



REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA - RENORBIO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

**OLGA OLIVEIRA DOS ANJOS**

**OBTENÇÃO DE FILMES POLIMÉRICOS BIODEGRADÁVEIS PARA  
AUXILIAR NO CONTROLE DO CARRAPATO *RHIPICEPHALUS*  
*MICROPLUS***

São Luís

2023

**OLGA OLIVEIRA DOS ANJOS**

**OBTENÇÃO DE FILMES POLIMÉRICOS BIODEGRADÁVEIS PARA  
AUXILIAR NO CONTROLE DO CARRAPATO *RHIPICEPHALUS*  
*MICROPLUS***

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Lívio Martins Costa Júnior

**Coorientador:** Prof. Dr. Adeilton Pereira Maciel

**Área de conhecimento:** Biotecnologia em agropecuária

São Luís

2023

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

OLIVEIRA DOS ANJOS, OLGA.

OBTENÇÃO DE FILMES POLIMÉRICOS BIODEGRADÁVEIS PARA  
AUXILIAR NO CONTROLE DO CARRAPATO RHIPICEPHALUS MICROPLUS  
/ OLGA OLIVEIRA DOS ANJOS. - 2023.

96 f.

Coorientador(a): Adelson Pereira Maciel.

Orientador(a): Lívio Martins Costa Júnior.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia -  
Renorbio/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2023.

1. Amido. 2. Monoterpenos. 3. Polímeros. I. MartinsCosta Júnior, Lívio. II.  
Pereira Maciel, Adelson. III. Título.

**OLGA OLIVEIRA DOS ANJOS**

**OBTENÇÃO DE FILMES POLIMÉRICOS BIODEGRADÁVEIS PARA  
AUXILIAR NO CONTROLE DO CARRAPATO *RHIPICEPHALUS*  
*MICROPLUS***

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Lívio Martins Costa Júnior Orientador

---

Prof<sup>ª</sup> Dra. Rachel Melo Ribeiro  
Examinador 1  
UFMA/RENORBIO

---

Prof<sup>º</sup> Dr. Caio Pavão Tavares  
Examinador 2  
UFMA/Ciências da saúde

---

Prof<sup>ª</sup> Dra. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes  
SUPLENTE 1  
UFMA/RENORBIO

---

Prof<sup>º</sup> Dr. Éverton Kort Kamp Fernandes  
Examinador 3  
UFG

---

Prof<sup>ª</sup> Dra. Ilka South de Lima Cantanhêde  
Examinador 4  
IFMA

---

Prof<sup>º</sup> Dr. Luciano Muniz Cavalcante  
SUPLENTE 2  
UEMA

## **AGRADECIMENTOS**

Agreço a Deus, pois a fé sempre foi meu alicerce nesta tão sonhada trajetória.

Ao prof<sup>o</sup> Dr. Lívio Martins Costa Júnior, por me orientar e pela dedicação a nossapesquisa.

Ao prof<sup>o</sup> Dr Adelton Pereira Maciel, pela coorientação na pesquisa e por toda sabedoriae paciência desde o início desta caminhada.

Aos meus pais Raimunda de Jesus Oliveira dos Anjos e Antonio José Oliveira dos Anjospelo amor e por acreditarem em mim.

Aos meus filhos Maryana Oliveira dos Anjos e João Felipe Oliveira dos Anjos, poralegrarem meus dias com sua inocência e por compreenderem os momentos de ausência.

A Nadya, Nayra, Gildete e Hélio por acolher e apoiar meus sonhos.

A prof<sup>a</sup> Cáritas Mendonça que sempre esteve pronta para ensinar e aconselhar durante a etapas experimentais do trabalho.

Ao Núcleo de Combustíveis, Catálise e Ambiental (NCCA) por disponibilizar o espaço físico e equipamentos para o desenvolvimento de parte desta pesquisa.

Ao Laboratório de Controle de Parasitas (LCP) pelo apoio na condução dos testes paraaplicação dos filmes.

À Universidade Federal do Maranhão, por disponibilizar a infraestrutura necessária pararealização desta pesquisa.

A Fundação de Amparo a Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico doMaranhão (FAPEMA) pela concessão da bolsa.

A todos os colegas da UFMA que colaboraram com este trabalho.

A todos que contribuíram de forma direta e indireta. Muito obrigada!

"Tem que ter esperança ativa. Aquela que é do verbo esperar, não do verbo esperar. O verbo esperar é aquele que aguarda, enquanto o verbo esperar é aquele que busca, que procura, que vai atrás".

Mário Sergio Cortela

## RESUMO

ANJOS, Olga Oliveira dos. **Obtenção de filmes poliméricos biodegradáveis para auxiliar no controle do carrapato *Rhipicephalus microplus***. 2023. 111 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2022.

Filmes poliméricos biodegradáveis podem ser utilizados na indústria de fármacos, de alimentos e na produção de insumos agropecuários. O amido de milho (*Zea mays L.*) é um polissacarídeo de origem natural, composto por amilose e amilopectina, com propriedades para formação de filmes. A alta disponibilidade deste biopolímero, tem facilitado sua avaliação em pesquisas com filmes poliméricos, sendo associados a moléculas naturais como os monoterpenos carvacrol e timol, a presença dos filmes pode diminuir a volatilidade dos terpenos, aumentando sua bioatividade. Carvacrol e timol tem sido avaliados como alternativa promissora no controle do carrapato dos bovinos – parasito de grande importância econômica na pecuária. Considerando o exposto, o presente estudo teve como objetivo desenvolver filmes biodegradáveis de amido de milho (*Zea mays L.*) que possam otimizar o uso de monoterpenos no controle do carrapato bovino *Rhipicephalus microplus*. Para isso, foi utilizado um planejamento experimental de mistura, onde treze soluções poliméricas foram obtidas por meio da gelatinização do amido de milho, em composição com glicerol e álcool polivinílico (PVOH). As soluções foram submetidas a técnica de casting, resultando em filmes poliméricos. As soluções foram caracterizadas quanto ao pH e percentual de espuma. Os filmes foram classificados quanto ao aspecto visual, manuseabilidade (quebradiços, intermediários ou contínuos), espessura, morfologia, solubilidade em água e biodegradabilidade. Os filmes contínuos (BSF-6, BSF-8, BSF-9, BSF-13) foram selecionados e avaliados quanto sua atividade biológica em testes de imersão larval sobre o carrapato *R. microplus*. Observou-se que as quatro soluções formaram películas sobre as larvas, deixando-as “coladas” umas as outras e letárgicas. A caracterização anterior e os resultados dos testes em larvas permitiram selecionar as soluções BSF-8 (90% amido + 10% glicerol) e BSF-13 (100% de amido) para serem associadas aos monoterpenos carvacrol e timol, e posteriormente avaliadas em testes de imersão sobre larvas nas concentrações: 5,0, 2,5, 1,25, 0,625, 0,313, 0,125 mg/mL de cada monoterpeno, isolados e em associação com cada filme e grupos controles de 1% de solução de etanol e 10% solução de etanol; e em testes de imersão em adultos do carrapato *R. microplus*, sendo atribuídos dez grupos experimentais (n = 10): 1) carvacrol, 2) filme 1 + Carvacrol, 3) filme 2 + Carvacrol, 4) timol, 5) filme 1 + timol, 6) filme 2 + timol, 7) água destilada, 8) solução de etanol a 10%, 9) filme 1 e 10) filme 2 com a concentração de 5,0 mg/ml para cada monoterpeno. Os resultados mostraram que o carvacrol e o timol apresentaram atividade acaricida sobre larvas de *R. microplus* com CL50 de 0,765 e 0,691 mg/ml, respectivamente. Em relação aos adultos, os filmes biodegradáveis incorporados com monoterpenos mostraram CL50 significativamente mais baixa, composta por carvacrol e de timol isoladamente. A melhor formulação foi o filme 1 + timol (CL50 = 0,076 mg/ml), potencializando o efeito do timol em aproximadamente 9,0 vezes. Carvacrol e timol nas concentrações testadas foram eficazes no controle de fêmeas ingurgitadas, com porcentagem de 32,2% e 63,8%, respectivamente. Quando incorporados às formulações de filmes biodegradáveis, esses monoterpenos mostraram uma eficácia muito maior. Filme 1 + Carvacrol e filme 2 +

Carvacrol com controle de 71,6% e 97,2%, respectivamente, enquanto as formulações filme 1 + timol e filme 2 + timol mostraram valores de 96,9% e 100,0%. As formulações de biopolímeros com timol e carvacrol demonstraram altas taxas de mortalidade para larvas e fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus*. Estes resultados indicam que essas formulações têm grande potencial para controle de carrapatos, principalmente devido à porcentagem de controle de até 100% em fêmeas em testes *in vitro*. Considerando os resultados obtidos, esta tese colabora com as pesquisas em biotecnologia, uma vez que foram formuladas soluções poliméricas com características biodegradáveis, obtidas a partir de matéria prima de baixo custo, para o controle do carrapato *R. microplus*.

Palavras-chave: Polímeros; Monoterpenos; Amido.



## ABSTRACT

ANJOS, Olga Oliveira dos. **Obtaining biodegradable polymeric films to help control the *Rhipicephalus microplus* tick.** 2022. 111 f. Thesis (Doctorate in Biotechnology) - Federal University of Maranhão, São Luís, 2022.

Biodegradable polymeric films can be used in the pharmaceutical, food and agricultural inputs industries. Corn starch (*Zea mays* L.) is a polysaccharide of natural origin, composed of amylose and amylopectin, with properties for film formation. The high availability of this biopolymer has facilitated its evaluation in research with polymeric films, being associated with natural molecules such as the monoterpenes carvacrol and thymol, the presence of the films can decrease the volatility of the terpenes, increasing their bioactivity. Carvacrol and thymol have been evaluated as a promising alternative in the control of the cattle tick - a parasite of great economic importance in cattle breeding. Considering the above, the present study aimed to develop corn starch (*Zea mays* L.) biodegradable films that can optimize the use of monoterpenes in the control of the bovine tick *Rhipicephalus microplus*. For this, a mixture experimental planning was used, where thirteen polymeric solutions were obtained by gelatinization of corn starch, in composition with glycerol and polyvinyl alcohol (PVOH). The solutions were submitted to the casting technique, resulting in polymeric films. The solutions were characterized for pH and foam percentage. The films were graded on visual appearance, handling (brittle, intermediate or continuous), thickness, morphology, water solubility and biodegradability. The continuous films (BSF-6, BSF-8, BSF-9, BSF-13) were selected and evaluated for their biological activity in larval immersion tests on the tick *R. microplus*. It was observed that all four solutions formed films on the larvae, leaving them "glued" to each other and lethargic. The previous characterization and the results of tests on larvae allowed the selection of solutions BSF-8 (90% starch + 10% glycerol) and BSF-13 (100% starch) to be associated with the monoterpenes carvacrol and thymol, and subsequently evaluated in immersion tests on larvae at concentrations: 5.0, 2.5, 1.25, 0.625, 0.313, 0.125 mg/mL of each monoterpene, alone and in association with each film and control groups of 1% ethanol solution and 10% ethanol solution; and in immersion tests on adults of the tick *R. microplus*, being assigned ten experimental groups (n = 10): 1) carvacrol, 2) film 1 + Carvacrol, 3) film 2 + Carvacrol, 4) thymol, 5) film 1 + thymol, 6) film 2 + thymol, 7) distilled water, 8) 10% ethanol solution, 9) film 1 and 10) film 2 with the concentration of 5.0 mg/ml for each monoterpene. The results showed that carvacrol and thymol showed acaricidal activity on *R. microplus* larvae with LC<sub>50</sub> of 0.765 and 0.691 mg/ml, respectively. Regarding adults, the biodegradable films incorporated with monoterpenes showed significantly lower LC<sub>50</sub> composed of carvacrol and thymol alone. The best formulation was film 1 + thymol (CL<sub>50</sub> = 0.076 mg/ml), potentiating the effect of thymol by approximately 9.0 times. Carvacrol and thymol at the concentrations tested were effective in controlling engorged females, with percentages of 32.2% and 63.8%, respectively. When incorporated into biodegradable film formulations, these monoterpenes showed much greater efficacy. Film 1 + Carvacrol and film 2 + Carvacrol with control of 71.6% and 97.2%, respectively, while film 1 + thymol and film 2 + thymol formulations showed values of 96.9% and 100.0%. The biopolymer

formulations with thymol and carvacrol showed high mortality rates for larvae and engorged females of the tick *R. microplus*. These results indicate that these formulations have great potential for tick control, mainly due to the percentage of control of up to 100% in females in in vitro tests. Considering the results obtained, this thesis collaborates with research in biotechnology, since polymeric solutions with biodegradable characteristics, obtained from low cost raw material, were formulated for the control of the tick *R. microplus*.

Keywords: Polymers; Monoterpenes; Starch.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Representação do processo de polimerização.....	18
Figura 2	- Estrutura química da amilose (a) e amilopectina (b).....	20
Figura 3	- Representação do processo de gelatinização do amido.....	21
Figura 4	- Representação da técnica de casting para obtenção de filmespoliméricos.....	22
Figura 5	- Exemplo de aplicações de biopolímeros e filmes poliméricos.	24
Figura 6	- Ciclo de vida do carrapato bovino <i>Rhipicephalus microplus</i> .	26
Figura 7	- Estrutura química dos monoterpenos Carvacrol (A) e Timol (B).....	29
Figura 8	- Fluxograma das etapas para obtenção de filmes biodegradáveis de amido de milho ( <i>Zea mays</i> L.)associados com monoterpenos carvacrol e timol para o controle de larvas e adultos do carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	31

### CAPÍTULO I

Figura 1	- Número de publicações no período de 2012 a 2022 com os termos de consulta “filmepolimérico” e “agricultura”.....	49
Figura 2	- Número de publicações no período de 2012 a 2022 com os termos de consulta “filme polimérico” e “veterinária”.....	49

### CAPÍTULO II

	Graphic abstract.....	53
Figura 1	- Preparation of the polymeric solutions and obtaining the films by the castingmethod.....	65
Figura 2	- A) Films of pure corn starch or in combination with PVOH and glycerol. B) Micrographs of the morphological characteristics of CS: GRO: PVOH films: B.1) surface, B.2) cross section of BSF -6 film; B.3) surface, B.4) cross section of BSF -8 film; B.5) surface, B.6) cross section of BSF -9 film; B.7) surface, B.8) cross section ofBSF -13 film.....	65
Figura 3	- Images regarding the biodegradability process of polymeric films BSF -06,BSF -08, BSF -09 and BSF -13 in soil. Times 0 to Time 7 correspond to the number of weeks the film was	

	in contation with the soil.....	66
Figura 4	- Spectra referring to the biodegradability process of CS: GRO: PVOH films A)BSF - 06; B) BSF - 08; C) BSF -09 and D) BSF -13.....	67
Figura 5	- Evidence of the formation of the films on cattle tick larvae: a.1 (BSF-6), b.1 (BSF-8), c.1 (BSF-9) e d.1 (BSF-13) about larvae after 24 hours of the immersion test; a.2 (BSF-6), b.2 (BSF-8), c.2 (BSF-9) and d.2 (BSF-13) films on larvae after 48 hoursof the immersion test.....	67
 <b>CAPÍTULO II</b>		
Figura 1	- <i>Rhipicephalus microplus</i> larvae after treatments.....	82
Figura 2	- Oviposition profile and mortality of <i>Rhipicephalus microplus</i> engorged females submitted to different treatments.	84

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Classificação dos polímeros.....	19
<b>CAPÍTULO I</b>		
Tabela 1	- Percentual de amilose e amilopectina em diferentes fontes de amido.....	50
Tabela 2	- Principais pesquisas relacionadas a aplicações de filmes poliméricos/polímerosbiodegradáveis aplicados a agropecuária no período de 2012 a 2022.....	50
<b>CAPÍTULO II</b>		
Tabela 1	- Percentage of reagents used in the preparation of the polymer solutions.....	64
Tabela 2	- pH values, foam percentage and thickness (mm) for solutions and polymericfilms obtained from different compositions of CS: GRO: PVOH.....	64
<b>CAPÍTULO III</b>		
Tabela 1	- Lethal concentration of carvacrol and thymol (free or incorporated in two differentbiodegradable film formulations) on <i>Rhipicephalus microplus</i> larvae.....	81
Tabela 2	- Effects of carvacrol and thymol (free or incorporated in two different biodegradable film formulations) in the reproductive parameters andmortality of <i>Rhipicephalus microplus</i> engorged females.....	83

## LISTA DE SIGLAS

MEV	-	Microscopia Eletrônica de Varredura
FTIR	-	Espectroscopias de Infravermelho
BOD	-	Biochemical Oxygen Demand
BSF	-	Biodegradable Starch Films
CS	-	Corn Starch
Eq	-	Equação
Fig	-	Figura
AchE	-	Enzima Acetilcolinesterase
GRO	-	Glicerol
H	-	Horas
IUPAC	-	International Union of Pure and Applied Chemistry
cm	-	Centímetros
FTIR	-	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
G	-	Gramas
LC50	-	Lethal Concentration (Mg/MI) For 50% of Individuals
MEV	-	Microscopia Eletrônica de Varredura
Mf	-	Assa Final
Mg	-	Miligramas
Mi	-	Massa Inicial
MS	-	Amido de Milho
CS: GRO: PVOH	-	Mistura Polimérica de Amido de Milho, Glicerol e Álcool Polivinílico
PA	-	Para Análise
pH	-	Potencial de Hidrogénio
PVOH	-	Alcool Polivinílico
SEM	-	Scanning Electron Microscopy
UFMA	-	Universidade Federal do Maranhão
UR	-	Umidade Relativa

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>Polímeros.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2</b>	<b>Filmes poliméricos.....</b>	<b>21</b>
<b>2.3</b>	<b>Aplicações dos filmes poliméricos em usos veterinários.....</b>	<b>23</b>
<b>2.4</b>	<b>O carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i>.....</b>	<b>25</b>
2.4.1	Controle do carrapato dos bovinos ( <i>R. microplus</i> ).....	26
2.4.1.1	Monoterpenos.....	28
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
<b>3.1</b>	<b>Geral.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2</b>	<b>Específicos.....</b>	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>31</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
	<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>32</b>
	<b>FILMES POLIMÉRICOS BIODEGRADÁVEIS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO PARA O CONTROLE DE PARASITOS NO SETORAGROPECUÁRIO.....</b>	<b>33</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>2</b>	<b>FILMES BIODEGRADÁVEIS.....</b>	<b>34</b>
<b>2.1</b>	<b>Filmes poliméricos biodegradáveis.....</b>	<b>35</b>
<b>3</b>	<b>PRINCIPAIS POLÍMEROS UTILIZADOS NA ELABORAÇÃO DE FILMESBIODEGRADÁVEIS.....</b>	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>MISTURAS POLIMÉRICAS E ADITIVOS.....</b>	<b>37</b>
<b>5</b>	<b>APLICAÇÕES DOS FILMES POLIMÉRICOS PARA A AGROPECUÁRIA.....</b>	<b>39</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>40</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>41</b>
	<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>51</b>
	<b>DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF BIODEGRADABLE STARCH FILMS WITH PROPERTIES TO OPTIMIZE THE USE OF ACARICIDES.....</b>	<b>52</b>

<b>1</b>	<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>53</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL AND METHODS.....</b>	<b>54</b>
<b>2.1</b>	<b>Materials.....</b>	<b>54</b>
<b>2.2</b>	<b>Film preparation.....</b>	<b>54</b>
2.2.1	Development of the polymeric solutions.....	54
<b>2.3</b>	<b>Morphology.....</b>	<b>55</b>
2.3.1	Drying of films, visual aspects, water solubility, thickness.....	55
2.3.2	Scanning electron microscopy (SEM) .....	55
<b>2.4</b>	<b>Biodegradability.....</b>	<b>55</b>
<b>2.5</b>	<b>Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR).....</b>	<b>55</b>
<b>2.6</b>	<b>Acaricidal tests.....</b>	<b>56</b>
2.6.1	Tick maintenance.....	56
2.6.2	Bioassays for acaricide activity.....	56
<b>3</b>	<b>STATISTICAL ANALYSIS.....</b>	<b>56</b>
<b>4</b>	<b>RESULTS.....</b>	<b>57</b>
<b>4.1</b>	<b>Visual aspects of the films.....</b>	<b>57</b>
<b>4.2</b>	<b>pH, foam percentage, thickness.....</b>	<b>57</b>
<b>4.3</b>	<b>Water solubility.....</b>	<b>57</b>
<b>4.4</b>	<b>Scanning electron microscopy.....</b>	<b>57</b>
<b>4.5</b>	<b>Biodegradability of films.....</b>	<b>57</b>
<b>4.6</b>	<b>FTIR spectra of the films.....</b>	<b>58</b>
<b>4.7</b>	<b>Acaricide activity.....</b>	<b>58</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSION.....</b>	<b>58</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSION.....</b>	<b>59</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>60</b>
	<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>69</b>
	<b>POLYMERIC FILMS OF CORN STARCH ENHANCE THE</b>	
	<b>LETHAL EFFECTS OF THYMOL AND CARVACROL TERPENES</b>	
	<b>UPON <i>RHIPICEPHALUS MICROPLUS</i> TICKS.....</b>	<b>70</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>71</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL AND METHODS.....</b>	<b>72</b>
<b>3</b>	<b>RESULTS.....</b>	<b>73</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSION.....</b>	<b>74</b>



	<b>REFERENCES.....</b>	<b>76</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>85</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>86</b>
	<b>ANEXO A – COMPROVANTES DE SUBMISSÃO DOS ARTIGOS.....</b>	<b>94</b>