtidos por GC-MS ingestão <i>headspace</i> para o OEB (em preto) e o tampão PBS (azul) e FGS (rosa) após liberação das cápsulas em 24h e 2h, respectivamente.....	69
Figura 31. Espectro de FTIR-ATR para as cápsulas Alg/Fe ³⁺ /Qui secas, após 24h em PBS e 2h em FGS. Ao lado estão as principais bandas e os referentes estiramentos.....	71

Figura 32. MEV para as cápsulas de Alg/Fe ³⁺ /Qui secas, após 24h em PBS e 2h em FGS.....	72
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos controles positivo e negativo e suas soluções utilizados nos testes de biocarrapaticidograma.....	34
Tabela 2. Parâmetros avaliados durante o preparo das cápsulas de alginato e quitosana, sendo estes a proporção entre alginato/quitosana (m/m), tipo de agente reticulante utilizado (M^{n+}) na concentração 0,1 mol L ⁻¹ , proporção alginato/ (m/mol L ⁻¹).	41
Tabela 3. Nome da solução, composição e referência da solução utilizada para simular fluído gástrico.	45
Tabela 4. Tempo de Retenção (TR), Similaridade, Área Relativa e Componentes identificados no cromatograma do OEB.....	49
Tabela 5. Resultados de eficiência reprodutiva (ER) e eficiência do produto (EP) obtidos no teste de biocarrapaticidograma para os grupos controle e as soluções de limoneno e OEB de 1 a 6 % (m/V).	50
Tabela 6. Resultados da mortalidade e mortalidade média obtidos no TPL para aos grupos controle e as soluções de OEB nas concentrações 2 e 4 % (m/V).	53
Tabela 7. Parâmetros físico-químicos do alginato de sódio determinados pela técnica HPSEC (M_w , M_n , $\bar{D}$) e valor obtido no incremento de índice de refração. A porcentagem ao lado do valor indica o erro associado a análise.....	54
Tabela 8. Proporções alginato/ M^{n+} (m/mol L ⁻¹) utilizadas nas formulações e os resultados obtidos para cada uma delas.....	56
Tabela 9. Modelos cinéticos e os parâmetros obtidos pela liberação do OEB em PBS. Também são apresentadas as equações utilizadas em cada modelo, sendo eles ordem zero, primeira ordem e Korsmeyer-Peppas.	65
Tabela 10. Modelos cinéticos e os parâmetros obtidos pela liberação do OEB em FGS. Também são apresentadas as equações utilizadas em cada modelo, sendo eles ordem zero, primeira ordem e Korsmeyer-Peppas.	67
Tabela 11. Tempo de retenção, área, similaridade e nome do composto identificado nos cromatogramas obtidos por GC-MS ingestão <i>headspace</i> para o	

OEB (em preto) e para os líquidos do tampão PBS (azul) e FGS (rosa)
após liberação das cápsulas em 24 h e 2 h, respectivamente.70

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

Alg/Fe ³⁺ /OEB/Qui	Cápsulas de alginato, ferro III, óleo essencial de bergamota e quitosana
Bloco G	Ácido α-L-gulurônico
Bloco M	Ácido β-D-manurônico
CME-UFPR	Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná
COO ⁻	Grupo carboxilato
COOH	Grupo carboxílico
CPRA	Centro Paranaense de Referência em Agroecologia
Đ	Polidispersão de Massas Molares
dn/dc	Incremento do índice de refração
EE %	Eficiência de encapsulação dada em porcentagem
EP	Eficiência do produto
ER	Eficiência reprodutiva
FGS	Fluído gástrico sem enzima
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier, do inglês <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
FZEA	Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
GC-MS	Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês <i>Gas Chromatography Mass Spectrometry</i>
GD	Grau de desacetilação
GPMin	Grupo de Pesquisa em Macromoléculas e Interfaces
HPSEC	Cromatografia de exclusão por tamanho de alta eficiência, do inglês <i>High Performance Size Exclusion Chromatography</i>
IR	Índice de Refração Diferencial
kV	Kilovolt
M/G	Proporção entre os monômeros Bloco M/Bloco G
m/m	Razão massa/massa
m/V	Razão massa/Volume

m/z	Razão massa/carga
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
$\bar{M}_n$	Massa molar numérica média
M^{n+}	Agente reticulante
$\bar{M}_w$	Massa molar ponderal média
NH_3^+	Grupo amina protonado
OE	Óleo Essencial
OEB	Óleo Essencial de Bergamota
OH	Grupo hidroxila
PBS	Tampão fosfato
PBS + CTAB	Solução de tampão fosfato e surfactante brometo de cetrimônio
pH	Potencial hidrogeniônico
RALS	Espalhamento de Luz de Ângulo Reto, do inglês <i>Right Angle Light Scattering</i>
TPL	Teste de Pacote de Larvas
USP	Universidade de São Paulo
V/V	Razão Volume/Volume

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	20
2.	OBJETIVOS	23
2.1.1	Objetivo geral	23
2.1.2	Objetivos específicos.....	23
3.	REVISÃO DE LITERATURA.....	24
3.1	TÉCNICAS DE ENCAPSULAÇÃO	24
3.2	ALGINATO DE SÓDIO	25
3.3	QUITOSANA	27
3.4	TRATO DIGESTIVO RUMINANTES	28
3.5	ÓLEOS ESSENCIAIS E SUA AÇÃO ACARICIDA EM RHIPICEPHALUS MICROPLUS	30
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1	MATERIAIS	31
4.2	MÉTODOS	32
4.2.1	Caracterização do OEB e do composto isolado por GC-MS	32
4.2.2	Testes de Ação Acaricida	33
4.2.2.1	Biocarrapaticidograma	33
4.2.2.2	Interpretação dos Resultados do Biocarrapaticidograma	35
4.2.2.3	Teste de Pacote de Larvas (TPL)	36
4.2.3	Caracterização do alginato de sódio	38
4.2.3.1	Determinação da Massa Molar Média Ponderal (M_w) por HPSEC	38
4.2.3.2	Determinação da razão M/G por RMN	39
4.2.4	Preparo das cápsulas de alginato e quitosana	39
4.2.1	Caracterização das cápsulas	41
4.2.1.1	Eficiência de encapsulação (EE %)	41
4.2.1.2	Espectroscopia no infravermelho (FTIR)	42
4.2.2	Estabilidade das cápsulas com variação do pH	43
4.2.2.1	Estabilidade em pH 6,8.....	44
4.2.2.2	Estabilidade em pH 2.....	45
4.2.2.3	Morfologia das cápsulas após testes de estabilidade.....	45
4.2.3	Digestão ruminal in vitro	46
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47

5.1 PARTE I	48
5.1.1 Composição do OEB e do composto isolado (R)-Limoneno	48
5.1.2 Avaliação do potencial acaricida do OEB em fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	49
5.1.3 Avaliação do potencial acaricida do OEB em larvas da espécie <i>Rhipicephalus microplus</i>	52
5.2 PARTE II	53
5.2.1 Características do alginato de sódio	53
5.2.1.1 Massa Molar Ponderal Média (Mw)	53
5.2.1.2 Razão M/G por RMN	54
5.2.2 Obtenção das cápsulas de alginato e quitosana	55
5.2.3 Características das cápsulas	57
5.2.3.1 Tamanho das cápsulas	57
5.2.3.2 Porcentagem de OEB encapsulado	57
5.2.3.3 Caracterização estrutural por FTIR	58
5.2.4 Avaliação do comportamento das cápsulas com a variação do pH	59
5.2.4.1 Avaliação do comportamento das cápsulas em pH 6,8	59
5.2.4.2 Avaliação do comportamento das cápsulas em pH 2	66
5.2.4.3 FTIR das cápsulas após testes com variação do pH	71
5.2.4.4 MEV das cápsulas após testes com variação do pH	71
5.3 PARTE III	72
5.3.1.1 Estabilidade das cápsulas em condições ruminais	72
6. CONCLUSÕES	74
6.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	76
REFERÊNCIAS	78
APÊNDICE 1 – DADOS BRUTOS BIOCARRAPATICIDOGRAMA	87
APÊNDICE 2 – DADOS BRUTOS TPL	88
APÊNDICE 3 – INFORMAÇÕES ADICIONAIS SOBRE A METODOLOGIA DE QUANTIFICAÇÃO DO OEB EM PBS + CTAB	89

1. INTRODUÇÃO

Encapsulação consiste em recobrir determinadas substâncias com uma película protetora, geralmente uma parede polimérica. Esse processo permite a conservação das características intrínsecas do material aprisionado ao protegê-lo de interagir e/ou reagir com outras substâncias presentes no ambiente. Essa técnica é comumente empregada para encapsular ingredientes ativos como medicamentos, cosméticos, suplementos alimentares, fragrâncias, dentre outros¹⁻⁴.

Além da conservação do material encapsulado, um dos grandes objetivos dessa técnica é a liberação do ativo em locais e momentos desejados. Isso ocorre por meio de estímulos específicos, como alteração no pH, temperatura, biodegradação ou ruptura mecânica por exemplo. Nesse caso, as cápsulas são desfeitas ou modificadas, desencadeando a liberação do material aprisionado na matriz polimérica, controladamente⁴⁻⁶. Em muitas aplicações, essa liberação localizada permite a redução da quantidade total de ingredientes ativos que devem ser administrados para atingir o efeito esperado, o que auxilia na diminuição de custos e potenciais efeitos colaterais, sendo uma característica benéfica em aplicações farmacêuticas⁴.

Uma combinação de polímeros que vem sendo amplamente estudada para encapsulação de ativos é alginato de sódio e quitosana, por serem materiais oriundos de fontes naturais, biodegradáveis, biocompatíveis e capazes de reagir em condições brandas⁷⁻¹⁰. As aplicações envolvendo esses polímeros são inúmeras, dentre elas a entrega de medicamentos¹¹, encapsulação de proteínas¹², imobilização de enzimas¹³ e preparo de curativos para queimaduras¹⁴. Este projeto estudou uma aplicação ainda não explorada: a criação de um possível sistema inerte à degradação ruminal para administração via oral em bovinos. Na literatura, publicações envolvendo essa finalidade são escassas devido ao complexo sistema digestivo apresentado por esses animais.

Os bovinos foram escolhidos como alvo desse trabalho devido a suma importância da bovinocultura no país. Atualmente, o Brasil conta com mais de 224 milhões de cabeças de gado¹⁵ e é considerado um dos maiores produtores e exportadores de carne bovina do mundo¹⁶. Dessa forma, aplicações visando melhorias na qualidade de vida e produtividade desses animais são assuntos de grande interesse.

Os bovinos possuem quatro estômagos (rúmen, retículo, omaso e abomaso)^{17,18}. O rúmen, que é o primeiro estômago, é composto por milhares de microrganismos e bactérias¹⁹ que podem destruir ou modificar substâncias administradas via oral. Para passar inerte pelo rúmen, o ingrediente ativo deve ser protegido da atividade microbiana ruminal. Anderson e Minn²⁰ desenvolveram um sistema estável ao rúmen revestido com um polímero sintético sensível ao pH, comercializado como Smartamine®. Ao passar do rúmen para o abomaso, a diferença de pH, de aproximadamente 5,5 – 6,8 para 2, faz com que o sistema libere aminoácidos essenciais que serão posteriormente absorvidos pelo intestino¹⁸.

A matriz polimérica escolhida para este projeto também é estímulo responsiva ao pH e, diferentemente do produto Smartamine®, é composta por polímeros naturais. O alginato possui presença de cargas negativas em pH maiores que o pKa dos grupos carboxílicos presentes nas suas cadeias de ácidos manurônico e gulurônico, 3,38 e 3,35, respectivamente. E a quitosana possui cargas positivas em pH menor que o pKa de seus grupos aminas, que é 6,5²¹. Os dois polímeros interagem entre si por interação eletrostática, onde usualmente a quitosana é usada como uma camada externa de proteção às cápsulas de alginato. É de se esperar que em meio neutro (pH ~ 7), a insolubilidade da quitosana auxilie na conservação das características das cápsulas e impeça a desestabilização do gel. E, em meio ácido, a camada protetora de quitosana é desfeita, o que permite o intumescimento das cadeias de alginato e, conseqüentemente, liberação do material encapsulado. Essas características são desejadas para o desenvolvimento de um sistema que libere seu conteúdo em pH < 2, que é o pH do abomaso.

O desenvolvimento de um sistema de entrega pós-ruminal eficaz permitiria a implementação de alguns avanços significativos na nutrição e saúde animal em ruminantes^{18,22}. Além de abrir margem para o desenvolvimento de outras aplicações, como um método alternativo para o tratamento de carrapatos (*Rhipicephalus microplus*). Atualmente, os métodos de controle disponíveis no mercado e comumente utilizados contra esse ectoparasita são injetáveis, pulverizações/banhos e *pour-ons*, sendo os dois últimos de administração epidérmica²³.

Os tratamentos atuais para infestação de *Rhipicephalus microplus* comumente fazem uso de ativos sintéticos. A maioria dos produtos usados apresentam alta toxicidade, podendo deixar resíduos químicos em alimentos e no meio ambiente, o que representa um alto risco para a saúde humana, animal e ambiental^{23–25}. Dessa forma,

a busca por métodos menos agressivos de controle para esse ectoparasito torna-se cada vez mais necessária²⁶.

A troca da aplicação do tratamento por via oral diminui o risco de contaminação ambiental, pois o medicamento é aplicado em doses controladas e não sob a pele do animal. Uma outra possibilidade para tornar o método menos agressivo é a substituição dos ativos comerciais sintéticos por ativos naturais, o que reduz a contaminação da saúde humana e animal, pois um ativo natural, comumente, apresenta baixa toxicidade, oferecendo um risco a menos para o aplicador e para o animal. Nesse caso, uma promissora opção são os óleos essenciais (OE), conhecidos por apresentarem atividades inseticidas, bactericidas, pesticidas e repelentes²⁷⁻²⁹, o que os torna fortes candidatos a apresentarem atividade acaricida em *Rhipicephalus microplus*.

Alguns OE de frutas cítricas foram relatados pela sua atividade acaricida^{27,29,30}, principalmente os que possuem limoneno como componente majoritário. O OE escolhido neste trabalho foi o óleo essencial de bergamota (OEB), pois possui limoneno como um dos componentes majoritários e, recentemente, também foi usado em trabalho anterior do Laboratório de Parasitologia Clínica Veterinária (LPCV), sob orientação do prof. Dr. Marcelo Molento. Garbin³¹ utilizou OEB para tratar endoparasitas em ruminantes e obteve bons resultados, o que nos levou a questionar se este OE também serviria para tratar ectoparasitas.

Este projeto de mestrado, então, se propôs a desenvolver cápsulas estímulo responsivas ao pH com liberação de OEB visando o tratamento de ectoparasitas em ruminantes. As características do sistema proposto também permitem a sua aplicação em finalidades diferentes, como encapsulação de outros ativos bem como seu uso em sistemas digestivos menos complexos.

2. OBJETIVOS

2.1.1 Objetivo geral

Estudar a ação acaricida do OE de *Citrus aurantium bergamia* (bergamota), encapsulá-lo em uma matriz de alginato e quitosana e avaliar a estabilidade do sistema frente às condições ruminais.

2.1.2 Objetivos específicos

- a) Determinar a eficácia e a ação acaricida do OEB com fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* por meio de testes *in vitro*.
- b) Obter cápsulas de alginato e quitosana contendo o OEB.
- c) Caracterizar as cápsulas formadas.
- d) Avaliar a estabilidade das cápsulas em soluções tampões simulando o pH encontrado no rúmen (pH 5,5 – 7,0) e no abomaso (pH < 2).
- e) Avaliar a estabilidade das cápsulas em líquido ruminal coletado de ruminantes (teste *in vitro* digestão ruminal).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 TÉCNICAS DE ENCAPSULAÇÃO

A encapsulação de ativos é feita por meio de diversas técnicas, sendo a gelificação ionotrópica e a coacervação complexa duas metodologias amplamente utilizadas, devido a simplicidade e baixa geração de resíduos em seus processos^{9,32}. A gelificação ionotrópica se baseia na capacidade de polímeros polieletrólíticos fazerem ligações cruzadas na presença de contra íons para formar hidrogéis⁹ e a coacervação complexa se baseia na interação entre polieletrólitos de cargas opostas²¹.

Na gelificação ionotrópica, os hidrógeis podem ser obtidos pelo gotejamento de uma dispersão polimérica em uma solução aquosa com cátions multivalentes. Dessa forma, os cátions se difundem para dentro da gota polimérica e, por ligações cruzadas, há a formação de uma esfera de hidrogel (*beads*), uma estrutura formada pela reticulação das cadeias do polímero na presença dos contra-íons. Nesse processo, fatores como concentração dos polímeros, temperatura, tempo de reticulação, massa molar dos polímeros, concentração do agente reticulante e pH podem afetar a formação dos *beads*^{9,33}.

Para a liberação do conteúdo das esferas de hidrogel é necessário um relaxamento das ligações cruzadas formadas, o que pode ocorrer quando os *beads* são expostos a substâncias com forte afinidade pelo íon reticulante, de modo que essas substâncias retirem o íon da matriz polimérica, desestabilizando o hidrogel. Outro método de liberação é a exposição dos *beads* à soluções com altas concentrações de cátions não-reticulantes, nas quais os íons presentes na matriz são substituídos por íons que desestabilizam o hidrogel^{9,33}.

A coacervação complexa é uma técnica que envolve a combinação de duas dispersões poliméricas com cargas opostas que resultam na interação eletrostática entre os polímeros e formação de um complexo com solubilidade reduzida. Quando esse complexo é formado, há uma separação de fases, na qual a fase rica em polímeros (complexo polieletrólítico) coalesce sobre a outra (menos rica), formando um revestimento contínuo e dando origem à parede da microcápsula^{32,34}.

Como as cápsulas formadas nessa técnica são resultados de interações eletrostáticas, a liberação de seu conteúdo ocorrerá quando essas interações forem desestabilizadas. Isso geralmente acontece quando a matriz polimérica é exposta a pH

em que as interações polieletrólito-meio são mais favoráveis do que polieletrólito-polieletrólito.

Para aplicação médica e biológica de sistemas de liberação modificada, é necessário que o material utilizado na encapsulação apresente baixa toxicidade e alta biocompatibilidade. Tendo isso em vista, a combinação de biopolímeros naturais tem sido preferida no lugar de polímeros sintéticos devido suas características promissoras e com efeito toxicológico mínimo³⁵.

Uma combinação que vem sendo estudada é a utilização de alginato de sódio e quitosana. Isso ocorre devido à capacidade do alginato em gelificar na presença de cátions polivalentes e da possível interação eletrostática entre os dois polímeros em pH adequado^{7,36,37}. Em comparação com as cápsulas feitas somente com alginato, a incorporação da quitosana auxilia no aumento da resistência mecânica das cápsulas e dificulta a difusão do material encapsulado por formar uma barreira adicional de proteção³⁸. Ao utilizar esses dois polímeros, ocorre uma combinação das técnicas de gelificação ionotrópica e coacervação complexa. Essa combinação pode ser obtida em uma única etapa, por meio do gotejamento de uma dispersão de alginato em uma solução contendo quitosana e cátions polivalentes ou por duas etapas (*layer by layer*), de modo que a dispersão de alginato é gotejada primeiramente em uma solução com cátions e posteriormente os *beads* formados são colocados em uma dispersão de quitosana.

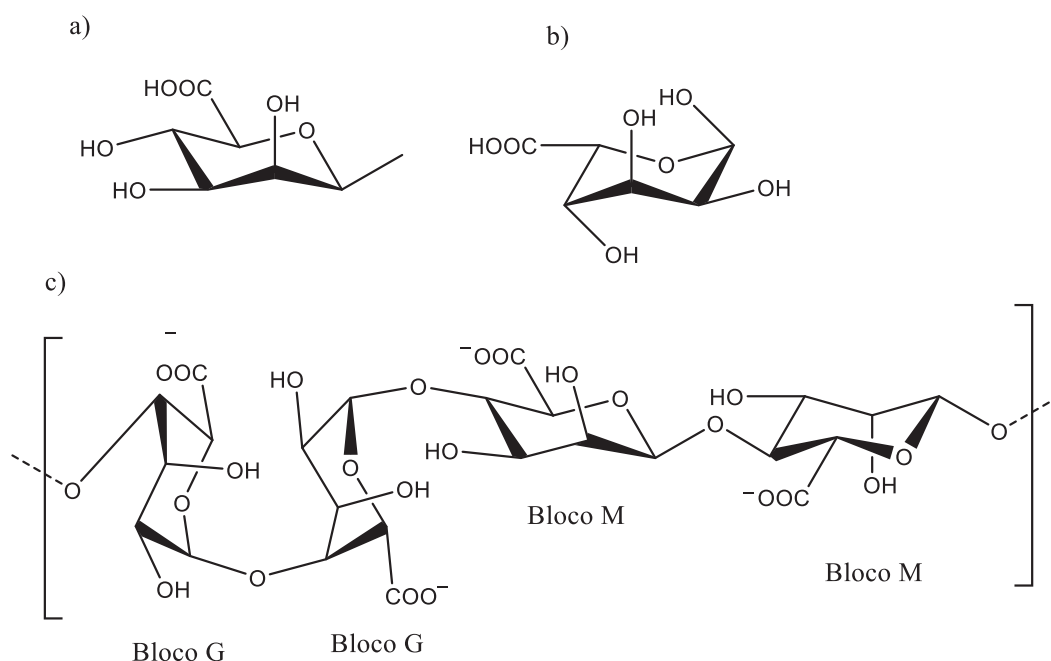
O ajuste do pH se faz necessário para garantir a interação eletrostática entre o alginato e a quitosana, que ocorre quando os grupos carboxílicos do alginato estão desprotonados, ou seja, negativamente carregados (COO^-) e os grupos aminos da quitosana estão protonados, apresentando carga positiva (NH_3^+). Para o alginato, a presença das cargas negativas ocorrem em pH maiores que o pKa dos grupos carboxílicos presentes nas cadeias dos ácidos manurônico e gulurônico, 3,38 e 3,35, respectivamente e, para a quitosana, a presença de cargas positivas ocorrem em pH menor que o pKa dos grupos aminos, que é 6,5²¹. Dessa forma, para o preparo das cápsulas em uma única etapa, a solução contendo quitosana e o cátion reticulante deve ter o pH ajustado na faixa entre 4 e 4,5.

3.2 ALGINATO DE SÓDIO

O alginato é um polímero natural extraído de algas marrons pelo tratamento com soluções alcalinas, como hidróxido de sódio (NaOH). Em virtude da sua

biocompatibilidade, baixa toxicidade, baixo custo e gelificação moderada pela adição de cátions bivalentes (exemplo: Ca^{2+}), o alginato é tipicamente usado em aplicações na área da saúde. Principalmente na forma de hidrogéis para revestimento de sistemas de liberação controlada de medicamentos, curativos, transplantes de células na engenharia de tecidos, administração oral, dentre outros. Outra grande vantagem do uso do alginato são as reações em condições brandas e sem o uso de solventes orgânicos³⁹⁻⁴¹. Em relação às suas características químicas, o alginato é um copolímero linear aniônico, composto por blocos de ácido α -L-gulurônico (Bloco G) e ácido β -D-manurônico (Bloco M) unidos por ligação 1,4-glicosídicas, conforme Figura 1.

Figura 1. a) Estrutura molecular do ácido β -D-manurônico (Bloco M). b) Estrutura molecular do α -L-gulurônico (Bloco G). c) Exemplo aleatório de uma cadeia de alginato.



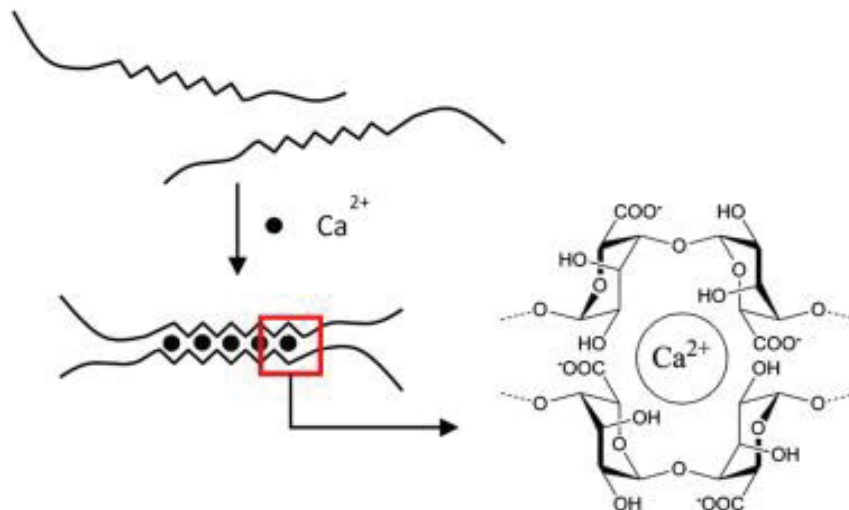
FONTE: Adaptado de Lee *et al.*, (2012)³⁹.

A estrutura básica do alginato consiste em unidades lineares não ramificadas de monômeros que podem estar dispostos em sequência consecutiva de ácido gulurônico, uma consecutiva de resíduos de ácido manurônico e/ou uma sequência alternada entre eles. O arranjo e a proporção dos monômeros são dependentes do tipo de extração e da fonte de alginato, o que determina sua massa molar, suas propriedades físicas e de estruturas derivadas desse polímero^{38,39}.

Uma das características mais interessantes do alginato consiste em sua capacidade de gelificar na presença de cátions multivalentes. Para cátions divalentes, essa gelificação ocorre pela formação de ligações cruzadas entre os cátions e as hidroxilas (OH) e carboxilatos (COO^-) do Bloco G e pela interação entre estes blocos e

os Blocos G de cadeias adjacentes, levando a formação de uma estrutura conhecida como *egg-box*, o que caracteriza um hidrogel forte, rígido e poroso (Figura 2)^{12,40,42}.

Figura 2. Estrutura *egg-box* formada na interação entre o ácido gulurônico e o cátion Ca^{2+} .



FONTE: Paques *et al.*, (2014)⁴²

As características do hidrogel formado dependem da concentração e afinidade dos cátions com as cadeias de alginato, bem como da proporção e ordem sequencial dos monômeros M e G. Isto porque a estrutura *egg-box* ocorre pela interação preferencial com o Bloco G do polímero para cátions divalentes^{38,39,43}. Essa interação preferencial ocorre devido à existência de um vazio formado quando duas regiões de Blocos G estão alinhadas, por possuir dimensões ideais para interação com íons divalentes, conforme pode ser observado na Figura 1c¹².

Já para cátions trivalentes, como Fe^{3+} ou Al^{3+} , o mecanismo de reticulação ainda não está definido. O que é de comum acordo entre os autores é que a interação do cátion com o alginato não ocorre somente com o Bloco G, mas também com o Bloco M. E que o tipo de estrutura formada é diferente do modelo *egg-box*, o qual é formado num plano bidimensional. Alguns autores acreditam que a interação de cátions trivalentes com o alginato leva a formação de uma estrutura tridimensional^{33,44–46}. Dessa forma, o hidrogel formado por cátions trivalentes tem aspecto mais denso e compacto, sendo mecanicamente mais rígido.

3.3 QUITOSANA

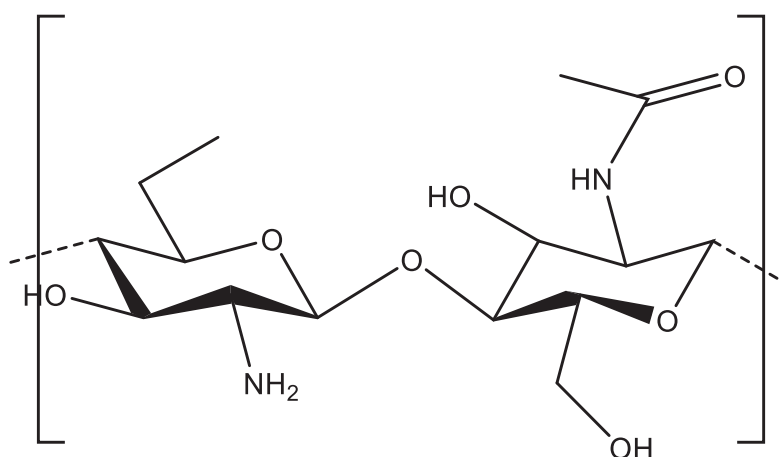
A quitosana é um polissacarídeo obtido pela *N*-desacetilação parcial ($\geq 40\%$) ou total da quitina, que é um polissacarídeo natural de grande importância, pois é sintetizada por um enorme número de organismos vivos e é o segundo polímero mais

abundante no mundo, atrás apenas da celulose. Na natureza, a quitina está presente como componente estrutural de exoesqueletos de artrópodes ou nas paredes celulares de fungos e leveduras, exercendo como principal função a resistência mecânica desses organismos^{40,47}.

O processo de desacetilação parcial da quitosana consiste na transformação de uma parte dos grupos acetamidas (NHCOH_3) presente na quitina em aminas (NH_2). A presença dos grupos amino, em contraste com a quitina, permitem a solubilidade da quitosana em meios ácidos devido a protonação desses grupos (formando NH_3^+). Além disso, a quitosana é um polímero biocompatível, biodegradável, não tóxico e com atividade biocida, o que torna esse polímero um forte candidato para aplicações alimentícias e farmacêuticas^{36,47}.

A quitosana pode apresentar diferentes graus de desacetilação (GD) devido às variáveis presentes no processo, como temperatura, tempo de reação e concentração da solução alcalina, por exemplo. Os GD podem influenciar na solubilidade do polímero em meio ácido, no preparo de derivados de quitosana e na solubilidade desses derivados⁴⁷. Em relação às suas características químicas, a quitosana é um copolímero linear composto por unidades de 2-acetamido-2-desoxi-D-glucose e 2-amino-2-desoxi-D-glicose unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$, conforme evidenciado na Figura 3⁴⁰.

Figura 3. Estrutura molecular da quitosana.



FONTE: Adaptado de Dutta *et al.*, (2004)⁴⁸.

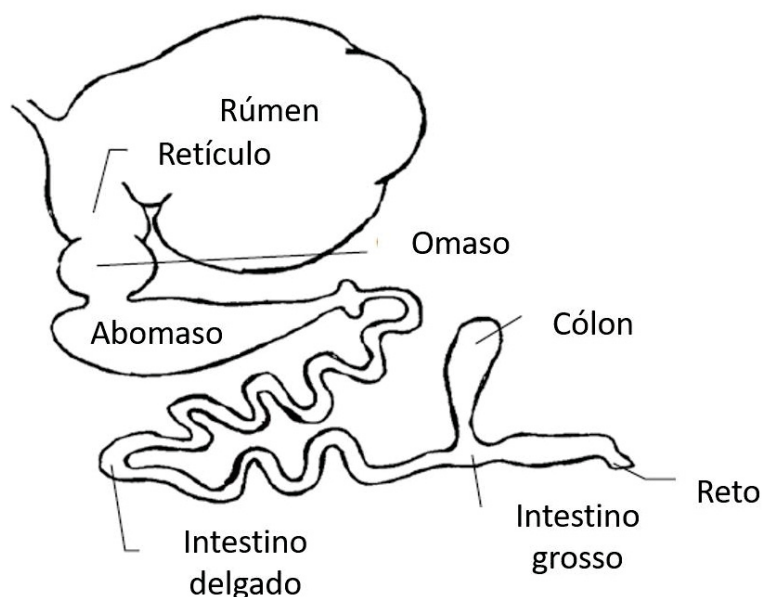
3.4 TRATO DIGESTIVO RUMINANTES

Os ruminantes (ex. bovinos, ovelhas, caprinos, girafas, dentre outros), apresentam quatro estômagos: retículo, rúmen, omaso e abomaso (Figura 4). O alimento é ingerido, mastigado e enviado para o rúmen e o retículo por intermédio do

esôfago, onde é regurgitado para cavidade oral, sendo novamente mastigado. Esse processo recebe o nome de ruminação e é característico de ruminantes. O bolo alimentar sofre a primeira digestão fermentativa no rúmen e, após a ruminação, é conduzido para o omaso. Este é responsável por filtrar partículas maiores e absorver água. Em seguida, o restante é transportado para o abomaso, responsável pela digestão enzimática do alimento^{18,19}.

O rúmen, primeiro estômago desses animais, é uma câmara fermentativa composta por um ambiente anaeróbico com milhares de microrganismos e bactérias. Esse estômago é responsável pela digestão da celulose, hemicelulose, amido, proteínas e lipídeos^{18,19}. A composição do rúmen dificulta a criação de medicamentos/suplementos via oral devido a necessidade de proteção das substâncias frente a esse ambiente. Outra dificuldade encontra-se na série de pHs distintos ao longo do percurso pelo trato digestivo. Começando em pH 5,5 – 7,0 no retículo e rúmen, passando para 2,0 – 3,0 no abomaso e 7,0 – 8,0 no intestino^{18,19,22}. Além disso, para criação de um produto que libere seu conteúdo depois do rúmen, é necessário que este seja menor que 2 mm²⁰. Esse tamanho permite a passagem direta do rúmen para o abomaso sem ser retido pelo retículo. Ao passar direto pelo rúmen, o produto também passa isento pelo processo de regurgitação e, com isso, evita ser destruído nesse processo.

Figura 4. Ilustração do trato digestivo de ruminantes.



FONTE: Adaptado de Millen e colaboradores¹⁹.

3.5 ÓLEOS ESSENCIAIS E SUA AÇÃO ACARICIDA EM RHIPICEPHALUS MICROPLUS

Os OE são metabolitos secundários de plantas e desempenham funções ecológicas importantes para sua proteção contra herbívoros e patógenos, além de servir para a atração de polinizadores através da cor, aroma e sabor^{49,50}. OE são líquidos límpidos, voláteis e com forte odor, que podem conter diversos componentes em concentrações variadas, formando um complexo natural de substâncias lipofílicas⁵¹. Nesse complexo pode existir a presença de mais de um ativo químico, tornando os OE candidatos interessantes para o desenvolvimento de fitoterápicos acaricidas⁵¹.

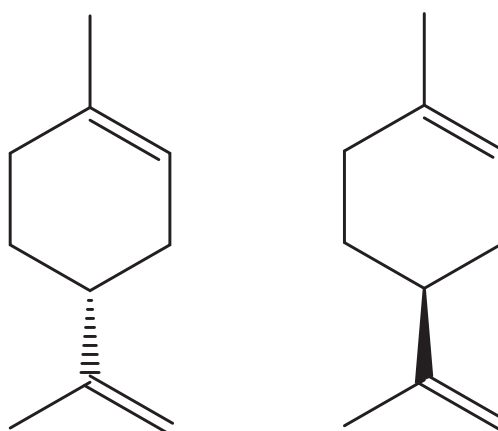
Um ectoparasita que carece de um tratamento com ativos naturais é o *Rhipicephalus microplus*, visto que a maioria dos tratamentos comerciais disponíveis fazem uso de ativos sintéticos^{52,53}. Esses ativos são geralmente tóxicos e sua aplicação indiscriminada e prolongada pode levar a consequências indesejadas como o desenvolvimento de carrapatos resistentes aos acaricidas utilizados²³. Dito isso, o uso dos OE pode auxiliar nesse problema de resistência. Isso devido a sua composição, que pode ter diversos componentes majoritários e até mesmo mais de um com potencial atividade acaricida^{52,53}. Essa característica difere os OE da maioria dos tratamentos acaricidas comerciais, que fazem uso de um único ativo em sua composição.

No Brasil, as infestações desse ectoparasita trazem grandes prejuízos econômicos. Os valores são estimados em US\$ 3 bilhões anuais⁵⁴ e estão relacionados aos danos causados no animal, como perda de peso, redução na produção de leite e lesões na pele²³. O prejuízo econômico também pode ser atribuído aos inúmeros gastos realizados pelos pecuaristas no combate deste parasita, por meio da compra de acaricidas e despesas relacionadas à aplicação dos mesmos.

Estudos envolvendo o desenvolvimento de um tratamento com OE para *Rhipicephalus microplus* tem sido alvo de grande interesse na última década⁵⁵, inclusive no Brasil⁵⁶. Na literatura, OE extraídos de frutas cítricas foram relatados pelo seu alto potencial acaricida^{27,29,30}, principalmente OE com limoneno como componente majoritário. O limoneno (1-metil-4-isopropenil-ciclo-hex-1-eno), cuja estrutura está representada na Figura 5, é um terpeno monocíclico que possui duas formas enantioméricas R e S. A forma R é a mais abrangente em OE obtidos das cascas de *Citrus* sp e a forma S, em OE das espécies *Pinus* e *Mentha*⁵⁷.

Vinturelle e colaboradores⁵⁸, obtiveram 100 % de mortalidade no teste de imersão de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* com 10 % de OE limão siciliano, que possui 50,3 % de limoneno em sua composição. Pazinato e colaboradores³⁰ testaram 10 % (m/V) de OE de bergamota (OEB), com 30 % de limoneno, e obtiveram 90 % de eficácia contra o carrapato *Rhipicephalus microplus*. O trabalho de Pazinato foi um dos únicos encontrados sobre esse tema. Isso demonstra que o OEB carece de estudos contra o carrapato bovino.

Figura 5. Estrutura (R)-limoneno (esquerda) e (S)-limoneno (direita).



FONTE: Adaptado de Erasto *et al.*, (2008)⁵⁷.

O OEB tem inúmeras aplicações industriais, desde a confecção de perfumes, cosméticos e alimentos até medicamentos⁵⁹. Na indústria farmacêutica, o OEB é usado tanto para absorver os odores desagradáveis dos medicamentos quanto por suas propriedades antissépticas e bactericidas. Recentemente, o OEB também foi estudado para tratamento de *Haemonchus contortus*, um endoparasita presente no abomaso de ruminantes³¹.

Em virtude das características acima citadas, o OEB foi escolhido para ser avaliado como possível tratamento do carrapato bovino *Rhipicephalus microplus*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

O OEB foi adquirido da empresa Ferquima Indústria e Comércio Ltda (Vargem Grande Paulista, Brasil) e o composto isolado limoneno ((R)-Limoneno) foi adquirido da Sigma Aldrich®.

No preparo das cápsulas utilizou-se alginato de sódio e quitosana (> 75 % desacetilação) da marca Sigma Aldrich®. Os agentes reticulantes foram sulfato de cobre penta-hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (Synth) e cloreto de ferro (III) hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Vetec). Todas as dispersões poliméricas e soluções dessa etapa foram preparadas em água destilada.

Os demais reagentes utilizados são de alto grau de pureza, sendo eles: polisorbato 80 (Neon), ácido acético glacial (CH_3COOH) (Neon), ácido clorídrico (HCl) (Synth), hidróxido de sódio (NaOH) (Biotec), cloreto de sódio (NaCl) (Êxodo), cloreto de potássio (KCl) (Biotec), fosfato dissódico (Na_2HPO_4) (Synth), fosfato monopotássico (KH_2PO_4) (Synth), e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (Sigma Aldrich®). Os tampões foram preparados em água ultrapura com resistividade controlada em $18,2 \mu\Omega \text{ cm}$, purificada pelo sistema Millipore-Simplicity UV (Bedford, USA).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Caracterização do OEB e do composto isolado por GC-MS

O cromatógrafo a gás utilizado foi GCMS2010 Plus Shimadzu acoplado a um espectrômetro de massas em tandem do tipo triplo quadrupolo (TQ8040) e auto amostrador (AC 5000 Coluna SH-Rtx- 5MS 30m x 0,25mm; 0,25 μm) e gás hélio (5.0) como gás de arraste. Para as determinações cromatográficas, as amostras foram previamente solubilizadas em hexano grau HPLC na concentração 1 mg L⁻¹ e injetadas no sistema GC-MS. Utilizou-se uma rampa de aquecimento com início à 60°C por 3 minutos, com aumento de 4°C/min até 270°C, perfazendo um total de 77 minutos de análise. A temperatura do injetor foi de 250°C. O volume de amostra injetado foi de 1 μL aplicando-se o modo de injeção split, fonte de íons à 270°C, interface à 270°C e vazão de gás hélio a 3 mL min⁻¹.

Os dados cromatográficos e espectrais foram analisados por meio do software GCMS Solution®, no modo fullscan m/z 40 – 400. A elucidação dos compostos foi realizada por similaridade (acima de 90 %) dos espectros de massa de cada pico identificado no cromatograma, utilizando dados da biblioteca NIST/EPA/NIH 2014.

4.2.2 Testes de Ação Acaricida

Os testes foram realizados em colaboração com o Laboratório de Parasitologia Clínica Veterinária do departamento de Medicina Veterinária da UFPR sob orientação do Prof. Dr. Marcelo Beltrão Molento e da técnica bióloga Ursula Yoshitani.

As teleóginas utilizadas nos biocarrapaticidogramas foram previamente coletadas de bovinos naturalmente infestados no Centro Paranaense de Referência em Agroecologia (CPRA), localizado em São José dos Pinhais, PR. O CPRA não faz uso de tratamentos sintéticos disponíveis no mercado desde 2005. Essa prática permite afirmar que as teleóginas utilizadas nos testes não apresentavam qualquer tipo de resíduo aos tratamentos sintéticos disponíveis.

4.2.2.1 Biocarrapaticidograma

A realização do biocarrapaticidograma seguiu-se em acordo com o método descrito por Drummond⁶⁰. Fêmeas adultas de *Rhipicephalus microplus* foram pesadas e separadas em grupos com 10 teleóginas de pesos homogeneamente semelhantes em cada, conforme exemplificado na Figura 6.

Figura 6. Fêmeas teleóginas de *Rhipicephalus microplus* acondicionadas em copos plásticos e separadas em grupos com peso homogeneamente distribuído.



FONTE: A Autora (2021).

Cada grupo foi submetido à um banho de imersão de 5 mL em soluções previamente preparadas do composto isolado (R)-Limoneno e OEB nas concentrações 1, 2, 4 e 6 % (m/V) em água destilada, polisorbato 80 a 2 % (m/V) e de álcool etílico 50 % (V/V) em cada.

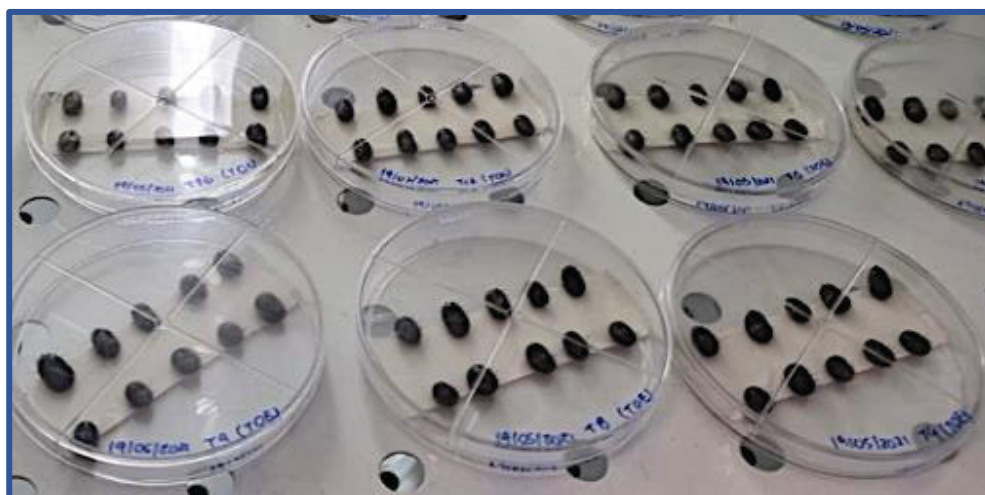
Para melhor avaliação do teste, foram feitas 3 soluções de controle, conforme descrito na Tabela 1. A imersão ocorreu sob agitação manual por 5 minutos e depois as teleóginas foram secas com papel toalha. Todas as soluções e testes com carrapatos foram feitos em triplicata.

Tabela 1. Grupos controles positivo e negativo e suas soluções utilizados nos testes de biocarrapaticidograma.

Grupo Controle (GC)		Solução
Negativo	CN 1	Água
	CN 2	Água, polisorbato 80 2 % (m/V) e álcool etílico 50 % (V/V)
Positivo	CP	Acaricida comercial Colosso FC30®

Os grupos foram colocados individualmente em placa de petri e as teleóginas foram fixadas em fita dupla-face com a parte ventral voltada para cima e a porção anterior voltada para fora. Desse modo a postura dos ovos ocorreu fora da fita dupla-face. As placas de petri com as fêmeas de *R. microplus* foram mantidas em estufa a 27°C e 70-80 % de umidade relativa por 14 dias (Figura 7).

Figura 7. Teleóginas separadas e fixadas em fita dupla-face dentro da estufa controlada.



FONTE: A Autora (2021).

Após o período de postura, os ovos foram removidos das placas e pesados para obter-se os dados de postura total. Os ovos de cada grupo foram transferidos para tubos de ensaio, os quais foram vedados com tampa de algodão e mantidos em estufa, nas mesmas condições por 26 dias para incubação e eclosão dos ovos. Depois desse tempo, foi feita a leitura da eclodibilidade das larvas, comparando o número de ovos

remanescentes não eclodidos, com as cascas e a visualização das larvas na parede do tubo de ensaio.

A eficiência reprodutiva (ER) e a eficácia do produto (EP) foram determinados a partir da e , em acordo com Drummond⁶⁰:

$$ER = \frac{\text{Peso total dos ovos (g)} \times \% \text{ eclos\~ao} \times 20.000}{\text{peso das f\~emeas ingurgitadas (g)}} \quad \text{Equa\~ao 1.}$$

$$EP = \frac{ER \text{ do grupo controle} - ER \text{ do grupo tratado} \times 100}{ER \text{ do grupo controle}} \quad \text{Equa\~ao 2.}$$

Os dados obtidos nos testes de biocarrapaticidograma foram avaliados estatisticamente pelo teste t para amostras independentes com 95 % de confian\~ca, utilizando o software OriginPro 2018[®].

4.2.2.2 Interpreta\~ao dos Resultados do Biocarrapaticidograma

As posturas das teleóginas são classificadas em completa, parcial, inviável e sem postura. A avalia\~ao entre a postura completa e parcial é feita pela apar\~encia das teleóginas, sendo considerado uma postura completa quando a mesma apresenta um formato de “L”, com o final da a parte ventral dorsal para cima e o resto do corpo achatado (Figura 8) e a postura parcial é evidenciada quando a teleógina não atinge essa característica. Já a classifica\~ao inviável está relacionada à apar\~encia dos ovos, ou seja, é atribuída aos ovos com colora\~ao marrom escura e aspecto seco, visto que os ovos viáveis apresentam colora\~ao marrom claro e um certo “brilho”. O termo inviável é utilizado pois essa postura não eclodirá em larvas. Já a classifica\~ao sem postura refere-se às fêmeas que não tiveram postura.

Figura 8. Placa com teleóginas após postura dos ovos. Em vermelho está destacado uma postura completa, com a teleóquina em formato “L”.



FONTE: A Autora (2022).

4.2.2.3 Teste de Pacote de Larvas (TPL)

A realização do teste de pacote de larvas seguiu-se o método descrito por Chagas⁶¹. Fêmeas adultas de *R. microplus* ingurgitadas foram acondicionadas em estufa climatizada ($\pm 27^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa $> 80\%$) para a produção de ovos e larvas. Neste teste, foram utilizadas larvas com 14 a 21 dias de idade após a eclosão.

As soluções testadas no TPL foram OEB nas concentrações 2 e 4 % (m/V) em água destilada, álcool etílico 50 % (V/V) e polisorbato 80 2 % (m/V). Para melhor avaliação do teste, foram feitas 3 soluções de controle, iguais as descritas na Tabela 1 do item 4.2.2.1.

Aproximadamente 100 larvas foram colocadas em papel filtro 2x2 cm e impregnadas com 100 μL de solução em cada lado do papel. O papel contendo as larvas e a solução testada foi dobrado formando um envelope e vedado por pregadores de metal, conforme Figura 9. Os envelopes foram armazenados sob uma bandeja e em estufa climatizada ($\pm 27^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa $> 80\%$) por 24 h. Esse procedimento foi feito para todas as soluções testadas e em quadruplicata.

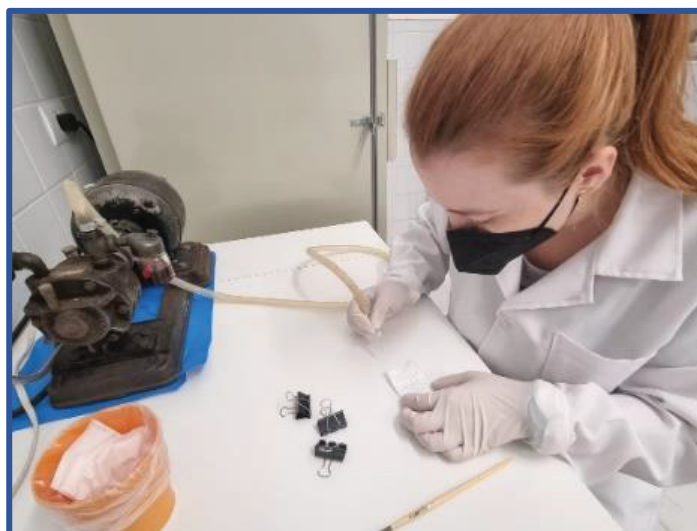
Figura 9. Bandeja contendo os envelopes do TPL antes do armazenamento em estufa climatizada.



FONTE: A Autora (2022).

Após 24 h, os pregadores de metal foram retirados para abertura dos envelopes e as larvas foram contadas com o auxílio de uma bomba à vácuo. Para isto, foi colocado um tecido voal em uma ponteira e este sistema foi anexado à mangueira da bomba, permitindo a sucção das larvas vivas e mortas para contagem sem que elas entrassem na bomba (Figura 10). Larvas completamente imóveis foram consideradas mortas.

Figura 10. Contagem das larvas vivas e mortas após 24 h por sucção com o auxílio da bomba à vácuo.



FONTE: A Autora (2022).

A mortalidade das larvas foi avaliada em acordo com as equações abaixo (Equação 3 e Equação 4).

$$Mortalidade = \frac{\text{larvas mortas}}{\text{total de larvas}} \times 100 \quad \text{Equação 3.}$$

$$Mortalidade\ média = \frac{\text{soma da mortalidade de cada repetição}}{4} \times 100 \quad \text{Equação 4.}$$

Os dados obtidos no TPL foram avaliados estatisticamente pelo teste t para amostras independentes com 95 % de confiança, utilizando o software OriginPro 2018®.

4.2.3 Caracterização do alginato de sódio

4.2.3.1 Determinação da Massa Molar Média Ponderal (M_w) por HPSEC

As análises de cromatografia de exclusão por tamanho de alta performance (HPSEC) foram realizadas no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, em cromatógrafo equipado com detector de índice de refração diferencial (IR), modelo WATERS 2410, e com detector de espalhamento de luz laser com ângulo reto (RALS) WYATT TECHNOLOGY, modelo DAWN DSP com 18 canais acoplados em série. Utilizaram-se quatro colunas de gel permeação ultrahidrogel WATERS em série, com limites de exclusão de 7×10^6 g mol⁻¹, 4×10^5 g mol⁻¹, 8×10^4 g mol⁻¹ e 5×10^3 g mol⁻¹. Foi injetado 100 µL de amostra a um fluxo de 0,6 mL min⁻¹.

O detector IR mediu a variação no índice de refração entre os eluentes, com e sem a presença do polímero. Já o RALS relacionou a intensidade da luz espalhada pela amostra com o tamanho das partículas, o que possibilita a determinação das massas molares média, numérica e ponderal⁶².

A amostra de alginato de sódio foi dispersa na concentração 1 mg mL⁻¹ em nitrito de sódio (NaNO₂) 0,1 mol L⁻¹ e 200 ppm de azida de sódio (NaN₃), solvente utilizado também como fase móvel. Antes de ser injetada no equipamento, a amostra foi filtrada com filtro Millipore de porosidade 0,22 µm.

A determinação do incremento do índice de refração (dn/dc) foi realizada usando um refratômetro diferencial Waters, modelo 2410. Para isso, cinco dispersões de alginato foram preparadas em diferentes concentrações (0,2 mg mL⁻¹; 0,3 mg mL⁻¹; 0,4

mg mL⁻¹; 0,5 mg mL⁻¹; 0,6 mg mL⁻¹) no eluente supracitado e filtradas com filtro Millipore de porosidade 0,22 µm. O valor de dn/dc foi calculado pela

$$\Delta n = V \cdot \frac{d(\Delta n)}{dV} \quad \text{Equação 5.}$$

Onde Δn é o índice de refração diferencial da amostra, V é a voltagem obtida em cada concentração e $\frac{d(\Delta n)}{dV}$ é a constante de calibração RI, cujo valor utilizado foi $7,1813 \cdot 10^{-5}$. dn/dc foi obtido pela inclinação da reta em uma curva de Δn pela concentração.

Para interpretação dos dados e obtenção do valor da massa molar ponderal média ($\bar{M}_w$), utilizou-se o software ASTRA versão 4.70.07®.

4.2.3.2 Determinação da razão M/G por RMN

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) para as amostras de alginato foram adquiridos no Centro de Ressonância Magnética Nuclear da UFPR, no Departamento de Bioquímica e Biologia Celular em espectrômetro Bruker, modelo AVANCE DRX-600MHz. As amostras foram dispersas em D₂O, em tubos de 5 mm, a concentração de 10 mg mL⁻¹. Os espectros de ¹H foram adquiridos a 70°C, com 128 *scans* e ácido trimetilsilil propiônico (TMSP) como padrão.

Para determinação da razão entre os ácidos manurônicos e gulurônicos (M/G) presentes no alginato foi utilizada a metodologia descrita por Jensen e colaboradores⁶³, conforme abaixo:

$$\frac{M}{G} = \frac{I_B + I_C - I_A}{I_A} \quad \text{Equação 6.}$$

Em que I_A corresponde à integral dos sinais de H1 das unidades de ácido gulurônico (região de 4,96 a 5,18 ppm), I_B corresponde a integral dos sinais de H5 das unidades de ácido gulurônico adjacentes a ácidos manurônicos e aos sinais de H1 das unidades de ácidos manurônicos (região de 4,57 – 4,82 ppm) e I_C corresponde a integral dos sinais de H5 de ácidos gulurônicos (região 4,38 – 4,55 ppm).

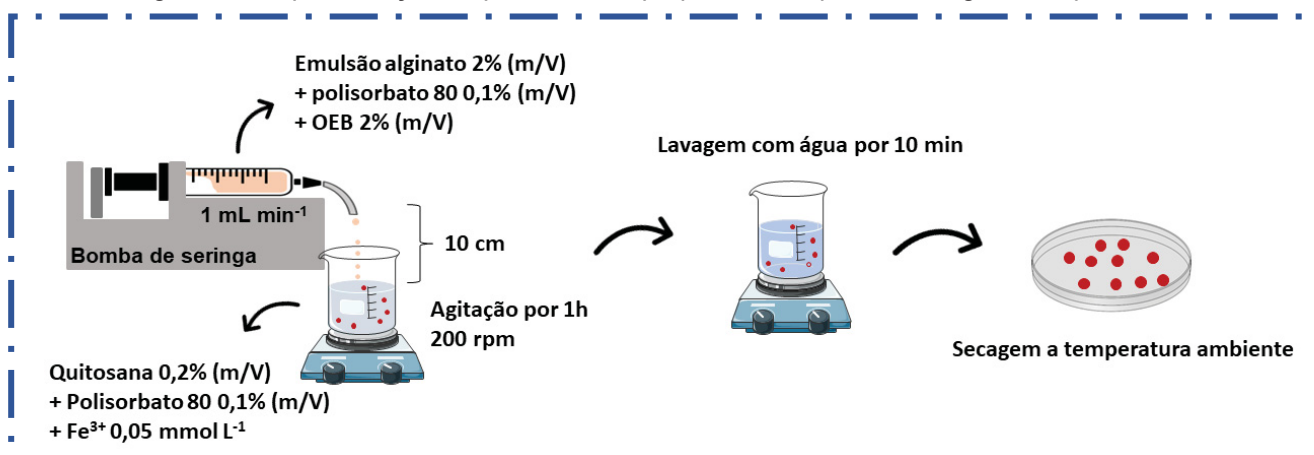
4.2.4 Preparo das cápsulas de alginato e quitosana

Altas velocidades de agitação podem ser prejudiciais para a formação de uma cápsula esférica, visto que ao entrar em contato com a solução, a gota pode ser arrastada, levando a obtenção de cápsulas com formatos irregulares, alongados ou

com a presença de “caudas”. No caso do fluxo de gotejamento, se este for muito rápido, as gotas caem muito próximas uma da outra na solução, o que atrapalha o tempo de formação das cápsulas. A distância entre a ponta da agulha e a solução deve ser suficiente para que a gota adquira o seu formato esférico antes de entrar em contato com a solução. Para este trabalho, as condições que melhor se adaptaram para a obtenção de cápsulas esféricas foram: agitação lenta (200 rpm), fluxo 1 mL min^{-1} e distância de 10 cm.

Foram preparadas dispersões poliméricas de alginato em água destilada na concentração 2 % (m/V) (0,5 g em 25 mL) e de quitosana em ácido acético $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na concentração 0,02 % (m/V) (0,08 g em 40 mL). As dispersões foram mantidas sob agitação constante durante 24 h em temperatura ambiente ($20 - 25^\circ\text{C}$). Em sequência, adicionou-se 0,1 % (m/V) de polisorbato 80 nas dispersões e ambas foram mantidas sob agitação para dissolução do surfactante. Após esse período, adicionou-se OEB na dispersão de alginato na proporção 1:1 (m/m), a qual foi mantida sob forte agitação para formação de uma emulsão. O pH da dispersão de quitosana foi alterado para 4 – 4,5 com solução de hidróxido de sódio 5 % (m/V). Posteriormente, adicionou-se cloreto de ferro III hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) em quantidade suficiente para concentração final ser 50 mmol L^{-1} de agente reticulante (M^{n+}). 20 mL da emulsão de alginato e OEB foram coletados com uma seringa de vidro e gotejados sob fluxo de 1 mL min^{-1} , com o auxílio de uma bomba de seringa em cima da dispersão de quitosana e agente reticulante, que estava sendo agitada a 200 rpm. A distância entre a ponta da agulha acoplada a seringa de vidro e a dispersão de quitosana foi de 10 cm. As cápsulas formadas foram mantidas sob agitação na dispersão de quitosana e agente reticulante por 1 h, depois foram filtradas e colocadas em água ultrapura por 10 min. Em sequência, as cápsulas foram novamente filtradas e colocadas sob placa de petri para secagem em temperatura ambiente. Após a secagem, as cápsulas foram armazenadas em 4°C . Para melhor compreensão, uma representação esquemática da metodologia de preparo das cápsulas pode ser encontrada na Figura 11.

Figura 11. Representação esquemática do preparo das cápsulas de alginato e quitosana.



FONTE: A Autora (2022).

A metodologia representada acima foi seguida durante todo o preparo das cápsulas. No entanto, alguns parâmetros foram variados e estudados ao longo da execução desse projeto. Isso porque várias condições experimentais podem influenciar diretamente nas características das cápsulas formadas, como a velocidade de agitação, fluxo de gotejamento, distância entre a ponta da agulha e a solução com M^{n+} , ajuste do pH, concentração dos polímeros, tipo e concentração do M^{n+} . Os parâmetros alterados estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros avaliados durante o preparo das cápsulas de alginato e quitosana, sendo estes a proporção entre alginato/quitosana (m/m), tipo de agente reticulante utilizado (M^{n+}) na concentração 0,1 mol L⁻¹, proporção alginato/ (m/mol L⁻¹).

Parâmetros avaliados	
Proporção entre alginato/quitosana (m/m)	5:1 / 3:1 / 2:1 / 1:1
Tipo de agente reticulante (M^{n+}) 0,1 mol L ⁻¹	Cu ²⁺ / Fe ³⁺
Proporção alginato/ M^{n+} (m/mol L ⁻¹)	1:0,01 / 1:0,02 / 1:0,05 / 1:0,075

FONTE: A Autora (2022).

4.2.1 Caracterização das cápsulas

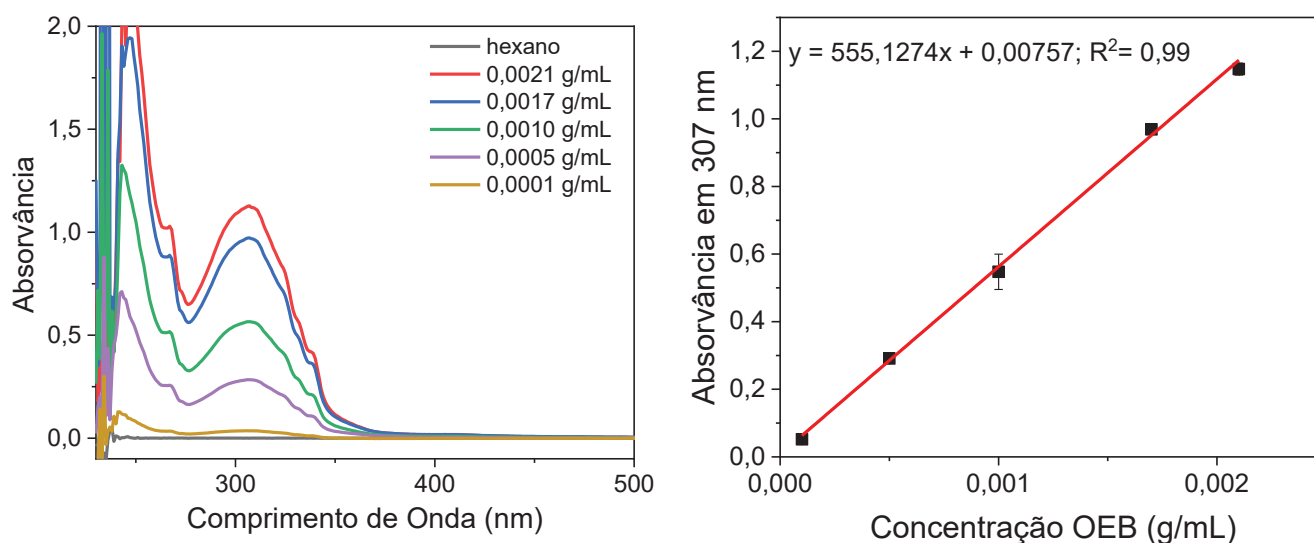
4.2.1.1 Eficiência de encapsulação (EE %)

Para calcular a eficiência de encapsulação do OEB, 0,03 g de cápsulas foram adicionadas em 3 mL de hexano e trituradas com o auxílio de uma espátula fina até completa destruição. Em sequência, uma alíquota do sobrenadante foi retirada e analisada por espectrofotometria no UV-Vis na faixa de 200 a 800 nm.

Para determinar a quantidade de OEB presente em hexano, curvas analíticas foram construídas previamente em triplicata. Na Figura 12 é possível identificar o comportamento do OEB em hexano e a curva analítica. A absorvância máxima apresentada foi em 307 nm e a obtida está apresentada abaixo.

$$y = 555,1274 + 0,00757 \text{ com } R^2 = 0,99 \quad \text{Equação 7.}$$

Figura 12. Espectro UV-Vis do OEB em hexano (esquerda) e curva analítica (direita). A curva analítica relaciona a absorvância máxima do OEB em hexano em 307 (eixo y) e a sua respectiva concentração em g/mL (eixo x).



FONTE: A Autora (2022).

Para calcular a EE %, utilizou-se a descrita acima e abaixo.

$$\frac{m_t \text{ OEB encontrada no sobrenadante}}{m_i} \quad \text{Equação 8.}$$

Onde m_t refere-se a massa total de OEB e m_i , a massa inicial de OEB adicionada.

Essa análise foi feita em triplicata após secagem completa das cápsulas (3 dias em temperatura ambiente entre 20 – 25°C) e no dia dos testes de liberação, a fim de verificar se a quantidade de OEB se manteve constante entre a secagem e os testes.

4.2.1.2 Espectroscopia no infravermelho (FTIR)

Nessa etapa, utilizou-se o espectrofotômetro de infravermelho Vertex 70 (IR médio e NIR) localizado no Laboratório de Espectroscopia de Absorção no Infravermelho dentro do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (DQUI – UFPR). Os espectros foram obtidos em temperatura ambiente (20 – 25 °C), de

400 a 4000 cm^{-1} , utilizando pastilhas de KBr, a um total de 32 acumulações por espectro e resolução de 4 cm^{-1} .

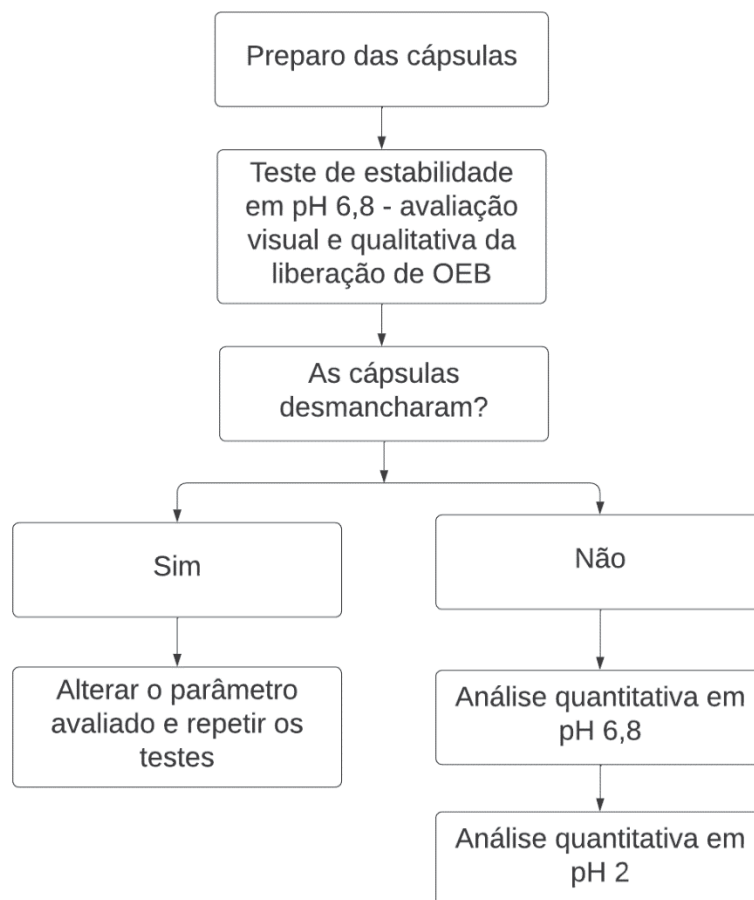
Para a análise, duas cápsulas de cada formulação foram trituradas e misturadas em KBr previamente ao preparo da pastilha. Além das cápsulas, os polímeros alginato e quitosana, bem como o OEB também foram caracterizados por FTIR. No caso do OEB, foi colocado uma gota de óleo sobre uma pastilha de KBr.

4.2.2 Estabilidade das cápsulas com variação do pH

Segundo Pell e colaboradores⁶⁴, um sistema útil, de baixo custo e fácil de ser feito para a triagem de sistemas promissores à degradação ruminal é colocar esses materiais em tampão fosfato (pH 5,5 – 6,8) por 24 h à 40°C. Essas condições imitam as encontradas no rúmen. Se os materiais se dissolverem nesse meio, é improvável que sobrevivam à degradação ruminal. No entanto, permanecerem intactos durante o teste não é uma garantia que sobreviverão à fermentação microbiana de fato. Essa etapa também teve como base o trabalho de Cao e colaboradores⁶⁵, que desenvolveram um sistema *rumen by-pass* com *pellets* revestidos e, em seus testes, utilizaram tampão fosfato (PBS) 0,05 mol L⁻¹ com pH 6,8 para simular o pH encontrado no rúmen.

A estabilidade das cápsulas foi avaliada pela liberação do OEB em pH 6,8 e 2 em todas as formulações propostas, seguindo o fluxograma da Figura 13. A liberação foi medida por espectrofotometria no UV-Vis (em triplicata) e cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas no modo de injeção *Headspace*.

Figura 13. Fluxograma realizado para a avaliação da estabilidade das cápsulas.



FONTE: A Autora (2022).

4.2.2.1 Estabilidade em pH 6,8

Para as análises qualitativas de estabilidade, aproximadamente 0,03 g de cápsulas foram colocadas em 3 mL de tampão fosfato (PBS) 0,05 mol L⁻¹ com 0,1 % (m/V) de CTAB sob agitação constante a 40°C por 24 h. A cada 1h durante as seis primeiras horas de análise, uma alíquota de cada solução foi retirada, centrifugada em microtubos de 2 mL por 2 minutos, em centrífuga de bancada MiniSpin da Eppendorf®, a 13400 rpm. O sobrenadante foi analisado em espectrofotômetro UV-Vis Agilent® Cary 60 na faixa de 200 a 800 nm. O mesmo procedimento foi feito para alíquotas retiradas após 24 h.

Para as análises quantitativas, o método utilizado foi mensurar o quanto de OEB sobrou dentro das cápsulas no período de 1 a 6 h e 24 h. Para isso, pesou-se 0,03 g de cápsulas em frascos distintos, adicionou-se 3 mL de tampão PBS 0,05 mol L⁻¹ em cada frasco sob agitação constante a 40°C. Nos intervalos de 15, 30, 45, 60, 120, 240, 360 min e 24 h, as cápsulas foram filtradas, adicionadas em 3 mL de hexano e trituradas

com o auxílio de uma espátula fina até a destruição completa das cápsulas. Em sequência, uma alíquota do sobrenadante foi retirada e analisada por espectrofotometria no UV-Vis na faixa de 200 a 800 nm. A quantidade de OEB foi determinada pela Equação 7, apresentada no item 4.2.1.1.

Para a análise com injeção *Headspace*, utilizou-se o mesmo sistema cromatográfico Shimadzu® descrito anteriormente (item 4.2.1). Para o preparo das amostras, 0,04 g de cápsulas foram adicionadas em frascos vials com 5 mL de tampão PBS e, após 24 h, os componentes voláteis foram medidos. Os parâmetros *Headspace* foram volume de injeção 500 µL e tempo de incubação de 15 min a 100°C. Para a cromatografia, utilizou-se rampa de aquecimento com início à 60°C e com aumento de 3°C/min até 246°C.

4.2.2.2 Estabilidade em pH 2

A estabilidade em pH 2 foi analisada em solução simulando o fluido gástrico, conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3. Nome da solução, composição e referência da solução utilizada para simular fluido gástrico.

Solução	Composição	Referência
Fluido gástrico sem enzima (FGS)	0,2 g de cloreto de sódio + 700 µL de ácido clorídrico em 100 mL de água ultrapura	Farmacopeia Brasileira ANVISA (2010)

FONTE: A Autora (2022).

Para isso, 0,03 g de cápsulas foram colocadas em frascos distintos, adicionou-se 3 mL de solução ácida sob agitação constante a 40°C. Nos intervalos de 10, 20, 30, 60, 90 e 120 min, as cápsulas foram filtradas, adicionadas em 3 mL de hexano e trituradas com o auxílio de uma espátula fina até a destruição completa das cápsulas. Em sequência, uma alíquota do sobrenadante foi retirada e analisada por espectrometria UV-Vis na faixa de 200 a 800 nm. A concentração de OEB no meio foi determinada pela

Para a análise *Headspace* seguiu-se os mesmos parâmetros descritos anteriormente (item 4.2.2.1).

4.2.2.3 Morfologia das cápsulas após testes de estabilidade

As análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram feitas com os microscópios JEOL JSM 6360-LV e TESCAN VEGA3 LMU localizados no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná (CME-UFPR), operados a

uma tensão de 15 kV. As amostras foram depositadas em suportes de alumínio e previamente metalizadas com ouro.

4.2.3 Digestão ruminal *in vitro*

O teste de digestão ruminal *in vitro* foi feito em parceria com o Laboratório de Fermentabilidade Ruminal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da USP localizado em Pirassununga, SP sob os cuidados do Prof. Dr. Ives Cláudio da Silva Bueno e da técnica Priscila Sales Maldonado. O líquido ruminal utilizado foi coletado de animais da FZEA.

O conteúdo ruminal foi coletado via cânula antes da alimentação dos animais, obtendo o material da fase sólida e da fase líquida do rúmen na proporção 50/50 % (V/V). Esse conteúdo foi homogeneizado com o auxílio de um liquidificador e filtrado com tecido de algodão. Foi obtido 400 mL de líquido (inóculo), ao qual adicionou-se 1600 mL de solução tampão previamente preparada, com bicarbonato de amônio e de sódio (NH_4CO_3 e NaHCO_3), além de microminerais (cloreto de cálcio (CaCl_2), cloreto de manganês (MnCl_2), cloreto de cobalto (CoCl_2) e cloreto de ferro (FeCl_3) e macrominerais (fosfato dissódico (Na_2HPO_4), fosfato monopotássico (KH_2PO_4), sulfato de magnésio (MgSO_4)).

Para o teste, aproximadamente 0,4 g de cápsulas foram acondicionadas em saquinhos de TNT e colocadas em estufa a 105°C por 24 h com a finalidade de determinar a matéria seca das cápsulas. Após esse período, as amostras foram novamente pesadas e acondicionadas em jarros contendo o inóculo e tampão. Esses jarros foram incubados em incubadora Dayse *in vitro* TE-150 por 24 h a 39°C e agitação constante (movimentos rotatórios), conforme

Figura 14. Após 24 h, os saquinhos foram coletados, lavados em água corrente e acondicionados em estufa a 105°C por 24 h para secagem completa. Por fim, as amostras foram novamente pesadas e determinou-se a degradabilidade das cápsulas pela diferença entre o peso inicial e final dos saquinhos (após incubação com líquido ruminal). Esse teste foi feito em triplicata.

Para melhor compreensão do teste, uma representação esquemática da metodologia pode ser encontrada na Figura 15.

Figura 14. Imagem da incubadora *in vitro* Dayse TE-150 aberta mostrando os 3 jarros utilizados para incubação dos saquinhos contendo as cápsulas em líquido ruminal.



FONTE: Laboratório de Fermentabilidade Ruminal LFR (2022).

Figura 15. Representação esquemática do teste de digestão ruminal *in vitro*.



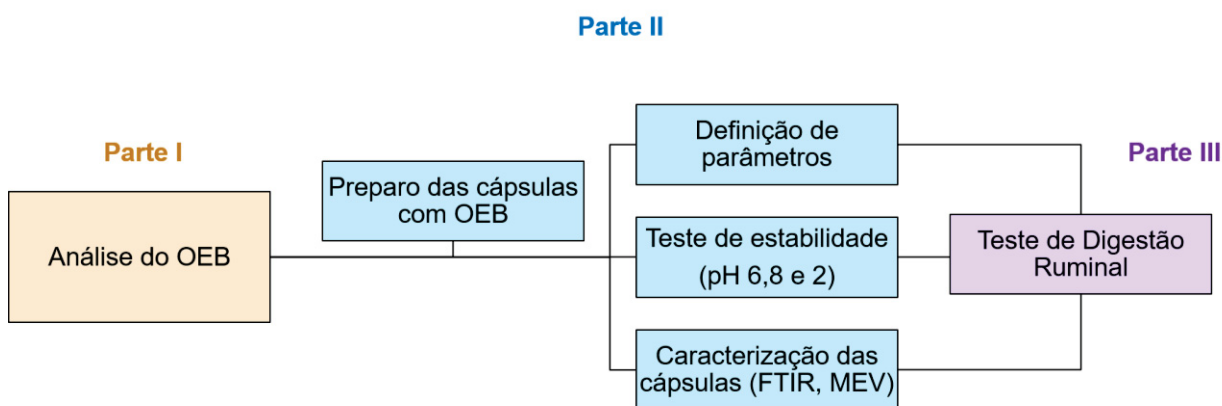
FONTE: A Autora (2022).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seção de resultados e discussão foi dividida em três partes, conforme indicado no esquema da Figura 16. A Parte I corresponde à escolha e caracterização do OEB e sua possível aplicação em ruminantes determinada por meio do teste

biológico biocarrapaticidograma. A Parte II é dada pelo preparo das cápsulas bem como os testes de estabilidade e sua caracterização. Por fim, na Parte III é relatado o teste biológico de digestão ruminal.

Figura 16. Esquema representando a divisão da seção de resultados e discussão em 3 partes. Parte I: análise do OEB. Parte II: preparo e caracterização das cápsulas. Parte III: teste biológico de digestão ruminal.



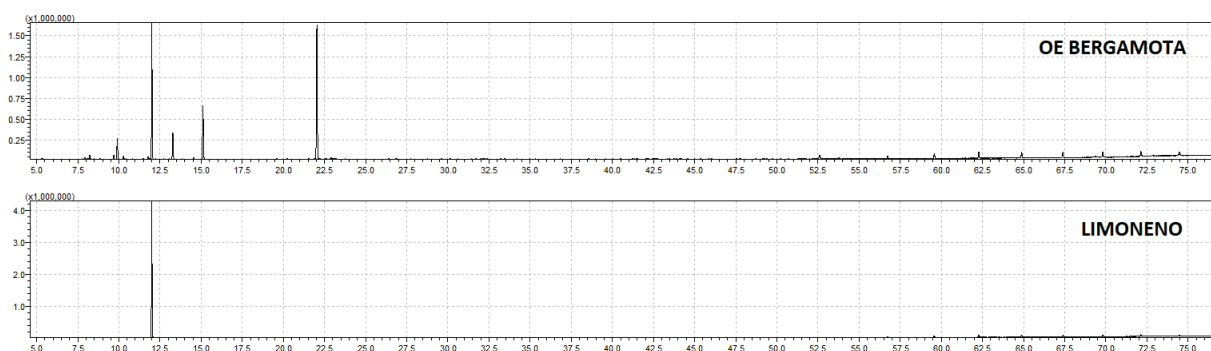
FONTE: A Autora (2022).

5.1 PARTE I

5.1.1 Composição do OEB e do composto isolado (R)-Limoneno

Os cromatogramas obtidos para o OEB e pelo composto isolado (R)-limoneno podem ser observados na Figura 17.

Figura 17. Cromatogramas obtidos por GC-MS para o OEB e o (R)-Limoneno (1 mg L⁻¹ em hexano grau HPLC) em coluna SH-Rtx- 5MS (30m x 0,25mm; 0,25µm)



FONTE: A Autora (2022).

A composição do OEB foi elucidada pela avaliação dos 5 compostos majoritários do cromatograma e está listada na Tabela 4, juntamente com a área relativa, tempo de retenção e similaridade encontrada na biblioteca NIST. É possível observar que os componentes principais são (R)-Limoneno, acetato de linalila e linalol, o que está de

acordo com a literatura⁶⁶ e o laudo técnico do fabricante. A estrutura química desses compostos está representada na Figura 18.

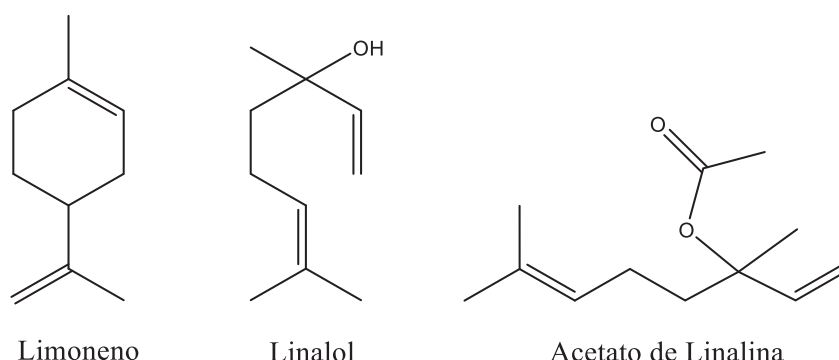
Para o limoneno, o composto majoritário foi o (R)-Limoneno com 100 % de área relativa, TR 12 min e similaridade de 97 %.

Tabela 4. Tempo de Retenção (TR), Similaridade, Área Relativa e Componentes identificados no cromatograma do OEB.

TR	Similaridade (%)	Área (%)	Componente
9,90	96	4,31	β -Pineno
12,00	97	37,08	(R) - Limoneno
13,28	96	6,26	γ -Terpeno
15,11	95	14,49	Linalol
22,04	96	37,86	Acetato de Linalila

FONTE: A Autora (2022).

Figura 18. Estrutura química dos compostos majoritários do OE de bergamota



FONTE: Adaptado de Avila-Sosa *et al.*⁶⁶.

5.1.2 Avaliação do potencial acaricida do OEB em fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*

O biocarrapaticidograma é uma técnica geralmente utilizada para avaliar a ação acaricida de produtos de aplicação transdérmica. A maioria desses produtos age de forma sistêmica contra o parasita, ou seja, o produto precisa ser absorvido pela pele do animal e eliminar o carrapato pela ingestão que este faz do sangue com acaricida.

O mecanismo de ação sistêmica é uma hipótese de como as cápsulas agiriam no organismo dos ruminantes. O OE seria liberado no abomaso, absorvido na corrente sanguínea e atingiria os carrapatos que ingerissem esse sangue contaminado. Com isso, conclui-se que a técnica aplicada é a única disponível para avaliação do sistema proposto.

Na Tabela 5 estão localizados os produtos testados, a eficiência reprodutiva (ER) e a eficácia do produto (EP), baseado nas Equações 1 e 2 descritas em 3.2.1.1. Informações complementares sobre o peso das teleóginas, peso da postura e eclodibilidade dos ovos podem ser encontradas no Apêndice 1. Na Figura 19 encontra-se uma representação visual dos dados de EP obtidos na Tabela 5, para melhor compreensão das informações. Nos cálculos de EP e ER, foi considerado como grupo controle as soluções contendo somente água (GC1) com a finalidade de descobrir se a presença do surfactante (polisorbato 80) e do álcool etílico nas soluções iriam influenciar o efeito observado nos tratamentos com o (R)-Limoneno/OEB.

O grupo controle serviu como base de comparação para avaliação do tratamento aplicado. Os controles negativos são considerados os “brancos” da análise e, portanto, não devem apresentar nenhum efeito sobre os parasitas. Os controles positivos são aqueles capazes de eliminar 100 % dos parasitas. Dessa forma, os controles permitem distinguir a diferença entre o resultado negativo e o positivo para o teste, além de garantir que não há nenhum problema com a viabilidade das teleóginas escolhidas e que todo o efeito observado, como morte das teleóginas ou postura completa/parcial/inviável, pode ser atribuído ao produto aplicado.

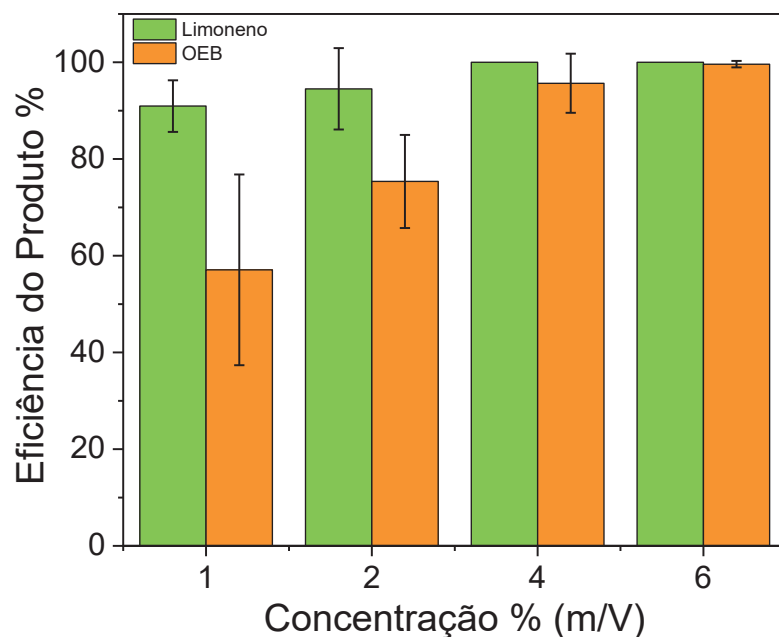
Tabela 5. Resultados de eficiência reprodutiva (ER) e eficiência do produto (EP) obtidos no teste de biocarrapaticidograma para os grupos controle e as soluções de limoneno e OEB de 1 a 6 % (m/V).

Produto Testado		Concentração % (m/V)	ER	EP (%)
Negativo	CN 1	-	836758	Nd
	CN 2	-	622016	0,0
Positivo	CP	-	0	100,0
		1	57899	90,7
		2	36222	94,2
		4	0	100,0
		6	0	100,0
		1	250327	59,8
(R)-Limoneno	OEB	2	142197	77,1
		4	20369	96,7
		6	1618	99,7

FONTE: A Autora (2022).

Legenda: Nd = não determinado

Figura 19. Representação visual dos dados de eficiência do produto (%) (eixo y) por concentração % (m/V) do OEB e limoneno obtidos pelo biocarrapaticidograma.



FONTE: A Autora (2022).

Foi feito a análise estatística teste t sobre os controles negativos (CN 1 e 2), o qual obteve-se $p = 0,127$. Como $p > 0,05$ indica que não há diferença estatística significativa entre os dois grupos, escolheu-se o grupo CN 2 para o cálculo da EP. Outro teste t foi aplicado para comparar o (R)-Limoneno e o OEB em mesmas concentrações e os valores obtidos foram $p < 0,05$. Esses valores indicam que houve diferença significativa entre o componente isolado e o OE.

Pela Tabela 5, observa-se que CP apresentou o comportamento esperado, visto que 100 % dos carrapatos foram eliminados antes de terem postura (ER = 0). Também é observado que o aumento nas concentrações, tanto de limoneno quanto OEB, apresentaram um aumento na EP.

Ao comparar os resultados obtidos entre as soluções de (R)-Limoneno e do OEB nas mesmas concentrações, nota-se que o composto isolado apresentou maior ação acaricida. Apesar do (R)-Limoneno ser um dos componentes majoritários do OEB, ainda representa 37 % de seus componentes, sendo possível que a redução da ação acaricida apresentado pelo OEB seja resultado de sua menor concentração quando comparado ao (R)-Limoneno puro. Esses dados corroboram com a ideia de que o limoneno é um dos principais responsáveis pela ação acaricida do OEB.

Na literatura, o único trabalho encontrado que utilizou OEB contra *Rhipicephalus microplus* foi o de Pazinato e colaboradores (2016)³⁰. Os autores

utilizaram soluções de OEB a 1, 5 e 10 % (m/V) com surfactante Triton X-100 a 1 % (m/V) em água destilada. Os resultados de EP foram 84,9, 86,6 e 90,5 %. As soluções de OEB preparadas neste trabalho utilizaram outro surfactante (polisorbato 80) e álcool etílico em sua composição.

É difícil estabelecer uma comparação direta entre os resultados. Isto devido aos carrapatos testados por Pazinato e colaboradores terem sido coletados em outro estado (Quilombo, SC), onde os animais sofrem outro tipo de influência do clima, alimentação etc. Além disso, os autores utilizaram soluções de OEB preparadas com outro surfactante e sem o uso de álcool etílico. Na concentração de OEB a 1 % (m/V), feita em ambos os trabalhos, observou-se 59,8 % e 84,9 % de mortalidade contra as teleóginas. A maior concentração testada neste projeto foi OEB a 6 % (m/V) versus 10 % e os valores foram 99,7 e 90,5 %. Apesar serem situações distintas, a ação acaricida do OEB está presente em ambas as pesquisas, com valores acima de 90 % nas concentrações mais altas avaliadas.

Em relação ao composto isolado (R)-Limoneno, os estudos encontrados relatam o seu caráter acaricida^{67,68}, mas a forma de preparo e análise foram muito distintas para estabelecer uma comparação direta. Ferrarini (2008)⁶⁷ avaliou o limoneno contra larvas de *Rhipicephalus microplus* e observou 100 % de mortalidade a 2,5µg/mL com solução previamente preparada em álcool etílico 96 %. Peixoto (2015) menciona que testou concentrações de 10 a 200 mg/mL de limoneno em solução com Triton X-100 e obteve concentração letal 50 % (LC₅₀) a 322,7 mg/mL.

Neste trabalho, o composto (R)-Limoneno apresentou 100 % de mortalidade em fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* a partir de 4 % (m/V). Tanto esses resultados quanto os do OEB enaltecem a hipótese de ambos são fortes candidatos para o desenvolvimento de um acaricida com ativos natural.

5.1.3 Avaliação do potencial acaricida do OEB em larvas da espécie *Rhipicephalus microplus*

O TPL foi realizado para avaliar a eficácia do OEB contra larvas de bovino *Rhipicephalus microplus*. As larvas estudadas no TPL compreendem a fase de vida livre e o início da fase parasitária, antes dessas se fixarem no hospedeiro (14 a 21 dias) após a eclosão dos ovos.

Os valores de mortalidade média obtidos com o teste encontram-se na Tabela 6. Informações complementares sobre a quantidade de larvas vivas e mortas e a mortalidade podem ser encontrados no Apêndice 2.

Tabela 6. Resultados da mortalidade e mortalidade média obtidos no TPL para aos grupos controle e as soluções de OEB nas concentrações 2 e 4 % (m/V).

Produto Testado		Concentração % (m/V)	Mortalidade média (%)
Negativo	CN 1	-	2,3
	CN 2	-	2,1
Positivo	CP	-	99,8
OEB		2	5,6
		4	11,3

FONTE: A Autora (2022).

Apesar de ser observado um aumento da taxa de mortalidade média entre as concentrações 2 e 4 % (m/V) do OEB, não se encontrou evidências estatísticas da diferença significativa entre os valores ($p = 0,110$). Já em relação ao grupo controle, ao comparar estatisticamente as concentrações de OEB com CN2, observou-se que não há diferença expressiva entre os produtos ($p = 0,247$ para OEB 2 % (m/V) e $p = 0,110$ para OEB 4 % (m/V). Dessa forma, a baixa mortalidade permite concluir que o OEB nas concentrações testadas não apresentou efeito significativo para ser usado como tratamento principal para larvas nesse estágio da fase parasitária. Outras concentrações precisam ser testadas para avaliar se há um aumento efetivo na mortalidade.

Não foi encontrado nenhum estudo que utilizou OEB em larvas de *Rhipicephalus microplus* para comparação dos resultados obtidos nessa etapa.

5.2 PARTE II

5.2.1 Características do alginato de sódio

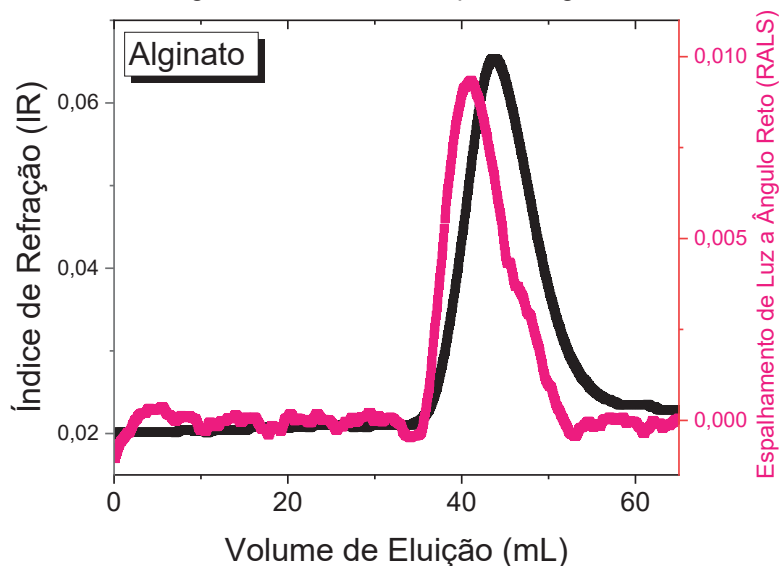
O polímero fundamental para a obtenção das microcápsulas foi o alginato de sódio. Dessa forma, sua caracterização é de extrema importância para garantir reprodutibilidade das cápsulas, bem como compreender suas características.

5.2.1.1 Massa Molar Ponderal Média (Mw)

O perfil cromatográfico do alginato de sódio está presente na Figura 20. É possível observar uma distribuição monomodal eluindo em torno de 40 mL. Os valores

da massa molar ponderal média ($\bar{M}_w$) e numérica ($\bar{M}_n$), bem como o valor do incremento de índice de refração (dn/dc) obtido previamente encontram-se na Tabela 7.

Figura 20. Perfil cromatográfico HPSEC obtido para o alginato de sódio.



FONTE: A Autora (2022).

Tabela 7. Parâmetros físico-químicos do alginato de sódio determinados pela técnica HPSEC (M_w , M_n , $\bar{D}$) e valor obtido no incremento de índice de refração. A porcentagem ao lado do valor indica o erro associado a análise.

Incremento de índice de refração (dn/dc)	Massa molar ponderal média ($\bar{M}_w$) ($g\ mol^{-1}$)	Massa molar numérica média ($\bar{M}_n$) ($g\ mol^{-1}$)	$\bar{D}$ (dispersão $\bar{M}_w/\bar{M}_n$)
0,144 $mL\ g^{-1}$	$1,37 \cdot 10^5$ (6 %)	$7,623 \cdot 10^4$ (15 %)	$1,798 \pm 0,291$

FONTE: A Autora (2022).

O perfil obtido para o alginato corresponde a uma amostra polidispersa, confirmada pela polidispersão de massas molares $\bar{D} > 1$ e a massa molar ponderal média está dentro da faixa de valores relatados para fins comerciais, que varia de 32.000 a 400.000 $g\ mol^{-1}$ ³⁹.

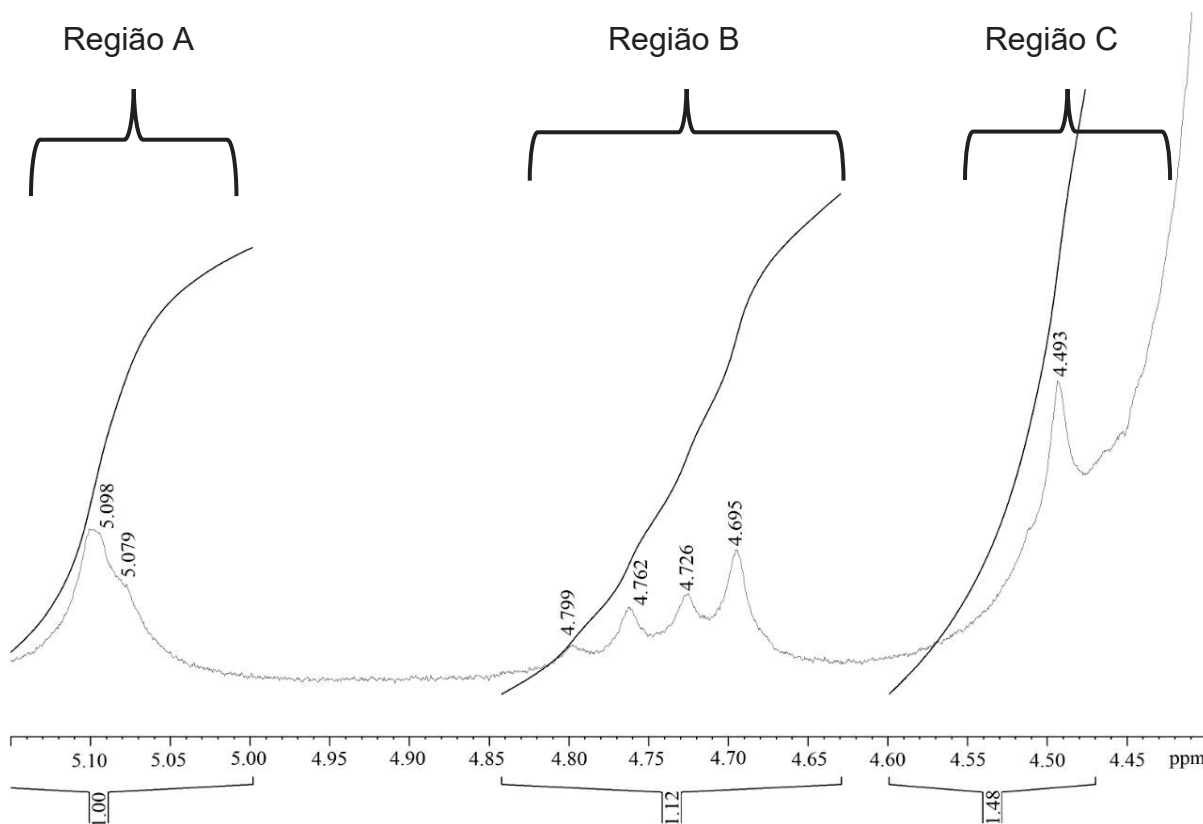
5.2.1.2 Razão M/G por RMN

Para determinar a razão entre os ácidos manurônico (Bloco M) e gulurônico (Bloco G) foi realizada a análise de 1H RMN do alginato de sódio, cujo espectro é mostrado na Figura 21. O cálculo da razão M/G pode ser encontrado abaixo, por meio da apresentada no item 4.2.3.2.

$$\frac{M}{G} = \frac{I_B + I_C - I_A}{I_A} = \frac{1,12 + 1,48 - 1}{1} = 1,6$$

Pelo valor de M/G é possível afirmar que há uma maior quantidade de monômeros do Bloco M em relação aos monômeros do Bloco G no alginato utilizado neste trabalho. Para cátions divalentes, a maior presença de Bloco M influencia diretamente na formação do hidrogel. Isso porque para esses íons a gelificação ocorre preferencialmente pelo Bloco G (*egg-box*)⁶⁹. Já para cátions trivalentes, como estes são relatados com a capacidade de interação com os dois blocos (M e G), a maior quantidade de Bloco M não necessariamente seria um fator impactante na reticulação.

Figura 21. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, D_2O) da amostra de alginato de sódio (10 mg mL^{-1}) a 70°C com as regiões A, B e C identificadas.



FONTE: A Autora (2022).

5.2.2 Obtenção das cápsulas de alginato e quitosana

A concentração e proporção entre os polímeros interfere diretamente na formação da parede polimérica da cápsula e, por isso, cápsulas com proporções 1:1, 2:1, 3:1 e 5:1 (m/m) de alginato/quitosana foram testadas. No entanto, com exceção da proporção 5:1 (m/m), não houve formação de cápsulas esféricas nas demais formulações e/ou as cápsulas formadas estavam relativamente frágeis e acabaram se desintegrando durante o processo de agitação/filtração das cápsulas. Nesses testes, a concentração de quitosana e o agente reticulante foram mantidas constantes. Sendo

assim, pode-se concluir que a concentração de alginato foi um parâmetro fundamental para as técnicas de gelificação ionotrópica e coacervação complexa. Além de que a diluição da solução polimérica afeta diretamente nas características das cápsulas. Consequentemente, a proporção determinada para continuidade deste trabalho foi de 5:1 (m/m) alginato/quitosana.

Outro parâmetro explorado no preparo das cápsulas foi o tipo de agente reticulante. Isso porque a afinidade do cátion pelo alginato influencia diretamente na forma de liberação do material encapsulado, que pode ocorrer pela substituição do cátion reticulado por outro íon oriundo do meio em que a cápsula está. Em trabalho anterior realizado em nosso grupo de pesquisa GPMIn, Silva³³ explorou a afinidade entre o alginato e os íons Fe^{3+} , Al^{3+} , Ce^{3+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} e relatou maior afinidade para o Cu^{2+} dentre os cátions divalentes e Fe^{3+} para os cátions trivalentes. Dessa forma, optou-se pela escolha do Fe^{3+} e Cu^{2+} para o preparo das cápsulas e a proporção entre alginato/ M^{n+} também foi estudada.

Em um primeiro momento, as cápsulas foram preparadas com uma concentração em excesso dos M^{n+} ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) com o objetivo de verificar as condições experimentais e garantir que as cápsulas seriam formadas. Posteriormente, avaliou-se outras proporções entre alginato/ M^{n+} (m/mol L^{-1}). Na Tabela 8 está um resumo dessa etapa e os resultados obtidos.

Tabela 8. Proporções alginato/ M^{n+} (m/mol L^{-1}) utilizadas nas formulações e os resultados obtidos para cada uma delas.

Proporções alginato/ M^{n+} (m/mol L^{-1})	Resultados obtidos
1:0,01	Formato irregular
1:0,02	
1:0,05	Formato esférico e uniforme
1:0,075	

FONTE: A Autora (2022).

Dessa forma, como as cápsulas com proporções 1:0,05 e 1:0,075 (m/mol L^{-1}) apresentaram as características desejadas, optou-se por continuar com a proporção 1:0,05 (m/mol L^{-1}), por possuir menor concentração do M^{n+} .

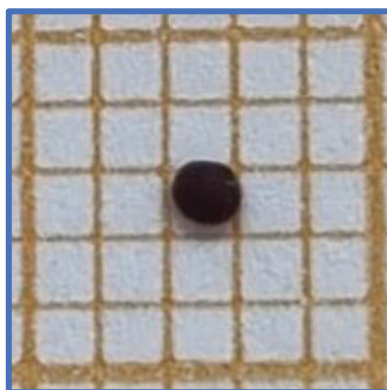
5.2.3 Características das cápsulas

Nesse item serão descritas as cápsulas obtidas com agente reticulante Fe^{3+} na proporção alginato/ M^{n+} 1:0,05 (m/mol L^{-1}) devido ao desempenho observado nos testes de estabilidade, que serão discutidos posteriormente no item 5.2.4.

5.2.3.1 Tamanho das cápsulas

As cápsulas apresentaram o tamanho de 1 mm, conforme pode ser observado na Figura 22. Segundo Pell e colaboradores¹⁸, partículas esféricas com diâmetro menor que 2 mm são capazes de passar direto do rúmen para o abomaso sem serem retidas pelo retículo. Dessa forma, é possível inferir que as cápsulas feitas nesse trabalho poderiam ser capazes de passar direto pelo rúmen.

Figura 22. Cápsula de alginato, Fe^{3+} , OEB e quitosana em papel milimetrado.



FONTE: A Autora (2022).

5.2.3.2 Porcentagem de OEB encapsulado

A eficiência de encapsulação (EE %) foi calculada (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**) em dois momentos distintos, sendo o primeiro logo após a secagem das cápsulas (em 3 dias) e o segundo antes da realização dos testes de liberação (5.2.4) (em 7 dias). Depois de secas, a EE % obtida foi $73 \pm 1,32$ % (m/m) e antes da realização dos testes obteve-se $48 \pm 1,95$ % (m/m).

Os dados mencionados acima indicam que houve uma liberação do material encapsulado sem a necessidade de um estímulo do meio (pH). Desta forma, acredita-se que a matriz polimérica formada possa ter alguma porosidade e que o OEB, por ser altamente volátil, tenha sido liberado por difusão, mesmo as cápsulas sendo armazenadas a 4°C.

Autores como Benavides *et al.*⁷⁰ e Paris *et al.*⁷¹ utilizaram a técnica de gelificação ionotrópica com alginato e cálcio (Ca^{2+}) para encapsular OE de tomilho e canela, respectivamente. A EE % obtida em seus trabalhos encontra-se na faixa de 80 – 90 %^{70,71}, sendo este valor levemente acima do encontrado para o OEB ($73 \pm 1,32$ % (m/m)). No entanto, vale ressaltar que as EE % foram obtidas em intervalos de tempo menores e por métodos diferentes do que foi realizado nesta dissertação. Uma explicação plausível para essa ligeira diferença na EE % é que durante o processo de secagem das cápsulas, que leva em torno de 3 dias a temperatura ambiente ($20 - 25^\circ\text{C}$), uma pequena parte do OEB encapsulado tenha sido perdida por volatilização.

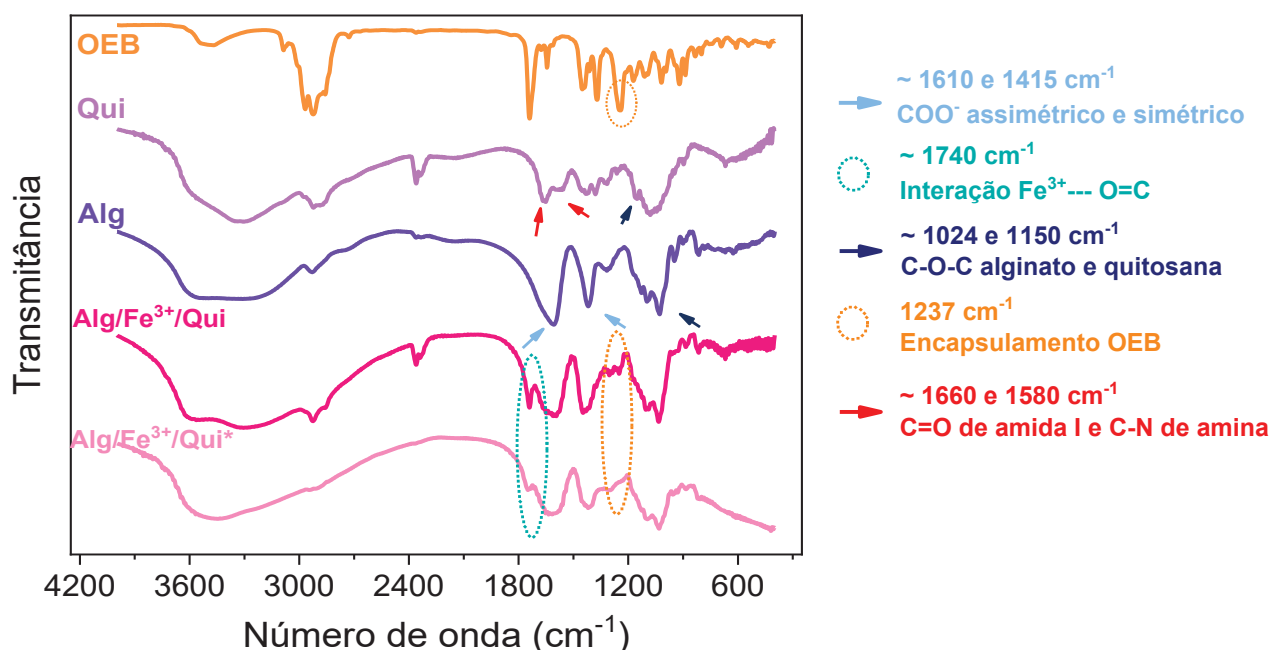
5.2.3.3 Caracterização estrutural por FTIR

Para caracterização das cápsulas, foram obtidos espectros de infravermelho (Figura 23) para os polímeros, o OEB e as cápsulas secas. A encapsulação do OEB na matriz polimérica foi identificada pela banda em 1237 cm^{-1} , presente no espectro do OEB, nas cápsulas com OEB e ausente nas cápsulas vazias (Alg/ Fe^{3+} /Qui*).

As bandas detectadas em 1610 , 1415 , 1024 cm^{-1} são características do estiramento assimétrico e simétrico dos carboxilatos e C-O-C ^{72,73} presentes no alginato e foram detectadas no polímero puro e nas duas cápsulas. Para a quitosana, as bandas características foram encontradas apenas no polímero puro, sendo estas em 1660 , 1580 e 1150 cm^{-1} referentes ao estiramento C=O de amida primária, N-H de amina primária e C-O-C ^{72,73}. A concentração de quitosana utilizada nas cápsulas foi menor do que a do alginato (5:1 (m/m) alginato/quitosana), o que pode ter dificultado a visualização dessas bandas nas cápsulas.

Em relação aos espectros das cápsulas, na literatura, trabalhos como o de Yousef *et al.*⁷³ e de Lai *et al.*⁷⁴ mencionam o estreitamento da banda em $\sim 1610\text{ cm}^{-1}$ do grupo carboxilato do alginato e o desaparecimento da banda em 1580 cm^{-1} de ligação N-H amina primária da quitosana como indicativo da interação eletrostática entre os polímeros. Na Figura 23, observou-se um alargamento da banda em 1610 cm^{-1} e o desaparecimento da banda em 1580 cm^{-1} , o que pode ser um indicativo da formação da coacervação complexa. O alargamento da banda em 1610 cm^{-1} das cápsulas em comparação com o alginato puro pode ser indicativo da complexação com a quitosana e gelificação com ferro, visto que o COO^- é utilizado na interação com Fe^{3+} e NH_3^+ .

Figura 23. Espectro de FTIR-ATR para o OEB, alginato (Alg), quitosana (Qui), cápsulas Alg/Fe³⁺/Qui com OEB e sem OEB (Alg/Fe³⁺/Qui*). Ao lado das setas estão as principais bandas e os referentes estiramentos.



FONTE: A Autora (2022).

A banda em 1740 cm⁻¹, que aparece nas duas cápsulas e não aparece nos polímeros isolados, foi atribuída por alguns pesquisadores como a interação entre Fe³⁺...O=C...OH, o que é um indicativo da gelificação ionotrópica entre o alginato e o ferro III⁷⁵⁻⁷⁷ bem como de uma possível interação entre a quitosana e o ferro^{75,78,79}.

5.2.4 Avaliação do comportamento das cápsulas com a variação do pH

Essa etapa foi fundamental para entender o comportamento das cápsulas nesses meios e selecionar as cápsulas promissoras para o teste biológico de digestão ruminal. 27693

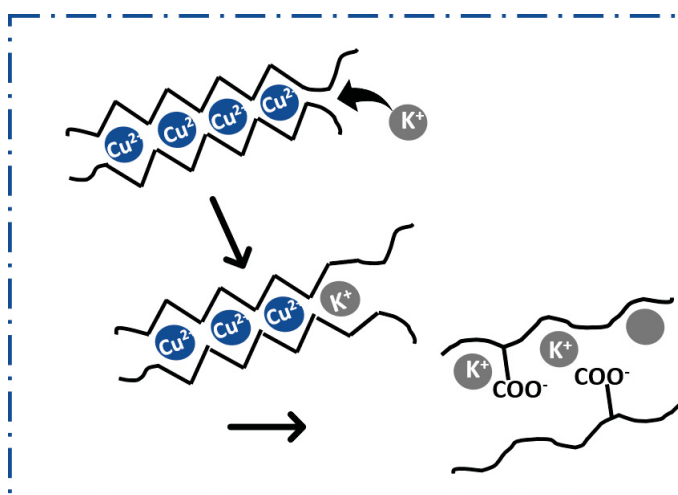
Apesar do tamanho obtido para as cápsulas implicarem que estas passariam direto do rúmen para o abomaso (item 5.2.3.1), o teste de estabilidade em pH 6,8 foi realizado para entender o que aconteceria caso as cápsulas não passassem direto. Além disso, entender o comportamento das cápsulas em pH 6,8 também abre margem para utilizá-las em outras aplicações.

5.2.4.1 Avaliação do comportamento das cápsulas em pH 6,8

Cápsulas com Fe³⁺ e Cu²⁺ foram colocadas no meio proposto por 24h e, após esse período, observou-se que as cápsulas com cobre se desintegraram nesse tempo.

Provavelmente em virtude de uma possível troca iônica do M^{n+} pelo íon sódio (Na^+) e/ou potássio (K^+) presentes no tampão PBS. Como o alginato não reticula na presença de cátions monovalentes, a substituição do M^{n+} por esses íons pode ter promovido uma aproximação dos grupos carboxilatos (COO^-) e repulsão entre eles devido à presença das cargas negativas. Essa repulsão gerou um afrouxamento das cadeias de alginato e aumentou a possibilidade de intumescimento das cápsulas, o que colaboraria para as cápsulas se desintegrarem. Na Figura 24 é possível observar uma representação visual desse processo. Essa hipótese é relatada na literatura por autores como Al-Musa, Fara e Badwan⁴⁴ e Bajpai e Sharma⁸⁰ que realizaram estudos sobre a interação do alginato com cátions divalentes (Ca^{2+} , Ba^{2+}) em tampão PBS e relataram resultados similares ao observado nas cápsulas com Cu^{2+} .

Figura 24. Representação da proposta de troca iônica entre o íon Cu^{2+} por K^+ em uma cadeia de alginato reticulada previamente com Cu^{2+} .



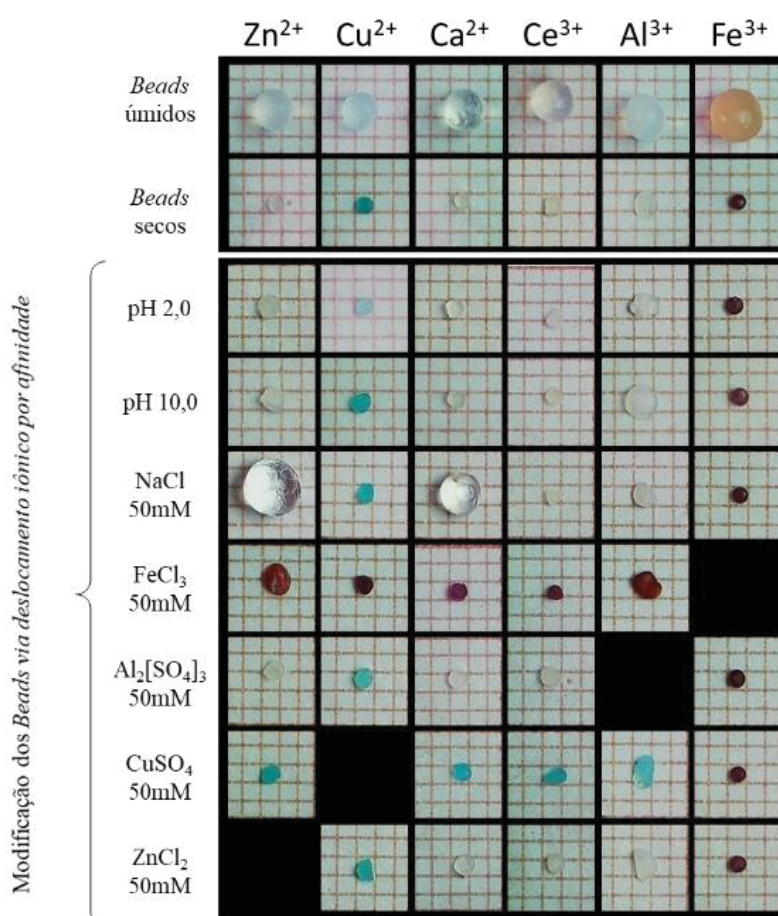
FONTE: A Autora (2022).

Outra hipótese para as cápsulas de Cu^{2+} terem se desintegrado em tampão PBS pode ser dada ao fato do alginato utilizado possuir maior quantidade de monômeros pertencentes ao Bloco M, como definido no item 4.2.3.2. Na literatura, é relatado que cátions divalentes interagem com o alginato pela formação da estrutura *egg-box*, que ocorre preferencialmente com o Bloco G do polímero. Isso devido à existência de um vazio formado quando duas regiões de Blocos G estão alinhadas, pois este vazio possui dimensões ideais para interação com íons divalentes^{38,39,43}.

As cápsulas com Fe^{3+} não se desintegraram nesse teste, indicando uma forte afinidade desse íon com o alginato. Essa hipótese também foi demonstrada em trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa, no qual da Silva³³ mostrou o preparo cápsulas de

alginato com diversos cátions (Fe^{3+} , Al^{3+} , Ce^{3+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+}). Ele também estudou o comportamento dessas cápsulas ao imergi-las em soluções de diferentes valores de pH e íons dissolvidos (Figura 25). Neste estudo, o autor relatou maior afinidade do alginato com o Fe^{3+} , visto que todas as amostras interagiram com esse íon, o que levou a modificações na coloração e aspecto do gel. Por outro lado, as amostras de $\text{Alg}/\text{Fe}^{3+}$ não interagiram com nenhum íon avaliado. Além disso, da Silva³³ também relatou obter cápsulas mais densas e compactas com Fe^{3+} .

Figura 25. Aspecto dos *beads* de alginato/ M^{n+} (Fe^{3+} , Al^{3+} , Ce^{3+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+}) úmidos, secos e após imersão em pH 2, 10 e soluções de NaCl, FeCl_3 , $\text{Al}_2[\text{SO}_4]_3$, CuSO_4 e ZnCl_2 .



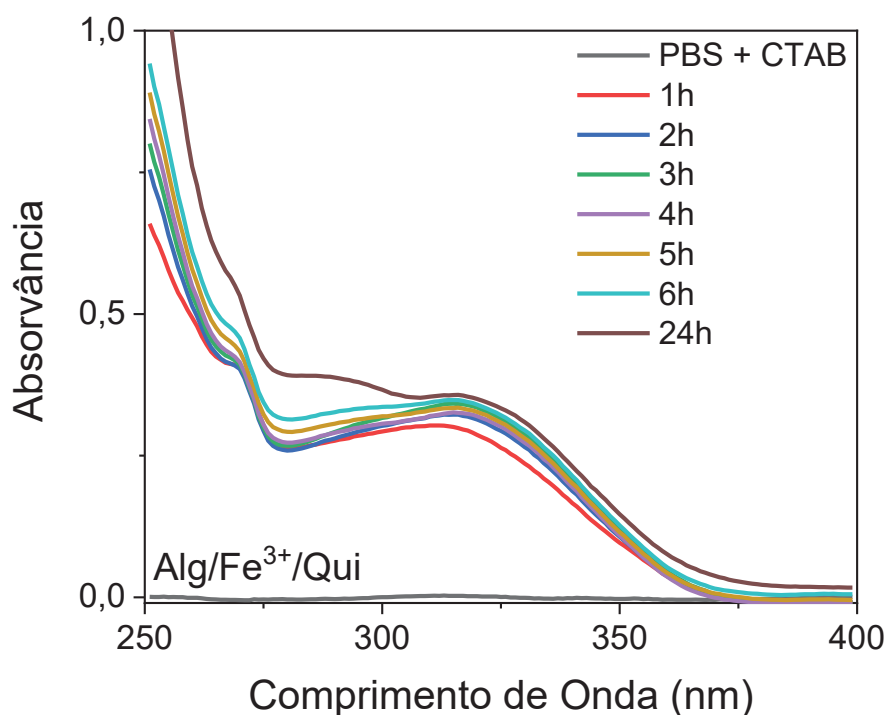
FONTE: da Silva³³.

O mecanismo de reticulação e o tipo de estrutura formada na interação entre cátions trivalentes como o Fe^{3+} e o alginato não são bem definidos na literatura. No entanto, é possível observar as seguintes concordâncias sobre as características da interação $\text{Alg}/\text{Fe}^{3+}$: Fe^{3+} forma ligações mais fortes com o alginato em comparação com outros íons multivalentes e Fe^{3+} possui capacidade de se ligar não somente ao Bloco G do alginato (como Ca^{2+}) mas também com os Blocos M^{33,45,46}.

Além da interação entre ferro e alginato, outros autores mencionam formação de cápsulas pela interação entre este íon e a quitosana (e/ou derivados de quitosana)^{75,78,79}, por meio da coordenação $\text{Fe}^{3+} \cdots \text{O}=\text{C} \cdots \text{OH}$, entre o íon ferro (III) e o grupo carboxila presentes no polímero. Essa interação pode ter auxiliado na estrutura das cápsulas, visto que o Fe^{3+} pode ter interagido não somente com o alginato, mas também com a quitosana presente nas paredes da cápsula, o que contribuiria para não desintegração das mesmas no meio estudado (PBS). Dessa forma, seguiu-se os testes com cápsulas de alginato/ Fe^{3+} /OEB/quitosana (Alg/ Fe^{3+} /OEB/Qui).

Para Alg/ Fe^{3+} /OEB/Qui, realizou-se a análise qualitativa de estabilidade em tampão PBS com a presença de surfactante, onde uma alíquota do sobrenadante foi retirada a cada 1 h durante as seis primeiras e depois em 24 h. O perfil de absorvância observado encontra-se na Figura 26.

Figura 26. Análise qualitativa da absorvância das cápsulas de alginato e quitosana com Fe^{3+} em tampão PBS 0,05 mol L⁻¹ e CTAB 0,1 % (m/V) por 6 h e 24 h.



FONTE: A Autora (2022).

Após 24 h, as cápsulas Alg/ Fe^{3+} /OEB/Qui apresentaram o mesmo formato esférico obtido inicialmente e, pelo perfil de absorvância observado na Figura 26, é possível afirmar que houve liberação do material encapsulado e que a quantidade de material liberada se manteve aproximadamente constante de 6 a 24 h.

Para quantificar o OEB liberado nesse meio, duas metodologias diferentes foram propostas. A primeira consistiu em determinar a presença do OE no sobrenadante e, para isso, uma curva analítica do OEB em PBS + CTAB foi desenvolvida. A segunda proposta consistiu em quantificar o que sobrou de OEB dentro das cápsulas, ao destruí-las em hexano e analisar o sobrenadante. No entanto, ao comparar os resultados obtidos pelas metodologias detectou-se uma divergência entre os valores, pois a liberação calculada pelo sobrenadante (PBS + CTAB) indicou que apenas 2 % de OEB havia sido liberado e, em hexano, uma perda de 93 % do material encapsulado.

Na obtenção da curva analítica do OEB em PBS + CTAB foi necessário realizar um ajuste nos dados brutos, pois a mistura do OE nesse meio levou a formação de uma emulsão. Quando o laser passa por essa solução, a luz é espalhada pelas bolhas em suspensão (efeito *Tyndall*) e, conseqüentemente, há flutuações na linha base durante a análise de absorvância no UV-Vis. Dessa forma, optou-se por dar continuidade nos testes utilizando somente o método quantitativo de destruição das cápsulas em hexano, por demonstrar dados mais confiáveis. Informações complementares sobre as curvas analíticas do OEB em PBS + CTAB podem ser encontradas no Apêndice 3.

Para quantificar o OEB pela segunda metodologia, foi necessário colocar a mesma quantidade de cápsulas em frascos diferentes e macerá-las em hexano com o passar do tempo. Além do perfil de liberação, também se avaliou a cinética de liberação dessas cápsulas, a fim de obter maiores informações sobre o mecanismo de liberação do OEB. A cinética foi estudada ajustando-se os dados de liberação aos modelos cinéticos de ordem zero, primeira ordem e Korsmeyer-Peppas.

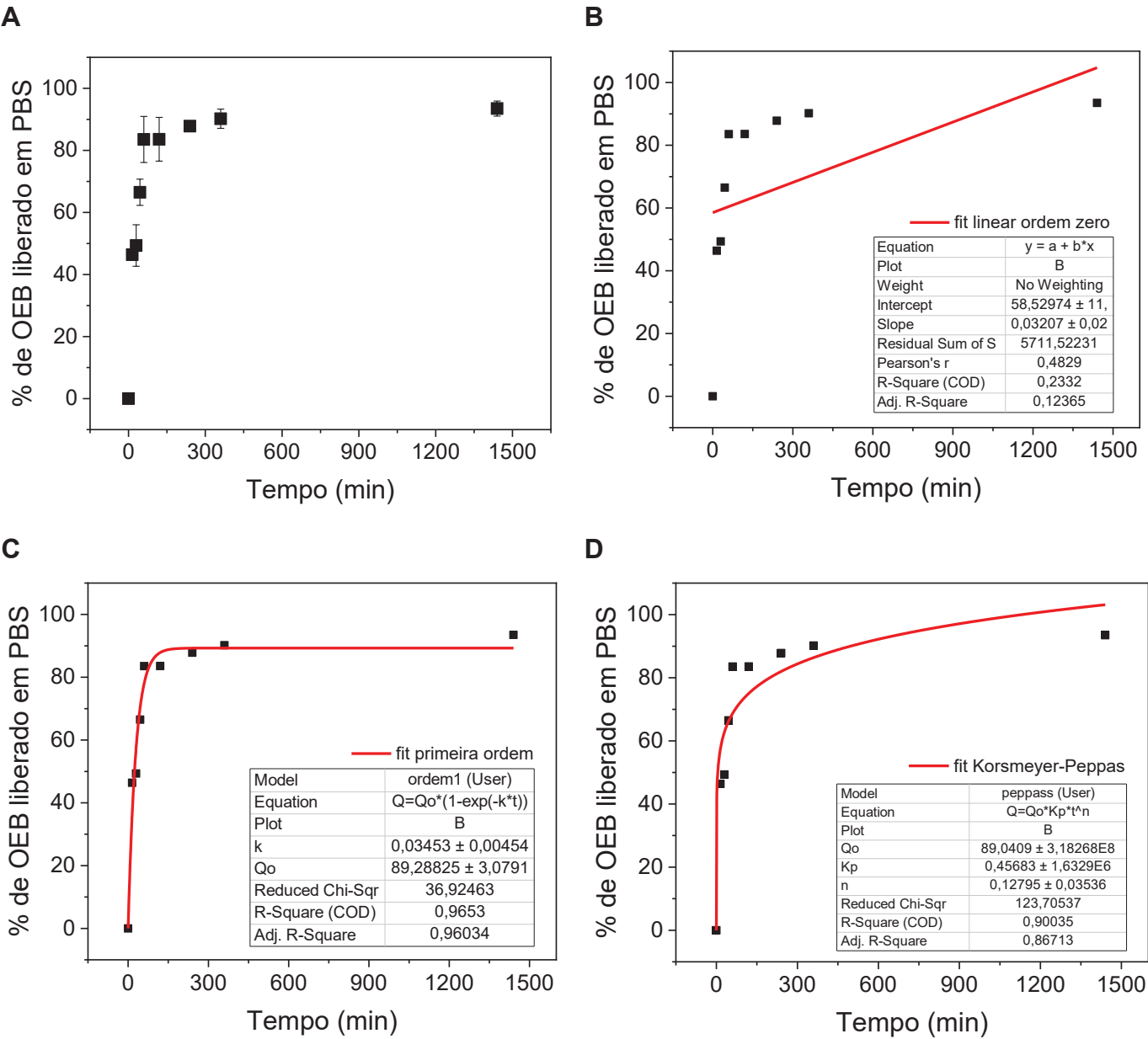
O perfil de liberação do OEB realizado em triplicata e os ajustes cinéticos encontram-se na Figura 27. Os parâmetros cinéticos e as equações de cada modelo estão evidenciados na

Tabela 9 e o modelo de melhor ajuste foi avaliado pelo coeficiente de correlação corrigido (R^2).

Em um perfil cinético de ordem zero, a taxa de liberação do ativo é constante, o que significa que a mesma concentração de substância vai ser liberada por unidade de tempo independentemente da concentração inicial de ativo dentro da cápsula⁸¹. Em uma cinética de primeira ordem, a taxa de liberação depende da concentração do ativo⁸¹. Ou seja, quanto maior a quantidade de ativo encapsulado, mais rápida a sua liberação. Por fim, o modelo de Kosmeyer-Peppas traz mais informações sobre o

mecanismo de liberação da substância, podendo este ser por difusão controlada (modelo de Fick), transporte anômalo (não Fickiano) e caso II de transporte (relaxação). Essas características são obtidas através do valor de n, se $n < 0,43$, a liberação segue a difusão de Fick, se $0,43 < n < 0,89$, a liberação é anômala e $n > 0,89$, caso II⁸².

Figura 27. Perfil de liberação do OEB em PBS (a) e os ajustes cinéticos de ordem zero (b), primeira ordem (c) e Kosmeyer-Peppas (d).



FONTE: A Autora (2022).

Tabela 9. Modelos cinéticos e os parâmetros obtidos pela liberação do OEB em PBS. Também são apresentadas as equações utilizadas em cada modelo, sendo eles ordem zero, primeira ordem e Korsmeyer-Peppas.

Modelo	Ordem Zero		Primeira Ordem		Korsmeyer-Peppas		
Equação	$Q = Q_0 + k * t$		$Q = Q_0 * (1 - e^{(-k*t)})$		$Q = Q_0 * K_p * t^n$		
	R^2	k_0	R^2	k_1	R^2	K_p	n
	0,12	0,0321	0,96	0,034	0,86	0,45	0,13

FONTE: A Autora (2022).

Legenda: Q é a quantidade de OEB liberado no tempo t , Q_0 é o valor inicial do OEB, k é a constante cinética, K_p é a constante de Korsmeyer-Peppas e n é o expoente de difusão.

O perfil de liberação obtido para o OEB em PBS se ajustou melhor ao modelo de primeira ordem ($R^2 = 0,96$). Esse tipo de ajuste indica que a taxa de liberação do OEB está relacionada com a quantidade de óleo que foi encapsulada. Nesse caso, como a liberação foi rápida, é possível afirmar que a concentração de OEB encapsulada também foi alta. Essa informação corrobora o que foi determinado no item 5.2.3.2, onde encontrou-se uma eficiência de encapsulação das cápsulas de 73 %.

Como pode ser observado na Figura 27, o perfil de liberação do OEB atinge um patamar entre 6h e 24h, indicando que a concentração de OEB liberada atingiu o seu limite máximo. Em 24h, essa concentração está próxima a 90 % e, como o valor da quantidade inicial de OEB (Q_0) deu 89 %, é possível afirmar que todo OEB foi liberado nesse meio. Dessa forma, é possível concluir que se as cápsulas não passarem direto do rúmen para o abomaso, o conteúdo encapsulado seria liberado no rúmen.

Na literatura, foi encontrado um estudo sobre o uso de cápsulas de alginato com Fe^{3+} para aplicação via oral, cujos autores fizeram teste de liberação em pH simulando o meio estomacal e intestinal, algo similar ao que este projeto se propôs. A matriz polimérica utilizada por Swamy e colaboradores⁸³ consistiu em alginato/carboximetilcelulose e os autores relataram maior liberação do material encapsulado (metformina) em pH 7,4 (intestinal) na faixa entre 40 – 60 % do conteúdo das cápsulas em até 20 horas. Por se tratar de uma matriz polimérica diferente, bem como o tipo de material encapsulado, torna-se difícil estabelecer uma comparação direta entre as duas pesquisas.

Apesar de ter ocorrido a liberação completa do OEB em PBS, o fato das cápsulas não se desintegrarem após 24 h indica que o sistema proposto possui boa

resistência mecânica, o que é uma característica importante para a aplicação proposta. Além disso, está resistência também pode ser útil para o desenvolvimento de outras aplicações. Dessa forma, deu-se continuidade nos testes de liberação em pH 2, simulando o pH encontrado no abomaso e o mesmo tipo de cápsula foi enviado para avaliação *in vitro* de digestão ruminal.

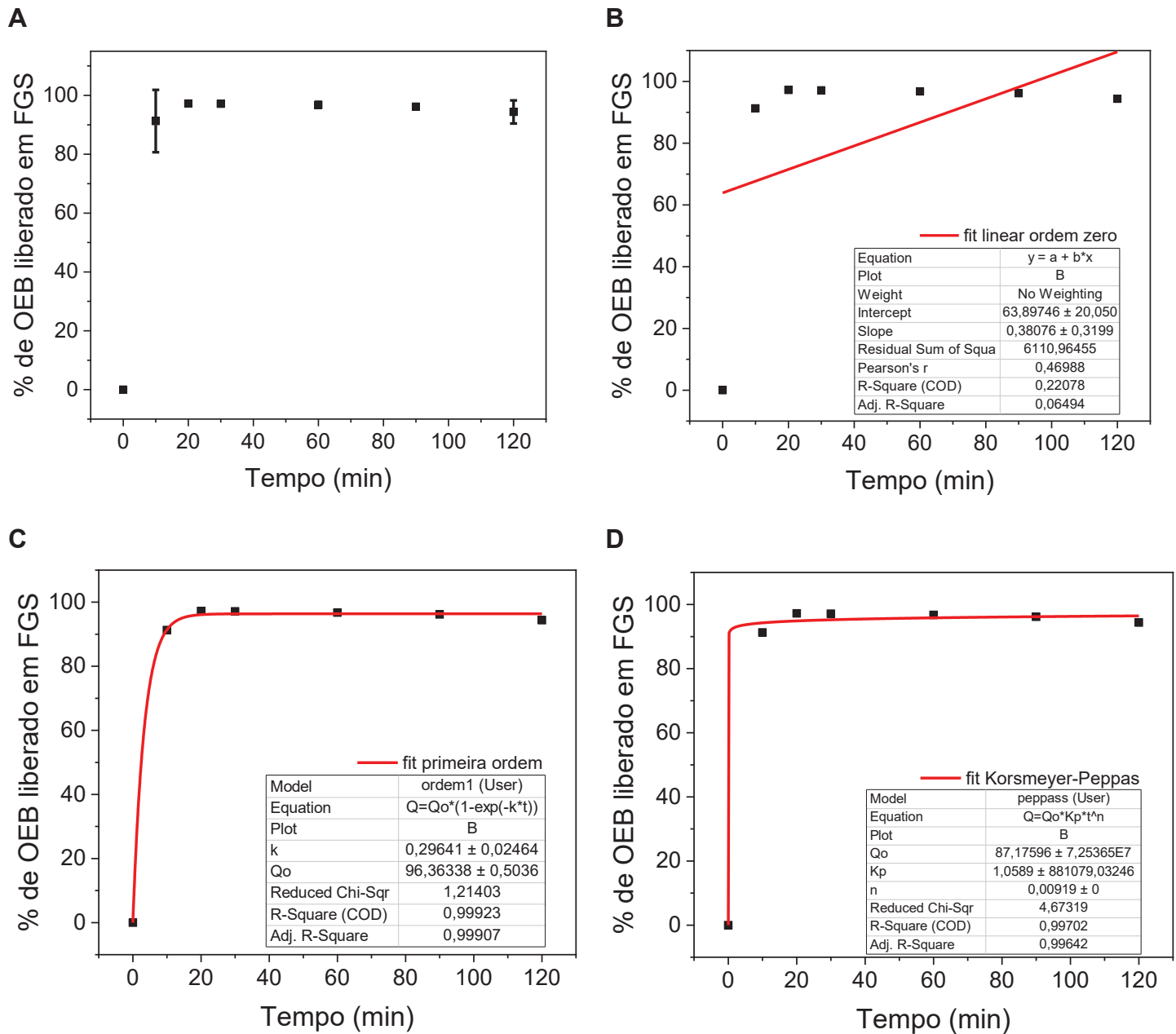
Os dados obtidos por *Headspace* em pH 6,8 serão discutidos posteriormente junto com os dados em pH 2, ao final do próximo item.

5.2.4.2 Avaliação do comportamento das cápsulas em pH 2

A liberação do OEB das cápsulas também foram avaliadas em fluido gástrico sem enzima (FGS) por 2h à 40°C, pois essas condições se assemelham às encontradas no abomaso¹⁸. Os resultados desse teste encontram-se na Figura 28 junto com os ajustes cinéticos. Os parâmetros cinéticos e as equações de cada modelo estão evidenciados na Tabela 10 e o modelo de melhor ajuste foi avaliado pelo coeficiente de correlação corrigido (R^2).

O perfil cinético observado se ajustou melhor nas equações de primeira ordem e Kosmeyer-Peppas, com ambos $R^2 = 0,99$. Pela liberação em primeira ordem, as conclusões são similares as obtidas no item 4.2.2.1 para a liberação em PBS. A liberação rápida está relacionada a concentração de OEB encapsulada, que também foi alta. Avaliando a liberação por Kosmeyer-Peppas, é possível afirmar que o mecanismo de liberação do OEB foi difusão controlada pela parede polimérica, visto que $n = 0,009$ ($n < 0,43$)⁸².

Figura 28. Perfil de liberação do OEB em FGS (a) e os ajustes cinéticos de ordem zero (b), primeira ordem (c) e Korsmeyer-Peppas (d).



FONTE: A Autora (2022).

Tabela 10. Modelos cinéticos e os parâmetros obtidos pela liberação do OEB em FGS. Também são apresentadas as equações utilizadas em cada modelo, sendo eles ordem zero, primeira ordem e Korsmeyer-Peppas.

Modelo	Ordem Zero		Primeira Ordem		Korsmeyer-Peppas		
Equação	$Q = Q_0 + k * t$		$Q = Q_0 * (1 - e^{(-k*t)})$		$Q = Q_0 * K_p * t^n$		
	R^2	k_0	R^2	k_1	R^2	K_p	n
	0,06	0,034	0,99	0,012	0,99	1,06	0,009

FONTE: A Autora (2022).

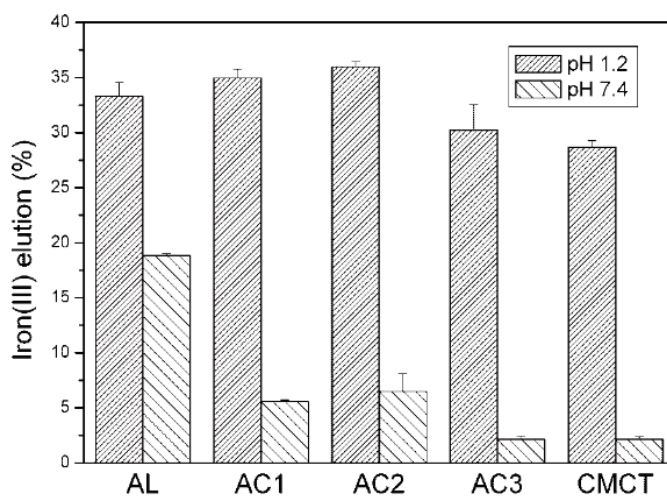
Legenda: Q é a quantidade de OEB liberado no tempo t , Q_0 é o valor inicial do OEB, k é a constante cinética, K_p é a constante de Korsmeyer-Peppas e n é o expoente de difusão.

A liberação do OEB em meio ácido ocorre por dois motivos. O primeiro é devido à solubilidade da quitosana nessas condições, o que desestabiliza a interação eletrostática entre este polímero e o alginato. Essa desestabilização auxilia no afrouxamento das cadeias e, consequentemente, na liberação do material encapsulado.

O outro motivo está relacionado à protonação dos grupos carboxilatos do alginato em pH 2. A protonação desses grupos torna a interação eletrostática com o Fe^{3+} pouco efetiva e, ao mesmo tempo, favorece a interação entre as cadeias de alginato por meio da formação de ligações de hidrogênio, o que aproxima as cadeias gerando uma contração das cápsulas⁴⁶. Nesse caso, dependendo do tipo de material encapsulado, este mantém-se aprisionado e a taxa de liberação para o meio é menor⁴⁶. No caso do OEB, pode-se observar que este foi prontamente liberado com a desestabilização da interação entre o Fe^{3+} e os grupos carboxilatos.

Na literatura, Shi e colaboradores⁷⁵ quantificaram a presença de Fe^{3+} liberado em meio ácido e neutro após 24 h (a 37°C) da imersão de cápsulas alginato/ Fe^{3+} (AL), alginato/ Fe^{3+} /carboximetil-quitina (CMCT) nas proporções alginato/CMCT 2:1 (AC1), 1:1(AC2) e 1:2 (AC3) e CMCT/ Fe^{3+} . Os resultados desses autores encontram-se na Figura 29, onde é possível observar uma maior liberação de Fe^{3+} em pH 1,2. Corroborando com a teoria apresentada anteriormente de que, em meio ácido, a interação do Fe^{3+} com as cadeias de alginato é pouco efetiva. Além disso, também foi possível observar que para as cápsulas de CMCT/ Fe^{3+} , houve maior liberação de Fe^{3+} , o que demonstra a instabilidade do complexo nesse meio.

Figura 29. Concentração de Fe^{3+} liberado das cápsulas após 24 h à 37°C em meio ácido (pH 1,2) e neutro (pH 7,4).



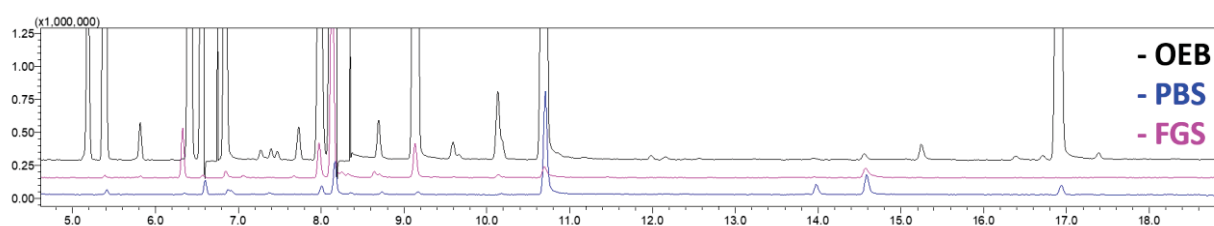
FONTE: Shi *et al.*⁷⁵

Dada a alta taxa de liberação do OEB pelas cápsulas em FGS, sugere-se que a contração das cadeias de alginato nesse meio possa ter aberto um caminho para o OEB permear pela matriz (juntamente com o Fe^{3+}) ou que o tempo necessário para a contração da cadeia foi o suficiente para liberação quase completa do OEB.

A técnica de UV-Vis permitiu a quantificação do OEB liberado pelas cápsulas em pH 6,8 e 2. Para complementar as informações obtidas, também foi feita uma análise de cromatografia por injeção *headspace* do tampão PBS e FGS após os testes de estabilidade das cápsulas. Nessas análises, o líquido coletado na liberação foi aquecido (100 °C) e avaliou-se por GC-MS os componentes voláteis da solução. O OEB puro também foi analisado por esta técnica para comparação dos resultados.

Os cromatogramas (Figura 30) foram obtidos para o OEB puro, tampão PBS após 24h de liberação das cápsulas e para FGS após 2 h. Informações como o tempo de retenção, área, similaridade e nome do composto identificado em cada pico estão na Tabela 11.

Figura 30. Comparação dos cromatogramas obtidos por GC-MS ingestão *headspace* para o OEB (em preto) e o tampão PBS (azul) e FGS (rosa) após liberação das cápsulas em 24h e 2h, respectivamente.



FONTE: A Autora (2022).

Tabela 11. Tempo de retenção, área, similaridade e nome do composto identificado nos cromatogramas obtidos por GC-MS ingestão *headspace* para o OEB (em preto) e para os líquidos do tampão PBS (azul) e FGS (rosa) após liberação das cápsulas em 24 h e 2 h, respectivamente.

Tempo de Retenção			Área (%)			Similaridade (%)			Nome do composto identificado
OEB	PBS	FGS	OEB	PBS	FGS	OEB	PBS	FGS	
5.182	-	-	1.07	-	-	96	-	-	α -tujeno
5.386	5.415	-	5.49	1.48	-	95	92	-	α -pineno
-	-	6.328	-	-	9.81	-	-	93	Pirano
6.411	-	-	4.42	-	-	96	-	-	Sabieno
6.574	6.600	-	10.89	5.35	-	96	96	-	β -pineno
6.842	6.875	6.848	2.44	3.15	1.33	96	94	95	β -mirceno
7.981	8.005	7.975	2.68	3.71	8.23	95	93	95	Cimeno
8.173	8.165	8.133	34.78	14.14	64.35	96	96	97	(R)- Limoneno
9.148	-	9.134	14.34	-	8.35	96	-	96	γ -Terpeno
10.704	10.710	10.694	11.39	51.34	3.26	97	97	96	Linalol
-	13.975	-	-	5.03	-	-	91	-	Terpinen-4-ol
-	14.585	14.574	-	10.75	3.01	-	94	94	α -Terpineol
16.914	16.940	-	11.61	5.05	-	97	95	-	Acetato de Linalila

FONTE: A Autora (2022).

Os cromatogramas da Figura 30 referem-se aos componentes voláteis encontrados na solução de PBS e FGS após liberação do OEB. Esses componentes, listados na Tabela 11, são comumente encontrados em OE. No entanto, alguns deles foram detectados somente no OEB puro enquanto outros foram identificados em PBS e/ou FGS. Os únicos componentes que foram identificados em ambos os meios e no OEB puro foram β -mirceno, cimeno, (R)- limoneno e linalol. Essa diferença observada pode ser um indicativo de que houve alguma alteração na composição do OEB após ser liberado nesses meios.

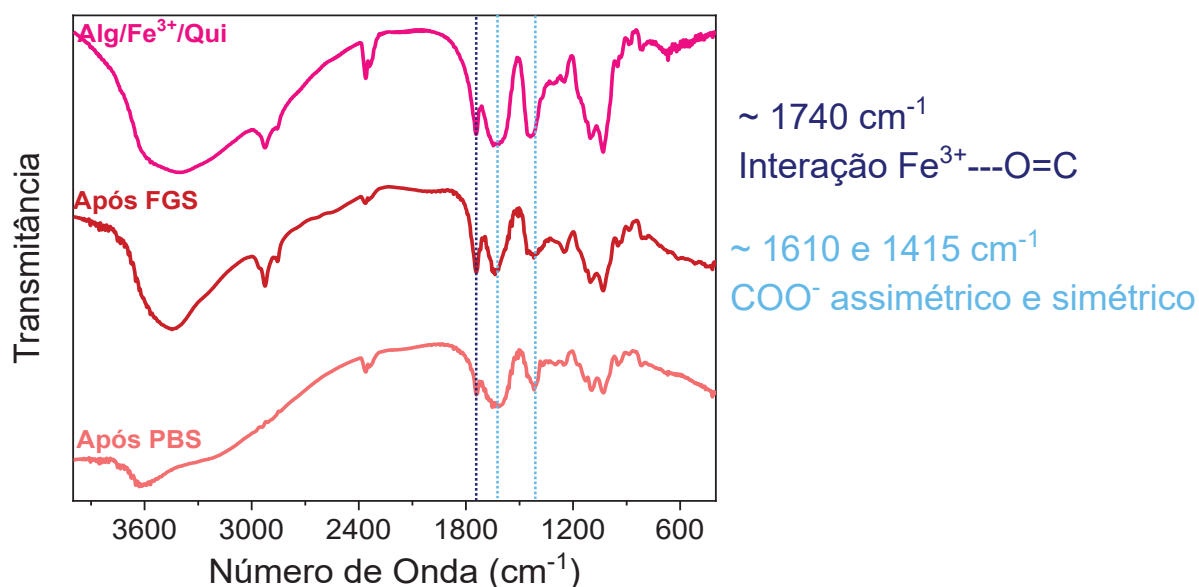
O (R)-limoneno, um dos componentes majoritários do OEB e principal ativo responsável pela alta ação acaricida (item 5.1.2) contra o *Rhipicephalus microplus* foi detectado em PBS e FGS, o que é um bom resultado para a aplicação proposta nesse projeto.

5.2.4.3 FTIR das cápsulas após testes com variação do pH

Espectros das cápsulas após estas permanecerem em FGS e PBS (Figura 31) também foram obtidos com a finalidade de identificar mudanças estruturais que corroborassem com o comportamento observado nesses meios. Pasparakis *et al.*⁸⁴ e Lin *et al.*⁸⁵ atribuem as bandas em 1740 cm^{-1} somente ao estiramento do grupo carboxílico (COOH) do alginato. Em seus trabalhos, os autores mencionam o surgimento dessa banda quando as cápsulas são expostas ao meio FGS e o desaparecimento destas quando estão em PBS ou água.

No espectro da Figura 31 foi possível observar que essa banda está mais pronunciada em FGS, quando comparadas as cápsulas secas e após PBS, o que pode ser um indicativo da protonação do grupo COO^- nesse meio. Outra diferença encontrada na mesma figura encontra-se nos estiramentos assimétrico e simétrico de COO^- , no qual as bandas aparecem mais alargadas nas cápsulas secas e após PBS. Como em FGS há favorecimento das interações entre a cadeia do alginato e o Fe^{3+} pode estar sendo liberado para o meio, o afinamento dessa banda pode ser um indicativo de que a interação com o Fe^{3+} está sendo alterada.

Figura 31. Espectro de FTIR-ATR para as cápsulas Alg/ Fe^{3+} /Qui secas, após 24h em PBS e 2h em FGS. Ao lado estão as principais bandas e os referentes estiramentos.



FONTE: A Autora (2022).

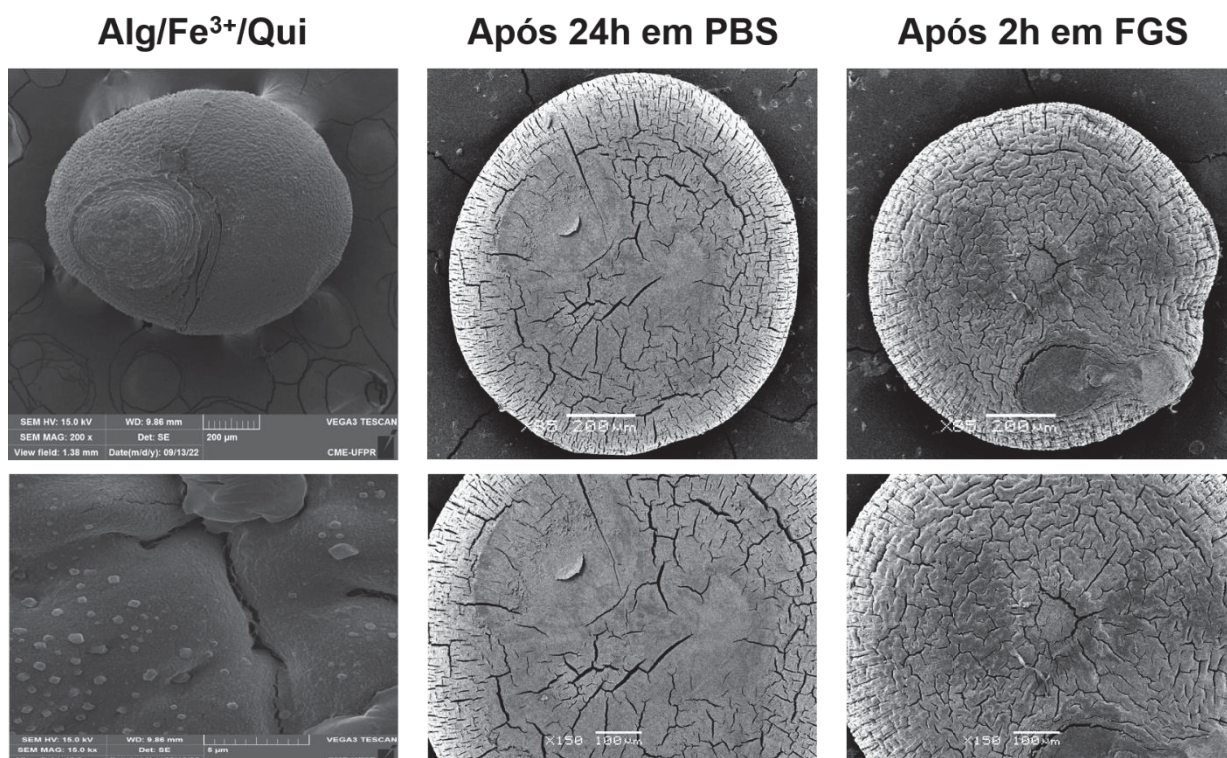
5.2.4.4 MEV das cápsulas após testes com variação do pH

A morfologia das cápsulas foi analisada por MEV antes e após a liberação em PBS e FGS, conforme ilustrado na Figura 32. As cápsulas antes da liberação

apresentaram uma superfície levemente rugosa com algumas rachaduras. Essas aberturas podem ter contribuído para a liberação do OEB mesmo sem estímulo do meio, conforme foi evidenciado no item 5.2.3.2. Após 24 h em PBS, houve um aumento no número de rachaduras na parede polimérica da cápsula e após 2 h em FGS notou-se um aumento drástico na rugosidade e aberturas na superfície.

Entre os meios, é possível observar um aspecto mais rugoso e com mais rachaduras na cápsula após FGS do que em PBS. Essa característica corrobora com as informações mencionadas nos testes de estabilidade (item 5.2.4), onde houve uma liberação mais rápida em FGS do que em PBS.

Figura 32. MEV para as cápsulas de Alg/Fe³⁺/Qui secas, após 24h em PBS e 2h em FGS.



FONTE: A Autora (2022).

5.3 PARTE III

5.3.1.1 Estabilidade das cápsulas em condições ruminais

O teste de digestão ruminal é geralmente utilizado para avaliar a digestibilidade de alimentos/suplementos pelo rúmen. Para determinar o quanto foi digerido pelo rúmen, é comparado o peso da amostra antes de entrar em contato com o líquido ruminal com o peso da amostra depois da sua retirada. As amostras são acondicionadas em estufa a 105°C por 24 h antes e após o teste, para garantir que

qualquer resíduo de água seja eliminado do cálculo de digestibilidade. O peso da amostra seca antes do teste recebe o nome de matéria seca. Para a aplicação proposta nesse projeto, o objetivo desse teste foi a verificação da integridade das cápsulas após permanecerem em contato com líquido ruminal por 24 h.

No caso das cápsulas, a matéria seca refere-se a massa dos polímeros (alginato e quitosana) e do agente reticulante, Fe^{3+} . Isso porque ao colocar as cápsulas em estufa aquecida por 24 h, todo conteúdo volátil de seu interior foi evaporado. Esse conteúdo refere-se ao OEB e qualquer resíduo de água preso nas paredes poliméricas das cápsulas. O valor obtido de matéria seca foi de 71,12 % (m/m).

Depois de 24 h em incubação com o líquido ruminal, as cápsulas foram lavadas e colocadas em estufa novamente por 24 h. Após esse período, elas foram pesadas e, os valores de matéria seca foram comparados. Essa comparação em massa fornece o valor da digestibilidade das cápsulas em líquido ruminal. O valor determinado foi $87,65 \pm 11,73$ % (m/m), indicando que mais de 80 % das cápsulas foram afetadas pela fermentação do rúmen. Em aspecto visual, as cápsulas perderam o formato esférico e apresentaram uma consistência em pó.

Como mencionado no item 5.2.3.1, as cápsulas obtidas nesse projeto possuem tamanho pequeno suficiente para passagem direta do rúmen para o abomaso. Dessa forma, acredita-se que estas não permaneceriam tanto tempo (24 h) em contato com os microrganismos e bactérias do rúmen. O que é possível inferir com as informações obtidas até o momento é que as cápsulas que não passarem direto para o abomaso terão seu conteúdo liberado no rúmen devido a possível digestão das cápsulas por esses microorganismos.

Para uma resposta mais precisa sobre o tempo que as cápsulas são capazes de permanecer no rúmen sem perder suas características iniciais é necessário realizar mais testes de digestão ruminal com intervalos de tempo menores. Para este trabalho, analisou-se o cenário mais crítico de 24 h.

Na literatura, há outra aplicação envolvendo OE e rúmen. Pesquisadores vêm estudando os efeitos dos componentes de OEs sobre a fermentação ruminal com o intuito de diminuir a liberação de metano e nitrogênio amoniacal para o ambiente. Essa linha de pesquisa tem ganhado maior destaque desde 2006, quando a União Europeia proibiu o uso de antibióticos como aditivos alimentares em vacas leiteiras, devido ao risco de resíduos no leite. Por esta razão, há um grande interesse em avaliar o potencial

de antimicrobianos naturais, como OE, que são geralmente reconhecidos como seguros para consumo humano^{86–90}.

Como a alta volatilidade e o forte aroma do OE poderiam reduzir a palatabilidade e consumo da ração pelos bovinos, uma alternativa eficiente seria a microencapsulação do OE. Neste trabalho, confirmou-se que a matriz de alginato e quitosana foi eficiente para encapsular o OEB e liberá-lo totalmente em contato com o líquido ruminal em até 24 h. Essas características podem tornar esse trabalho uma alternativa viável para os estudos mencionados acima, cujo objetivo seria a entrega do OE no rúmen.

6. CONCLUSÕES

Esse projeto de pesquisa se propôs a encapsular OEB em matriz polimérica de alginato e quitosana e testar a estabilidade das cápsulas em condições ruminais visando desenvolver um novo método de tratamento de carrapatos em ruminantes.

O OEB apresentou alta ação acaricida em teleóginas adultas, sendo capaz de eliminar próximo de 60 % destas na menor concentração testada 1 % (m/V) e 99,7 % a 6 % (m/V). O composto isolado (R)-limomeno demonstrou eficiência ainda maior, com 90,7 % a 1 % (m/V) e 100 % a partir de 4 % (m/V). Esses resultados são promissores para o desenvolvimento de um tratamento com ativos naturais, algo completamente inédito do que está sendo ofertado comercialmente nesse ramo. Para larvas na transição entre o estágio de vida livre e início da fase parasitária, as concentrações testadas de OE não foram suficientes para desempenhar taxas significativas de mortalidade.

A encapsulação do OEB foi feita com polímeros naturais, alginato e quitosana, por meio das técnicas de gelificação ionotrópica e coacervação complexa, que fazem uso de condições reacionais brandas a temperatura ambiente. Os parâmetros experimentais de síntese foram amplamente estuda

dos, sendo avaliados o tipo de M^{n+} , proporção entre os polímeros e entre alginato/ M^{n+} . Cápsulas com formato esférico e melhor desempenho nos testes de estabilidade em tampão PBS foram obtidas com Fe^{3+} , proporção 5:1 (m/m) alginato/quitosana e 1:0,05 (m/mol L^{-1}) para alginato/ Fe^{3+} .

As cápsulas obtidas apresentaram tamanho de 1 mm, sendo um ótimo indicativo de que conseguiriam passar do rúmen para o abomaso sem sofrerem o processo de ruminação¹⁸. Além disso, o sistema foi capaz de encapsular 73 % de OEB,

o que é um alto valor considerando que a EE % foi obtida após 3 dias, tempo necessário para secagem completa das cápsulas. Pela técnica FTIR verificou-se a encapsulação do OEB por uma banda detectada em 1237 cm^{-1} que estava presente no OEB puro, nas cápsulas com OEB e ausente nas cápsulas vazias.

As cápsulas também foram submetidas a testes de estabilidade em pH 6,8 (tampão PBS) por 24 h simulando o pH encontrado no rúmen e por 2 h em pH 2 (FGS), pH encontrado no abomaso. Em ambos os meios as cápsulas mantiveram seu formato esférico e a matriz polimérica não se desintegrou, o que demonstra a alta resistência mecânica das cápsulas, característica necessária para a aplicação proposta.

A liberação do OEB em FGS foi mais rápida do que em PBS e seguiu os perfis cinéticos de primeira ordem e Korsmeyer-Peppas. Dessa forma, concluiu-se que a liberação rápida ocorreu devida a alta concentração de OEB encapsulada e que o mecanismo de liberação foi por difusão controlada. Em PBS, a liberação de OEB se ajustou ao perfil de primeira ordem. Em FGS, houve 94 % (m/m) de OEB liberado em 24 h e, em PBS, 93 % (m/m) em 24 h.

A diferença na velocidade de liberação do OEB é uma comprovação de que a cápsula utilizada neste trabalho é estímulo responsiva ao pH. Uma ótima característica para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada.

A morfologia das cápsulas foi avaliada por MEV antes e depois dos testes de estabilidade. Antes dos testes, observou-se a presença de pequenos poros e rachaduras na parede das cápsulas. Após os testes, detectou-se um aumento nessas aberturas em ambos os meios. No entanto, em FGS, esse aumento foi mais intenso, corroborando com os dados de liberação obtidos neste meio.

As cápsulas também foram avaliadas pelo teste *in vitro* de digestão ruminal, nas quais foram colocadas em contato com líquido ruminal por 24 h. Depois desse período, foi detectado que 87 % das cápsulas foram digeridas pelos microrganismos e bactérias presentes no rúmen. Como o teste foi feito em condições extremas (24 h), não foi possível determinar quanto tempo as cápsulas são capazes de permanecer nesse meio sem perder suas características. Dessa forma, é necessário a realização de mais testes em intervalos de tempos menores para obter essa informação.

As cápsulas foram projetadas para passar direto do rúmen para o abomaso devido ao seu tamanho e alta resistência mecânica. O que é possível inferir pelos testes apresentados nesse trabalho é que as cápsulas que não passarem direto para o abomaso sofreriam digestão no rúmen. Além disso, o OEB encapsulado possui alta

ação acaricida, sendo uma opção inovadora para o tratamento de carrapatos em ruminantes.

6.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir dos resultados apresentados neste trabalho, propõe-se as seguintes etapas futuras:

- Estudar a adição de polímeros sintéticos mais resistentes e com formação de matriz menos porosa, como poli (álcool) vinílico PVA, no revestimento da matriz de alginato/quitosana bem como os parâmetros da síntese e se há diminuição na taxa de liberação do OEB em pH 6,8 (ou pH 1,2 dependendo da aplicação desejada).
- Estudar a adição de outro reticulante em conjunto com o Fe^{3+} , como o glutaraldeído, a fim de diminuir a porosidade da matriz de quitosana, devido sua alta reatividades com aminas. Também é possível estudar a utilização de mais de um cátion, como Fe^{3+} e Cu^{2+} .
- Estudar o uso de um alginato mais rico em Blocos G para avaliar se há diminuição na porosidade das cápsulas e conseqüentemente menor liberação do OEB.
- Estudar outra via de aplicação do OEB em ruminantes para tratamento de carrapatos, como a transdérmica.
- Estudar o efeito do OEB nos microrganismos do rúmen a partir da matriz polimérica proposta nesse projeto, avaliando se houve diminuição de metano e de nitrogênio amoniacal, responsáveis pelo desempenho da produção e liberação de poluentes ao meio ambiente.
- Aumentar a quantidade de OEB encapsulado e estudar seus efeitos na matriz polimérica de alginato/quitosana com o intuito de descobrir a capacidade máxima de encapsulação, o que não foi avaliado nesse trabalho.
- Estudar a mistura do OEB com um óleo fixo, como o óleo de linhaça (OL), a fim de diminuir a capacidade do OE de permear pela matriz polimérica. Em um estudo isolado neste projeto, calculou-se 64 % de eficiência de encapsulação com OL e 1,20 % de liberação em PBS após 24 h. Além da adição de um óleo fixo, pode-se adicionar um ácido graxo, como o ácido esteárico, que é sólido a temperatura ambiente, o que dificultaria a liberação do OEB da matriz polimérica.

- Estudar a diminuição do tamanho das cápsulas para escala nano, a fim de verificar se há um aumento na eficiência de encapsulação, bem como diminuição na taxa de liberação do OEB.

REFERÊNCIAS

1. Cui J, Koeverden MP Van, Müllner M, Kempe K, Caruso F. Emerging methods for the fabrication of polymer capsules. *Adv. Colloid Interface Sci.* [Internet]. 2014;207(1):14–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2013.10.012>
2. McClements DJ. Designing biopolymer microgels to encapsulate, protect and deliver bioactive components: Physicochemical aspects. *Adv. Colloid Interface Sci.* [Internet]. 2017;240:31–59. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2016.12.005>
3. Risch SJ. Encapsulation: Overview of Uses and Techniques. 1995;(7):2–7.
4. Amstad E. Capsules: Their past and opportunities for their future. *ACS Macro Lett.* 2017;6(8):841–847.
5. Nascimento LD do, Cascaes MM, Costa KS da, Andrade EH de A, Andrade EL, Costa CML, et al. MICROENCAPSULAMENTO DE ÓLEOS ESSENCIAIS: CONCEITOS E APLICAÇÕES [Internet]. In: Voigt CL, editor. *A Produção do Conhecimento na Engenharia Química*. Ponta Grossa, PR: Atena Editora; 2019. p. 22–35. Available from: <https://www.atenaeditora.com.br/arquivos/ebooks/a-produção-do-conhecimento-na-engenharia-quimica>
6. Taban A, Saharkhiz MJ, Khorram M. Formulation and assessment of nano-encapsulated bioherbicides based on biopolymers and essential oil. *Ind. Crops Prod.* [Internet]. 2020;149(January):112348. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112348>
7. Becherán-Marón L, Peniche C, Argüelles-Monal W. Study of the interpolyelectrolyte reaction between chitosan and alginate: Influence of alginate composition and chitosan molecular weight. *Int. J. Biol. Macromol.* 2004;34(1–2):127–133.
8. Hirano S. Chitin Biotechnology Applications. *Biotechnol. Annu. Rev.* 1996;2(C):237–258.
9. Patil P, Chavanke D, Wagh M. A review on ionotropic gelation method: Novel approach for controlled gastroretentive gelispheres. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2012;4(SUPPL. 4):27–32.
10. Rodrigues FJ, Omura MH, Cedran MF, Dekker RFH, Barbosa-Dekker AM, Garcia S. Effect of natural polymers on the survival of *Lactobacillus casei* encapsulated in alginate microspheres. *J. Microencapsul.* 2017;34(5):431–439.
11. Bürger C, Maffezzolli S, Clasen P, Lucinda-Silva RM, Rodrigues CA. Chitosan-

- alginate capsules as oral delivery system for insulin: Studies in vitro and in vivo. *Rev. Ciencias Farm. Basica e Apl.* 2008;29(3):239–244.
12. George M, Abraham TE. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review. *J. Control. Release.* 2006;114(1):1–14.
 13. Taqieddin E, Amiji M. Enzyme immobilization in novel alginate-chitosan core-shell microcapsules. *Biomaterials.* 2004;25(10):1937–1945.
 14. Peng W, Li D, Dai K, Wang Y, Song P, Li H, et al. Recent progress of collagen, chitosan, alginate and other hydrogels in skin repair and wound dressing applications. *Int. J. Biol. Macromol.* [Internet]. 2022;208(March):400–408. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.002>
 15. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Painei de Indicadores [Internet]. 2022 [cited 2022 Apr 25]; Available from: <https://www.ibge.gov.br/indicadores.html>
 16. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT [Internet]. 2020. Available from: https://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity_exports
 17. Bowersock TL, Shalaby WSW, Levy M, Blevins WE, White MR, Borie DL, et al. The potential use of poly(methacrylic acid) hydrogels for oral administration of drugs and vaccines to ruminants. *J. Control. Release.* 1994;31(3):245–254.
 18. Pell AN, Wu SH, Welch JG. Design parameters for post-ruminal drug delivery systems and rumen-stable products. *Control. Release Vet. Drug Deliv.* 2000;83–113.
 19. Domingues D, Mario M, Arrigoni DB, Dias R, Pacheco L. *Rumenology*. São Paulo: Springer International Publishing; 2016.
 20. Anderson MD, Minn EP. BY-PASS RUMEN PRODUCT. 1999;(19).
 21. Sæther HV, Holme HK, Maurstad G, Smidsrød O, Stokke BT. Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan. *Carbohydr. Polym.* 2008;74(4):813–821.
 22. Sanna V, Gavini E, Giunchedi P. Bilayer tablets based on poly (ϵ -caprolactone) and polymethylmethacrilates as controlled-release systems for ruminants. *Pharm. Dev. Technol.* 2004;9(3):321–328.
 23. MOLENTO MB. AVALIAÇÃO SELETIVA DE BOVINOS PARA CONTROLE DO *Rhipicephalus microplus*. 2020.

24. Alves WV, Lorenzetti ER, Gonçalves FC. Utilização De Acaricidas a Base De Plantas No Controle De Rhipicephalus (Boophilus) Microplus : Uma Contribuição Para a Produção E Desenvolvimento Sustentável. Rev. Bras. Agropecuária Sustentável. 2012;2(2):14–25.
25. Salman M, Abbas RZ, Israr M, Abbas A, Mehmood K, Khan MK, et al. Repellent and acaricidal activity of essential oils and their components against Rhipicephalus ticks in cattle. Vet. Parasitol. [Internet]. 2020;283(June):109178. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109178>
26. Molento MB. Parasite control in the age of drug resistance and changing agricultural practices. Vet. Parasitol. 2009;163(3):229–234.
27. Ribeiro NC, Camara CAG da, Melo JPR, Moraes MM de. Acaricidal properties of essential oils from agro-industrial waste products from citric fruit against Tetranychus urticae. J. Appl. Entomol. 2019;143(7):731–743.
28. Effiom O, Avoaja D, Ohaeri O. Mosquito Repellent Activity of Phytochemical. Glob. J. Sci. Front. Res. 2012;12(1):2249–4626.
29. Shezryna S, Anisah N, Saleh I, Syamsa RA. Acaricidal activity of the essential oils from citrus hystrix (Rutaceae) and cymbopogon citratus (poaceae) on the cattle tick rhipicephalus (boophilus) microplus larvae (acari: Ixodidae). Trop. Biomed. 2020;37(2):433–442.
30. Pazinato R, Volpato A, Baldissera MD, Santos RCV, Baretta D, Vaucher RA, et al. In vitro effect of seven essential oils on the reproduction of the cattle tick Rhipicephalus microplus. J. Adv. Res. 2016;7(6):1029–1034.
31. Garbin VP, Munguía B, Saldaña JC, Deschamps C, Cipriano RR, Molento MB. Chemical characterization and in vitro anthelmintic activity of Citrus bergamia Risso and Citrus X paradisi Macfad essential oil against Haemonchus contortus Kirby isolate. Acta Trop. 2021;217(February).
32. LEMETTER, C. Y. G.; MEEUSE, F. M.; ZUIDAM NJ. Control of the Morphology and the Size of Complex Coacervate Microcapsules During Scale-up. AIChE J. 2009;55(6):1487–1496.
33. Silva BC da. MICROCÁPSULA MULTIFUNCIONAL PARA APLICAÇÃO EM REVESTIMENTOS INTELIGENTES. 2018;
34. Kruif CG De, Weinbreck F, Vries R De. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 2004;9(5):340–349.
35. Marques da Silva T, Jacob Lopes E, Codevilla CF, Cichoski AJ, Flores ÉM de M,

- Motta MH, et al. Development and characterization of microcapsules containing Bifidobacterium Bb-12 produced by complex coacervation followed by freeze drying. *LWT* [Internet]. 2018;90:412–417. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643817309519>
36. Azevedo MA, Bourbon AI, Vicente AA, Cerqueira MA. Alginate/chitosan nanoparticles for encapsulation and controlled release of vitamin B2. *Int. J. Biol. Macromol.* [Internet]. 2014;71:141–146. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.05.036>
 37. Gåserød O, Sannes A, Skjåk-Bræk G. Microcapsules of alginate-chitosan. II. A study of capsule stability and permeability. *Biomaterials*. 1999;20(8):773–783.
 38. Ching SH, Bansal N, Bhandari B. Alginate gel particles—A review of production techniques and physical properties. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* [Internet]. 2017;57(6):1133–1152. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2014.965773>
 39. Lee KY, Mooney DJ. Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* [Internet]. 2012;37(1):106–126. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>
 40. Simas-Tosin FF, Grein-Iankovski A, Vidotti M, Riegel-Vidotti IC. Polysaccharides as green biodegradable platforms for building-up electroactive composite materials: An overview. *Handb. Compos. from Renew. Mater.* 2017;1–8:377–417.
 41. Chan LW, Lee HY, Heng PWS. Mechanisms of external and internal gelation and their impact on the functions of alginate as a coat and delivery system. *Carbohydr. Polym.* 2006;63(2):176–187.
 42. Paques JP, Linden E van der, Rijn CJMM Van, Sagis LMCC. Preparation methods of alginate nanoparticles. *Adv. Colloid Interface Sci.* [Internet]. 2014;209:163–171. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2014.03.009>
 43. Sarmento B, Ribeiro AJ, Veiga F, Ferreira DC, Neufeld RJ. Insulin-loaded nanoparticles are prepared by alginate Ionotropic pre-gelation followed by chitosan polyelectrolyte complexation. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2007;7(8):2833–2841.
 44. Al-Musa S, Abu Fara D, Badwan AA. Evaluation of parameters involved in preparation and release of drug loaded in crosslinked matrices of alginate. *J. Control. Release*. 1999;57(3):223–232.
 45. Menakbi C, Quignard F, Mineva T. Complexation of Trivalent Metal Cations to

- Mannuronate Type Alginate Models from a Density Functional Study. *J. Phys. Chem. B*. 2016;120(15):3615–3623.
46. Massana Roquero D, Othman A, Melman A, Katz E. Iron(iii)-cross-linked alginate hydrogels: A critical review. *Mater. Adv.* 2022;3(4):1849–1873.
 47. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.* 2006;31(7):603–632.
 48. Dutta PK. Chitin and chitosan: Properties and applications. *J. Sci. Ind. Res.* 2004;63(November 2003):20–31.
 49. Vizzotto M, Krolow AC, Weber GEB. *Metabólitos Secundários Encontrados em Plantas e sua Importância*. 1st ed. Pelotas, RS: Embrapa Clima Temperado; 2010.
 50. Palazzolo E, Armando Laudicina V, Antonietta Germanà M. Current and Potential Use of Citrus Essential Oils. *Curr. Org. Chem.* 2013;17(24):3042–3049.
 51. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils - A review. *Food Chem. Toxicol.* 2008;46(2):446–475.
 52. Adenubi OT, McGaw LJ, Eloff JN, Naidoo V. In vitro bioassays used in evaluating plant extracts for tick repellent and acaricidal properties: A critical review. *Vet. Parasitol.* 2018;254(May 2017):160–171.
 53. Lazcano Díaz E, Padilla Camberos E, Castillo Herrera GA, Estarrón Espinosa M, Espinosa Andrews H, Paniagua Buelnas NA, et al. Development of essential oil-based phyto-formulations to control the cattle tick *Rhipicephalus microplus* using a mixture design approach. *Exp. Parasitol.* [Internet]. 2019;201(August 2018):26–33. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.04.008>
 54. Grisi L, Leite RC, Martins JR de S, Barros ATM de, Andreotti R, Cançado PHD, et al. Reavaliação do potencial impacto econômico de parasitos de bovinos no Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2014;23(2):150–156.
 55. Ellse L, Wall R. The use of essential oils in veterinary ectoparasite control: A review. *Med. Vet. Entomol.* 2014;28(3):233–243.
 56. Souza Chagas AC de, Sena Oliveira MC de, Giglioti R, Santana RCM, Bizzo HR, Gama PE, et al. Efficacy of 11 Brazilian essential oils on lethality of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Ticks Tick. Borne. Dis.* [Internet]. 2016;7(3):427–432. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.01.001>
 57. Erasto P, Viljoen AM. Limonene - A Review: Biosynthetic, Ecological and Pharmacological Relevance. *Nat. Prod. Commun.* 2008;3(7):1193–1202.

58. Vinturelle R, Mattos C, Meloni J, Nogueira J, Nunes MJ, Vaz IS, et al. In vitro evaluation of essential oils derived from piper nigrum (Piperaceae) and Citrus limonum (Rutaceae) against the tick rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae). *Biochem. Res. Int.* 2017;2017:9.
59. Navarra M, Mannucci C, Delbò M, Calapai G. Citrus bergamia essential oil: From basic research to clinical application. *Front. Pharmacol.* 2015;6(MAR):1–7.
60. Drummond RO, Ernst SE, Trevino JL, Gladney WJ, Graham OH. Tests of acaricides for control of Boophilus annulatus and B. microplus. *J. Econ. Entomol.* 1976;69(1):37–40.
61. Chagas AC de S, Passos WM, Prates HT, Leite RC, Furlong J, Fortes ICP. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de Eucalyptus spp em Boophilus microplus. *Brazilian J. Vet. Res. Anim. Sci.* 2002;39(5):247–253.
62. Lucas, Elizabete F. Soares, Bluma G. Monteiro EEC. Caracterização de Polímeros - Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica. 1st ed. Rio de Janeiro: e-papers; 2001.
63. Jensen, H. M; Larsen, F. H; Engelsen SB. Characterization of Alginates by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Vibrational Spectroscopy (IR, NIR, Raman) in Combination with Chemometrics. In: Stengel DB, Connan S, editors. *Natural Products From Marine Algae: Methods and Protocols.* 2015. p. 1–439.
64. Papas A, Wu S. Rumen-stable delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1997;28(3):323–334.
65. Cao QR, Lee ES, Choi YJ, Cho CS, Lee BJ. Rumen bypass and biodistribution of l-carnitine from dual-layered coated pellets in cows, in vitro and in vivo. *Int. J. Pharm.* 2008;359(1–2):87–93.
66. Avila-Sosa R, Navarro-Cruz AR, Sosa-Morales ME, López-Malo A, Palou E. Bergamot (Citrus bergamia) oils [Internet]. Elsevier Inc.; 2016. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00027-4>
67. Ferrarini SR, Duarte MO, Rosa RG da, Rolim V, Eifler-Lima VL, Poser G von, et al. Acaricidal activity of limonene, limonene oxide and β -amino alcohol derivatives on Rhipicephalus (Boophilus) microplus. *Vet. Parasitol.* 2008;157(1–2):149–153.
68. Peixoto MG, Costa-Júnior LM, Blank AF, Lima A da S, Menezes TSA, Santos D de A, et al. Acaricidal activity of essential oils from Lippia alba genotypes and its major components carvone, limonene, and citral against Rhipicephalus microplus. *Vet. Parasitol.* [Internet]. 2015;210(1–2):118–122. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.03.010>
69. Shilpa A, Agrawal SS, Ray AR. Controlled delivery of drugs from alginate matrix. *J. Macromol. Sci. - Polym. Rev.* 2003;43(2):187–221.
 70. Benavides S, Cortés P, Parada J, Franco W. Development of alginate microspheres containing thyme essential oil using ionic gelation. *Food Chem.* [Internet]. 2016;204:77–83. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814616302746>
 71. Paris MJ, Ramírez-Corona N, Palou E, López-Malo A. Modelling release mechanisms of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oil encapsulated in alginate beads during vapor-phase application. *J. Food Eng.* 2020;282(December 2019).
 72. Lim G-P, Ahmad MS. Development of Ca-alginate-chitosan microcapsules for encapsulation and controlled release of imidacloprid to control dengue outbreaks. *J. Ind. Eng. Chem.* [Internet]. 2017;56:382–393. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1226086X17304057>
 73. Yousefi M, Khanniri E, Shadnoush M, Khorshidian N, Mortazavian AM. Development, characterization and in vitro antioxidant activity of chitosan-coated alginate microcapsules entrapping *Viola odorata* Linn. extract. *Int. J. Biol. Macromol.* [Internet]. 2020;163:44–54. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813020337041>
 74. Lai F, Lin B, Mo F, Xu C, Lin M. Novel Composite Microparticles of Alginate Coated with Chitosan for Controlled Release and Protection of Ascorbic Acid. *Adv. Polym. Technol.* 2017;36(1):58–67.
 75. Shi XW, Du YM, Sun LP, Yang JH, Wang XH, Su XL. Ionically crosslinked alginate/carboxymethyl chitin beads for oral delivery of protein drugs. *Macromol. Biosci.* 2005;5(9):881–889.
 76. Shuai F, Zhang Y, Yin Y, Zhao H, Han X. Fabrication of an injectable iron (III) crosslinked alginate-hyaluronic acid hydrogel with shear-thinning and antimicrobial activities. *Carbohydr. Polym.* [Internet]. 2021;260(January):117777. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117777>
 77. Kang M, Oderinde O, Liu S, Huang Q, Ma W, Yao F, et al. Characterization of Xanthan gum-based hydrogel with Fe³⁺ ions coordination and its reversible sol-gel conversion. *Carbohydr. Polym.* [Internet]. 2019;203(July 2018):139–147. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.09.044>

78. Hata H, Onishi H, MacHida Y. Preparation of CM-chitin microspheres by complexation with iron(III) in w/o emulsion and their biodisposition characteristics in mice. *Biomaterials*. 2000;21(17):1779–1788.
79. Marques Neto JO De, Bellato CR, Milagres JL, Pessoa KD, Alvarenga ES De. Preparation and evaluation of chitosan beads immobilized with iron(III) for the removal of As(III) and As(V) from water. *J. Braz. Chem. Soc.* 2013;24(1):121–132.
80. Bajpai SK, Sharma S. Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca^{2+} and Ba^{2+} ions. *React. Funct. Polym.* 2004;59(2):129–140.
81. Seoud OA El, Baader WJ, Bastos EL. *Practical Chemical Kinetics in Solution*. 2016.
82. Costa, P. ; Lobo JMS. Modeling and comparison of dissolution profiles of diltiazem modified-release formulations. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2001;13:122–133.
83. Swamy BY, Yun YS. In vitro release of metformin from iron (III) cross-linked alginate-carboxymethyl cellulose hydrogel beads. *Int. J. Biol. Macromol.* [Internet]. 2015;77:114–119. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.03.019>
84. Pasparakis G, Bouropoulos N. Swelling studies and in vitro release of verapamil from calcium alginate and calcium alginate-chitosan beads. *Int. J. Pharm.* 2006;323(1–2):34–42.
85. Lin YH, Liang HF, Chung CK, Chen MC, Sung HW. Physically crosslinked alginate/N,O-carboxymethyl chitosan hydrogels with calcium for oral delivery of protein drugs. *Biomaterials*. 2005;26(14):2105–2113.
86. BENETEL G. Uso de óleos essenciais como estratégia moduladora da fermentação ruminal para mitigação das emissões de metano por bovinos Nelore [Internet]. 2018;Available from: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/74/74131/tde-22102018-115741/pt-br.php>
87. Calsamiglia S, Busquet M, Cardozo PW, Castillejos L, Ferret A. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* [Internet]. 2007;90(6):2580–2595. Available from: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2006-644>
88. Busquet M, Calsamiglia S, Ferret A, Kamel C. Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* [Internet]. 2006;89(2):761–771. Available from: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72137-3](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72137-3)

89. Molero R, Ibars M, Calsamiglia S, Ferret A, Losa R. Effects of a specific blend of essential oil compounds on dry matter and crude protein degradability in heifers fed diets with different forage to concentrate ratios. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2004;114(1–4):91–104.
90. Lin B, Lu Y, Salem AZM, Wang JH, Liang Q, Liu JX. Effects of essential oil combinations on sheep ruminal fermentation and digestibility of a diet with fumarate included. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2013;184(1–4):24–32.

Legenda: ATE = GC2, solução de água, polisorbato 80 e álcool etílico.

Produtos	Peso das Teleógenas	Postura Completa	Postura Parcial	Inviável	Sem Postura	Peso da Postura	Eclodibilidade (%)	Eficiência Reprodutiva	Média ER	Eficiência do Produto
Água	2,10	5	5	0	0	1,03	90	882857	836758	0,00
Água (a)	2,08	3	7	0	0	1,08	75	778846		
Água (b)	2,10	8	1	0	0	0,99	90	848571		
ATE	2,11	8	1	0	1	0,93	90	793365	622016	25,66
ATE (a)	2,08	8	2	0	0	0,9	75	649038		
ATE (b)	2,03	7	3	0	0	0,86	50	423645		
Colosso	2,10	0	0	2	8	0	0	0	0	100,00
Colosso (a)	2,04	0	0	1	9	0	0	0		
Colosso (b)	2,09	0	0	0	10	0	0	0		
Limoneno 1%	2,06	5	2	1	2	0,54	10	52427	57899	93,08
Limoneno (a) 1%	2,03	4	2	1	3	0,5	20	98522		
Limoneno (b) 1%	2,11	3	0	1	6	0,24	10	22749		
Limoneno 2%	2,07	2	1	0	7	0,21	5	10145	36222	95,67
Limoneno (a) 2%	2,03	4	2	1	3	0,5	20	98522		
Limoneno (b) 2%	2,08	0	0	0	10	0	0	0		
Limoneno 4%	2,04	0	0	0	10	0	0	0	0	100,00
Limoneno (a) 4%	2,06	0	0	0	10	0	0	0		
Limoneno (b) 4%	2,05	0	0	0	10	0	0	0		
Limoneno 6%	2,06	1	0	0	9	0,06	0	0	0	100,00
Limoneno (a) 6%	2,08	0	0	0	10	0	0	0		
Limoneno (b) 6%	2,08	0	0	0	10	0	0	0		
OE de Bergamota 1%	2,03	7	1	0	2	0,66	25	162562	250327	70,08
OE de Bergamota (a) 1%	2,06	8	1	0	1	0,77	50	373786		
OE de Bergamota (b) 1%	2,05	9	1	0	0	0,88	25	214634		
OE de Bergamota 2%	2,04	5	3	0	2	0,62	25	151961	142197	83,01
OE de Bergamota (a) 2%	2,07	4	2	0	4	0,51	25	123188		
OE de Bergamota (b) 2%	2,08	7	1	1	1	0,63	25	151442		
OE de Bergamota 4%	2,06	3	0	0	7	0,27	5	13107	20369	97,57
OE de Bergamota (a) 4%	2,07	1	0	0	9	0,07	0	0		
OE de Bergamota (b) 4%	2,00	2	1	1	6	0,24	20	48000		
OE de Bergamota 6%	2,05	0	1	0	9	0,04	0	0	1618	99,81
OE de Bergamota (a) 6%	2,05	0	0	0	10	0	0	0		
OE de Bergamota (b) 6%	2,06	2	0	0	8	0,1	5	4854		

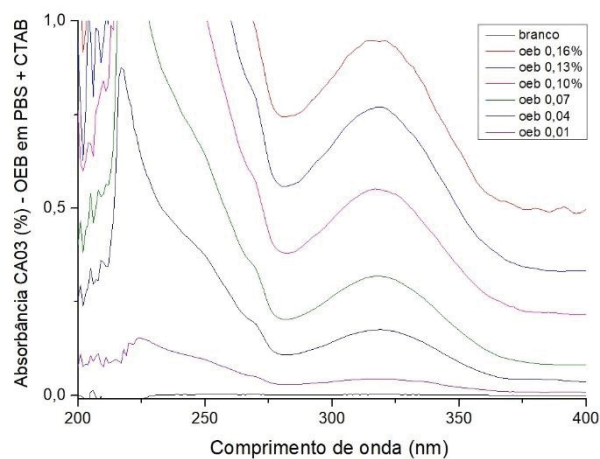
APÊNDICE 2 – DADOS BRUTOS TPL

Legenda: ATE = GC2, solução de água, polisorbato 80 e álcool etílico.

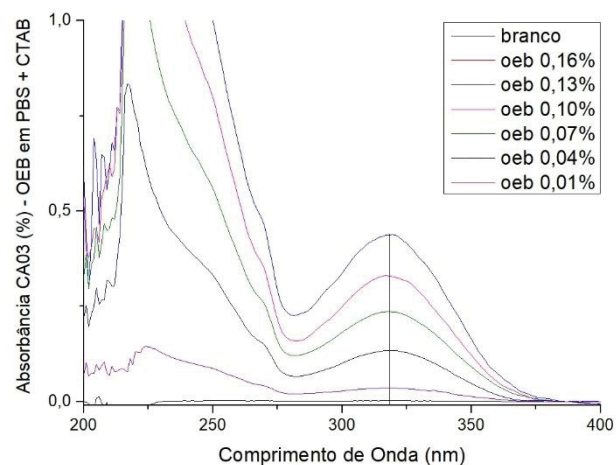
Produto	Larvas Vivas	Larvas Mortas	% Mortalidade	% Mortalidade Média
Água	136	3	2,16	2,28
Água	115	1	0,86	
Água	122	0	0,00	
Água	123	8	6,11	
ATE	95	6	5,94	2,07
ATE	126	3	2,33	
ATE	102	0	0,00	
ATE	128	0	0,00	
Colosso	0	138	100,00	99,77
Colosso	0	131	100,00	
Colosso	1	107	99,07	
Colosso	0	103	100,00	
OE Bergamota 2%	146	18	10,98	5,58
OE Bergamota 2%	197	2	1,01	
OE Bergamota 2%	83	2	2,35	
OE Bergamota 2%	127	11	7,97	
OE Bergamota 4%	159	16	9,14	11,33
OE Bergamota 4%	119	16	11,85	
OE Bergamota 4%	100	20	16,67	
OE Bergamota 4%	169	14	7,65	

APÊNDICE 3 – INFORMAÇÕES ADICIONAIS SOBRE A METODOLOGIA DE QUANTIFICAÇÃO DO OEB EM PBS + CTAB

Dados brutos



Dados ajustados, descontando as alterações na linha base



Liberação calculada pelo sobrenadante

