



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102021009223-8 A2



(22) Data do Depósito: 12/05/2021

(43) Data da Publicação Nacional: 04/01/2022

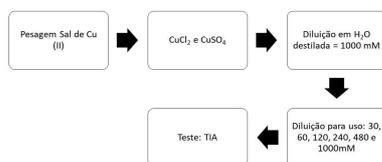
(54) **Título:** COBRE, CU (II) PARA USO COMO PARASITICIDA E AÇÃO SINÉRGICA NO CONTROLE DE ENDO E ECTOPARASITOS (ENDECTOCIDA) EM ANIMAIS DOMÉSTICOS

(51) **Int. Cl.:** A61K 33/34; A61P 33/00.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA; UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS.

(72) **Inventor(es):** CARLA JULIANA RIBEIRO DOLENGA; MARCELO BELTRÃO MOLENTO; EDUARDO JOSÉ DE ARRUDA.

(57) **Resumo:** COBRE (CU-II), PARA USO COMO PARASITICIDA E AÇÃO SINÉRGICA NP CONTROLE DE ENDO E ECTOPARASITOS (ENDECTOCIDA) EM ANIMAIS DOMÉSTICOS. A presente invenção consiste na utilização de misturas do parasiticida NTX e produtos similares biologicamente ativos - sal de Cu-II e/ou complexos cúpricos e/ou associação com sais de Cu-II, como cloreto e sulfato de Cu-II (contraíons), para aplicação nos espaços produtivos e não produtivos, para o controle/supressão de endo e ectoparasitos e/ou controle populacional destes. A mistura NTX e sais de Cu-II induz a potencialização e maior atividade biológica ao produto veterinário. Estas misturas foram avaliadas quanto à sua eficiência para o controle de nematodas gastrintestinais de ovinos e bovínose do carrapato *Rhipicephalus microplus*. Os resultados mostraram que a CI50 de ambas as soluções, em combinação com o CI10 de NTX apresentaram efeito sinérgico em L3 de ovinos e bovinos. Desse modo, a mistura NTX com sal de Cu-II (cloreto e sulfato) atendem ao propósito de novas formulações para o controle de endo e ectoparasitos, tendo ação sinérgica para aplicações com ações abrangentes/multifuncionais, com utilização veterinária e agregação de valor a produtos convencionais como NTX e similares comerciais para o controle/(...).



COBRE (CU-II) PARA USO COMO PARASITICIDA E AÇÃO SINÉRGICA NO CONTROLE DE ENDO E ECTOPARASITOS (ENDECTOCIDA) EM ANIMAIS DOMÉSTICOS

Setor técnico

[001] A invenção considera o uso de soluções de íons cobre (Cu-II) isolados e em combinações sinérgicas com Nitroxinil 34% (NTX) e produtos similares, com íons Cu-II para o controle de endoparasitos (nematodas gastrintestinais) e ectoparasitos (carrapatos, berne, moscas) de ruminantes por potencialização e/ou abrangência de efeitos biológicos para melhorias na saúde animal e humana.

Problemas técnicos existentes

[002] O principal problema de saúde animal são as infecções por parasitos que afetam o bem-estar, a produtividade e a qualidade dos produtos de origem animal. As infecções parasitárias causam uma significativa diminuição do bem-estar animal e graves perdas de produtividade em ovinos, bovinos e outros animais da atividade pecuária e ainda pequenos animais, como cães e gatos. As metodologias de controle de parasitos em animais domésticos são baseadas no controle contínuo das doenças, devido as características das criações a campo e a atividade tóxica dos produtos utilizados no controle, causando inclusive alto grau de contaminação ambiental. Neste aspecto, dada a grande dificuldade para o controle de parasitos em ruminantes, devido a resistência por parasitos selecionados, o objetivo da presente patente de propriedade intelectual é demonstrar a eficácia das soluções à base de cobre; cloreto e sulfato de Cu-II contra nematodas gastrintestinais (NGI) e o carrapato *Rhipicephalus microplus*, que parasitam bovinos e outros ruminantes. Os NGI mais comuns e que foram usados nesta proposta são *Haemonchus* spp.,

Trichostrongylus spp., *Ostertagia* sp., *Oesophagostomum* sp. e *Cooperia* spp.

[003] Os experimentos com Cu-II foram realizados contra os NGI com três testes: eclodibilidade de ovos (TEO), desenvolvimento larvar (TDL), e o teste de inibição da migração larvar (TIML). O TIML ainda foi utilizado para testar a combinação das soluções de Cu-II com o medicamento nitroxinil 34% (NTX). O NTX é uma molécula que faz parte do grupo dos substitutos fenólicos, e é denominada como 4-hidroxi-3-iodo-5-nitrobenzonitrila. Os substitutos fenólicos apresentam eficácia sobre cestodas, trematodas e alguns nematodas hematófagos. O ativo NTX foi escolhido por já ter sido usado na rotina com os animais no estudo e tem comércio mundial, podendo ainda ser utilizado em humanos. O teste de imersão em adultos (TIA) foi utilizado para o *R. microplus* (carrapatos). Para os NGI, os experimentos foram realizados para verificar a eficácia de soluções isoladas nas concentrações de 2,0; 7,0; 30; 125; 500 e 2000 μM . Os resultados experimentais mostraram que para o cloreto de cobre (CuCl_2), a eficácia foi de 12, 34, 48, 77, 86 e 95% para as larvas mistas de terceiro estágio (L3) de NGI de ovinos, e de 12, 39, 47, 77, 89 e 95% de eficácia para L3 de NGI de bovinos. O sulfato de cobre (CuSO_4), mostrou eficácia de 5,0; 34; 49; 73; 87 e 97% para L3 de NGI de ovinos e de 8,0; 33; 47; 69; 84 e 93% para L3 de NGI de bovinos (Tabela 1). Os resultados experimentais mostraram uma diferença significativa ($P < 0,05$) na eficácia entre todas as concentrações das soluções utilizadas, porém, quando as mesmas concentrações utilizadas foram comparadas entre ovinos e bovinos, não houve diferença estatística. As concentrações inibitórias (CI) de 10, 30, 50, 70 e 90 μM foram estabelecidas através da análise das curvas de eficácias obtidas (Tabelas 2, 3, 4 e 5). As CI de ambas as soluções foram testadas em combinação com as mesmas CI_{50} e CI_{10} de NTX. As maiores eficácias

das soluções utilizadas foram encontradas contra L3 de ovinos nas combinações de NTX e Cu-II: 88% com a combinação de Cl_{50} de $CuCl_2$ e a Cl_{10} de NTX, e 77% com a Cl_{50} de $CuSO_4$ e a Cl_{10} de NTX. Nos resultados para bovinos, a eficácia foi de 91% com a Cl_{50} de $CuCl_2$ e a Cl_{10} de NTX, e 79% com a Cl_{50} de $CuSO_4$ combinado com a Cl_{10} de NTX (Tabelas 6 e 7). Todos os resultados experimentais mostraram que a Cl_{50} de ambas as soluções, em combinação com o Cl_{10} de NTX apresentaram efeito sinérgico (potencialização), uma vez que a soma das eficácias foi maior que a soma das doses isoladas. Nos testes de TEO com ovos e o TDL com as L3, foram aplicadas a Cl_{10} , Cl_{50} e Cl_{90} de $CuCl_2$ e $CuSO_4$. Na análise, foi observado efeito concentração-dependente, na medida em que a dose foi aumentada, aonde uma menor quantidade de ovos eclodiu até L1 (TEO), e uma menor quantidade de L1 desenvolveu até L3 (TDL). Houve diferença estatística na eficácia ($P < 0,05$), entre as concentrações, mas não entre as soluções utilizadas (Tabelas 8 e 9). As soluções de $CuCl_2$ e $CuSO_4$ foram utilizadas no TIA, nas concentrações de 30, 60, 120, 240, 480 e 1000 mM, assim como a água destilada, como controle negativo (CN). A combinação de cipermetrina a 20% e clorpirifós a 50% como controle positivo (CP) também foi testada. O cálculo da eficácia geral (TIA + eclodibilidade de larvas + taxa de reprodução) do $CuCl_2$ foi de 81, 82, 87, 89, 100 e 100% e 61, 43, 62, 93, 100 e 98% para o $CuSO_4$ (Tabela 10). Não foi observada diferença estatística entre as concentrações testadas ($P > 0,05$). As lâminas histológicas dos ovários das fêmeas de *R. microplus* foram confeccionadas para análise por microscopia ótica. As visualizações das micrografias mostraram alterações morfológicas nos ovócitos, vacuolização citoplasmática, perda da membrana plasmática, descaracterização da vesícula germinal e córion, perda da parede do ovário, alterações nucleares e degeneração vacuolar após tratamento com 240, 480 e 1000 mM de $CuCl_2$ e $CuSO_4$ (Tabela 11).

Ambas as soluções de Cu-II foram testadas em células MDBK (*Madin-DarbyBovineKidney*) com o objetivo de verificar sua viabilidade (Tabela 12). Nas análises, foi observada a diminuição da viabilidade das células a partir da CI_{90} ($695 \mu\text{M}$ de CuCl_2 e $660 \mu\text{M}$ de CuSO_4) após 24 e 48 h de incubação no teste de MTT (reagente de 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium). Os dados apresentados são inéditos mundialmente para as soluções CuCl_2 e CuSO_4 e demonstram que ambas soluções foram significativamente mais eficazes contra endo- e ectoparasitos do que o controle, nos testes analíticos *in vitro*. O sinergismo observado nas combinações de NTX com CuCl_2 e CuSO_4 nos testes *in vitro* de L3 de NGL, apresentaram um potencial de desenvolvimento de novas formulações no controle de NGL e outros parasitos de ruminantes por potencialização da eficácia e/ou ampliação do(s) efeito(s) e mecanismo(s) de ação biológica.

[004] A necessidade de controlar parasitos para melhoria do bem-estar e da saúde animal e a redução dos prejuízos e perdas na criação, impõe o objetivo de aumentara o controle de doenças com a redução de custos. O uso de metais bioativos de Cu-II, como complemento e potencializador de atividade biológica, constitui uma ferramenta inédita mundial extremamente importante para o sinergismo de medicamentos convencionais no controle de endo e ectoparasitos.

[005] Neste cenário, apresentamos um biofármaco com formulação inovadora de controle de parasitos de forma eficiente e segura. Foi demonstrado com vários experimentos que nossa estratégia apresentou uma eficácia significativa e importante, com efeitos de potencialização mais eficientes. O uso das soluções e as combinações propostas apresentam menor custo para utilização no controle de parasitos e

outros patógenos na pecuária no Brasil e demais países com criação animal.

Problemas técnicos existentes

[006] Os bovinos e ovinos têm grande importância social e econômica e são acometidos frequentemente por NGI e carrapatos. Estas infecções podem interferir no bem-estar e conseqüentemente influenciar em perdas significativas relacionadas às parasitoses no valor de até US\$15 bilhões/anuais (CHARLIER, et al., 2015). O *Haemonchus* spp. está presente em todo o Brasil, infectando ruminantes, e é o nematoda de maior importância nas espécies domésticas. A alta frequência deste parasito, a grave patogenicidade e a rápida seleção de populações resistentes que desenvolvem frente aos anti-helmínticos, representa um dos mais sérios problemas de infecção parasitária mundialmente (MOLENTO, 2009; CRAIG, 2018).

[007] Ectoparasitos como *Dermatobia hominis*, *Oestrus ovis*, *Haematobia irritans*, *Cochliomya hominivorax*, *Stomoxys calcitrans*, ocupam lugar de destaque entre as parasitoses de ruminantes. O *R. microplus* é considerado o ectoparasito que mais traz prejuízos aos animais (GRAF et al., 2004; SARTOR & SANTARÉM, 2017). Este parasito é o vetor responsável pela transmissão de *Babesia bigemina*, *B. bovis* e *Anaplasma marginale* na América do Sul, tendo seu ciclo regulado pelo clima (temperatura, pluviosidade e umidade relativa) (LABRUNA, 2008). O controle da infestação pelo carrapato é feito com o uso de acaricidas convencionais, de uso tópico ou sistêmico. Entretanto a administração intensiva dos produtos resultou também em populações resistentes. Desta forma, surge a necessidade de abordagens alternativas, como o uso de carrapaticidas em combinação e novas bases terapêuticas para potencialização da atividade e aumento da

eficiência das formulações farmacêuticas veterinárias (RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2018).

[008] As endoparasitoses ocorrem de forma mista e dependem de diferentes fatores como temperatura, pastagem, espécie do hospedeiro, estado fisiológico e nutricional e manejo dos animais. O animal parasitado pode apresentar anemia hemorrágica aguda por causa dos hábitos dos parasitos de sugar sangue, graus variáveis de edema, apatia, letargia, fezes com sangue, e no caso de ovinos, a queda da qualidade da lã. Assim, se faz necessário utilizar estratégias de controle, que possam eliminar parasitos nos rebanhos, revertendo estas perdas e possíveis populações já resistentes (TAYLOR et al., 2010).

[009] A integração de diferentes ferramentas de controle, pode ser um pré-requisito para o gerenciamento sustentável destas infecções. O objetivo dessas ferramentas é alcançar um controle suficiente para reduzir o impacto negativo das infecções (HOSTE & TORRES-ACOSTA, 2011). Para evitar que novos compostos venham a ser desprezados em função da resistência aos antiparasitários, são necessárias medidas que prolonguem a vida útil desses medicamentos (MOLENTO et al., 2013). Devido a isto, novas técnicas têm sido desenvolvidas, com base em estratégias que visam reduzir o uso de anti-helmínticos, a seleção de parasitos resistentes e a liberação de compostos químicos no meio ambiente (MOLENTO, 2009).

[010] Neste quesito, surge a importância de estudar novas tecnologias e novos produtos que possam ter aplicabilidade e boa eficácia, isolado ou em combinação com produtos comerciais. Um exemplo disso são as soluções a base de Cu-II. Historicamente, há registros extraídos do Papiro de Edwin Smith, aproximadamente 2000 a.C., descreveram que o Cu-II já

era utilizado para esterilizar água e feridas. Em meados do ano 400 A.C., na época de Hipócrates, o Cu-II foi prescrito para tratar doenças pulmonares, durante o Império Romano. No século XVII, o Cu-II foi utilizado para tratamento de doenças mentais. Em 1761, o sulfato de Cu-II foi utilizado para inibir fungos transmitidos por sementes, sugerindo sua aplicação como antifúngico (BORKOW & GABBAY, 2009).

[011] Kumbhar et al. (1991), utilizaram complexos de Cu-II contra sete linhagens de fungos patogênicos, sendo eles: *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum* e *Microsporum canis*. Os autores observaram maior inibição de crescimento exibida pelo complexo com o bromo. Esta inibição foi explicada com base no seu par redox de Cu-II mais baixo e na maior ligação covalente, representando uma nova classe de antifúngicos à base deste metal. Rodrigues et al. (2017), demonstraram o efeito da síntese de complexos de Cu-II com L-glutamato e L-aspartato na atividade biológica contra larvas de *Aedes aegypti* e atividade bactericida em *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

[012] Tendo em vista a grande preocupação com o controle parasitário em ruminantes e buscando alternativas inovadoras e com componentes de alta tecnologia para combater parasitos resistentes, melhorar a saúde e o bem-estar dos animais, o objetivo dos experimentos realizados foi demonstrar a eficácia *in vitro* das soluções de cloreto e sulfato de Cu-II contra larvas infectantes de NGL de ovinos e bovinos, e contra o carrapato bovino *R. microplus*.

Objetivos da invenção/vantagens

[013] Os objetivos da solicitação são; demonstrar a atividade das soluções de íons Cu-II contra endo e ectoparasitos de ruminantes, e seu efeito sinérgico quando associadas em formulações de íons Cu-II com produtos parasiticidas ou produtos biologicamente ativos. Dados de sinergia foram demonstrados a partir de ensaios *in vitro* sobre fases infectantes de NGI de ovinos e bovinos e do carrapato *R. microplus* (DOLENGA, 2020). As análises de lesões no carrapato foram realizadas também por microscopia de lâminas com a histologia em fêmeas de *R. microplus*, tratadas com sais cúpricos (cloreto e sulfato) e medição do grau de lesão. A partir das lâminas foi feita correlação com as diferentes concentrações dessas soluções para definir o mecanismo de ação do bioproduto. Também foram realizados experimentos *in vitro* com microcápsulas de sais cúpricos e análises da toxicidade dos sais de cobre em diferentes concentrações por cultivo celular.

[014] Os animais ruminantes são mamíferos herbívoros que se caracterizam por (re)mastigar continuamente o alimento que retorna do estômago para absorção final e é continuamente triturado. Os animais apresentam o estômago dividido em quatro compartimentos. Exemplos de ruminantes são ovinos, bovinos e outros que apresentam uma variedade de endo e ectoparasitos que interferem no metabolismo desses animais com perdas contínuas. Os principais gêneros de endoparasitos encontrados em ruminantes são *Haemonchus* spp. e *Trichostrongylus* spp. O carrapato *R. microplus* é o ectoparasito mais relevante encontrado em bovinos. O controle dos parasitos é realizado com produtos antiparasitários convencionais, de forma excessiva, o que ocasiona em grande pressão seletiva, resultando em populações de parasitos resistentes. A resistência parasitária pode ser monitorada através de testes regulares nas propriedades (*in vivo*). Neste cenário, outras alternativas são indicadas; como utilizar o controle

biológico, rotação de pastagens e a combinação de fármacos ou produtos bioativos, que podem contribuir para controlar a população de parasitos. A opção da presente proposta é associar antiparasitários com metais bioativos, i.e íons cobre, Cu-II que possuem atividade biocida ou biostática, e que já foram descritos na literatura como seguros para controle de microrganismos, e no uso em superfícies de equipamentos e hospitalares (ex. corrimão e portas). O objetivo dessa solicitação implica em uma análise da literatura, para embasamento da proposta para registro de propriedade intelectual para patenteamento da associação de íons cúpricos com parasiticidas comerciais para controle de endo (nematodas gastrintestinais) e ectoparasitos (carrapato *R. microplus*) de ruminantes.

[015] A busca de anterioridade foi realizada e descrita a seguir para comparações e diferenciações apontadas em relação a solicitação de patente da pesquisa realizada com NTX e sais de Cu-II contra íons (cloreto e sulfato) na potencialização de efeito biológico para endo e ectoparasitos. Na busca de anterioridade de forma intensiva com diferentes combinações de palavras-chave, pode-se encontrar patentes com referência ao uso de sais cúpricos que foram utilizados em etapas de sínteses para produtos bioativos, como em moléculas sintéticas, formulações com diferentes usos e propósitos para diferentes aplicações como alimentação ou tratamento de animais como suplementos, tratamento de parasitas em diferentes meios aquáticos e terrestres, tratamento de água e/ou suas combinações possíveis. Entretanto, o uso combinado com endo e ectoparasiticidas e/ou potencialização de efeitos, não foram explicitamente encontradas patentes ou solicitação de patentes.

[016] A patente **BR 102014021855-6 A2**(Brasil) demonstra que o sulfato de cobre, misturado com outros minerais, adicionado ao sal e oferecido aos animais na alimentação, é um método de controle do endoparasita *H. contortus* e aumenta o desempenho zootécnico. Nossa abordagem para uso dos sais cúpricos, combinações ou complexações do metal é diferenciada, pois o uso das soluções será feito como medicamento antiparasitário em duas formulações iniciais para agir contra parasitos para fins de sinergismos e/ou potencialização e abrangência de efeitos biológicos.

[017] A patente **US 20180146647A1** (Estados Unidos) descreve o uso demedetomidina no controle de crustáceos parasitas em peixes, incluindo nanopartículas de cobre, sais de cobre e outros compostos e combinações para controle de parasitas. Estabelece ainda um método para melhorar o fluxo de água para dentro e para fora de uma gaiola ou rede para piscicultura, fornecendo um revestimento de superfície contendo medetomidina ou um sal em combinação para obtenção de quantidade eficaz para reduzir a incrustação biológica da referida gaiola ou rede. O revestimento produzido é capaz de liberar medetomidina ou o seu sal ou combinações na água da gaiola ou rede em uma quantidade eficaz para reduzir ou prevenir a infestação parasitária dos peixes na gaiola ou rede. Nosso registro não foi testado em peixes, porém as combinações propostas neste processo têm característica de ação antiparasitária em outros animais.

[018] A patente **WO2017124666A1** WIPO (PCT) mostra o uso de sulfato de cobre-cálcio como aditivo para alimentação animal. O sulfato de cobre-cálcio quando usado na criação de animais em baixas doses, pode atingir o efeito que altas doses de sulfato de cobre alcançam na promoção do crescimento animal e pode substituir preparações de

cobre de baixa dosagem, como o elemento básico de cobre nutritivo para animais usados na criação de aves, gado ou animais aquáticos. O sulfato de cobre-cálcio pode ser usado como um novo, eficiente e seguro aditivo para rações na indústria de processamento de rações e na indústria de criação de animais, pode reduzir a dosagem de íons de cobre em quase 50-70% para atingir o mesmo desempenho de produção, pode reduzir significativamente o uso de cobre na pecuária, e pode reduzir os custos de produção, reduzir os efeitos colaterais tóxicos de um alto nível de cobre e reduzir a poluição ambiental, e é um composto de cobre com vantagens únicas.

[019] A patente **CN1205862C** (China) descreve um produto químico para matar caracóis em aquicultura. A invenção refere-se a um medicamento para matar caramujos para a aquicultura, que compreende respectivamente os componentes: ácido clorídrico (ou ácido sulfúrico), nicotinanilida, sulfato de cobre e cloreto de amônia. A invenção tem o método de preparação em que o ácido clorídrico (ou ácido sulfúrico) nicotinanilida, o sulfato de cobre e o cloreto de amônia podem ser uniformemente misturados e agitados de acordo com a proporção após trituração e peneiramento para preparação de um medicamento composto. Este produto é eficaz para eliminar caracóis e tem como vantagens a fabricação simples, uso conveniente, preço baixo e morte rápida e completa de caramujos, e é seguro para peixes e camarões. O produto não tem efeito adverso para culturas, ervas daninhas aquáticas, algas, pessoas e animais e está de acordo com os requisitos de proteção ambiental ecológica.

[020] A patente **US5451598A** (Estados Unidos) mostra uma série de compostos heterocíclicos e uso de inseticidas. Os compostos possuem atividade inseticida com a fórmula (I): ## STR1 ## em que R1 é

hidrogênio, halogênio ou um grupo NR₄R₅ em que R₄ e R₅ são independentemente selecionados de hidrogênio ou alquil; R₂ é um grupo --S (O) nR₆ em que n é 0, 1 ou 2 e R₆ é um grupo haloalquilo; R₃ é --CN ou é um grupo CX - NY₁ Y₂ por exemplo --CS - NH₂; e R₇ e R₈, que podem ser iguais ou diferentes, são halogéneos. Nesta patente considera-se o uso de alguns sais de cobre nas sínteses e exemplos listados na patente. Mas, não relaciona atividade complementar e sinérgica desses sais cúpricos.

[021] A patente **7252843** (<https://patents.justia.com/patents-by-us-classification/424/698>) relata uma composição para limpeza de corpos d'água contidos por uso de uma composição e método para limpar, higienizar e manter corpos d'água contidos, como piscinas, fontes, lagos ornamentais. A composição inclui porcentagens pré-determinadas de sulfato de cobre (40-50%), sulfato de zinco (40-50%) e sulfato de alumínio (10-20%) por peso. A composição e o método reduzem a quantidade de cloro e a quantidade de trabalho associada à limpeza, higienização e manutenção de corpos d'água contidos.

[022] A patente **6420312** (<https://patents.justia.com/patents-by-us-classification/424/698>) relata uma composição para tratamento de água. A invenção relaciona uma solução algicida-floculante para uso no tratamento de água bruta em uma estação de tratamento de água municipal para controlar algas. A solução algicida-floculante incluiu 25-50% em peso de um floculante ácido, 0-10% em peso de um floculante auxiliar de polímero, um algicida essencialmente de cobre com uma concentração de 0,025-1,25% em peso na forma de um sal de cobre solúvel em água e água de equilíbrio. A mistura uniforme do floculante na água bruta simultaneamente mistura de forma homogênea o algicida da solução de algicida-floculante na água bruta. O floculante

ácido é de preferência sulfato de alumínio, sulfato de ferro, cloreto de ferro ou suas misturas. O sal de cobre solúvel em água é de preferência sulfato de cobre, cloreto de cobre, nitrato de cobre, acetato de cobre ou suas misturas. Além disso, o floculante auxiliar é uma amina quaternária de alto peso molecular, como cloreto de dialildimetilamônio.

[023] A patente **6248369**(<https://patents.justia.com/patent/6248369>) relata um processo de tratamento de água com uso de sal de cobre solúvel em água, preferencialmente sulfato cúprico pentahidratado misturado com água. Uma pequena quantidade de um floculante ácido é adicionada à solução de sulfato de cobre para acidificar a água e promover a dissolução do sulfato de cobre na água. Uma solução de 25-50% de água de um floculante ácido, com ou sem um auxiliar floculante polimérico catiônico, é preparada e bombeada para um vaso ou tanque de processamento. A solução de sulfato de cobre acidificado é adicionada ao tanque e misturada com o floculante ácido. A solução algicida-floculante é transportada para uma estação de tratamento de água municipal e adicionada à água bruta no clarificador para eliminar partículas na água que entra e controlar as algas no clarificador.

[024] A patente **US5698210A** (Estados Unidos) relata composições e processos de liberação controlada de diferentes produtos e polímeros, incluindo alguns sais cúpricos para o tratamento de organismos em uma coluna de água ou em terra. As composições de liberação controlada de matéria são mostradas e compreendem complexos para tratar uma população de um ou mais organismos aquáticos em uma coluna de água. Os complexos compreendem pelo menos um sistema com pelo menos um agente bioativo selecionado para tratar uma população de

organismos aquáticos, pelo menos um componente transportador e pelo menos um componente de revestimento para regular a taxa de liberação controlada e o perfil de liberação de o agente bioativo em água ou pelo menos um agente bioativo e um componente de função conjunta que pode servir como um carreador e revestimento para regular a taxa de liberação controlada e o perfil de liberação do agente bioativo em água, com ou sem componentes ligantes opcionais e/ou materiais de formulação adicionais. Os componentes são selecionados para afundar ou flutuar de modo que os complexos permeiem e/ou permaneçam em qualquer segmento planar ou volumétrico de uma coluna de água por um período de tempo que seja suficiente para tratar efetivamente uma população de organismos aquáticos. Descreve ainda métodos para tratamento de coluna de água com a entrega das composições a coluna de água ou a uma área de pré-inundação seca (pré-tratamento) que se desenvolverá em uma coluna de água ou em uma área de inundação. A composição e o processo também podem ser usados para tratar organismos terrestres.

[025] A patente **US 8785372 B2** (Estados Unidos) refere-se a compostos de 1-aril-5-alquil pirazol, de fórmula geral onde os radicais são produtos ou sais dos mesmos contra ectoparasitas como insetos, artrópodes e ácaros e algumas combinações contém diferentes produtos e alguns sais cúpricos. Esta patente não relaciona sinergismos ou potencialização de atividade biológica explícita pelas combinações.

Novidade

[026] Até o momento, não foram encontrados estudos utilizando soluções de Cu-II (cloreto e sulfato) contra nematodas gastrintestinais e carrapatos de ruminantes. Este é um estudo inédito mundialmente com CuCl_2 e CuSO_4 , e os resultados alcançados até o momento são muito

promissores para que estas soluções sejam desenvolvidas como formulações contra endo e ectoparasitos de ruminantes. Para nematodas, ambas as soluções (cloreto e sulfato) quando usadas isoladas, demonstraram um efeito anti-helmíntico significativo e ainda em combinação com o NTX, quando usado em baixas concentrações, apresentou efeito sinérgico. Para o TEO e o TDL, os resultados mostraram que ovos e larvas foram dependentes da concentração utilizada, isto é, a maior concentração gerou menor quantidade de L1 no TEO e menor quantidade de L3 no TDL. Isto nos mostra que as soluções de CuCl_2 e CuSO_4 têm ação sobre diferentes estágios de nematodas gastrintestinais de ruminantes. Os resultados apresentaram eficácia dependente da concentração na fase de ovo, impedindo a eclodibilidade de larvas L1, na fase de desenvolvimento larvar. A maior concentração não teve desenvolvimento de larvas L1 até L3. Na fase de L3, utilizando o TIML, ambas as soluções se mostraram eficazes, inibindo *in vitro* a migração larvar, de forma isolada ou em combinação com o NTX.

[027] Este resultado é muito importante e inovador, pois a combinação da Cl_{10} do antiparasitário NTX com a Cl_{50} de CuCl_2 teve eficácia de 88,94 e 91,30% em ovinos e bovinos, respectivamente, e a Cl_{10} do NTX combinada com a Cl_{50} de CuSO_4 teve eficácia de 77,02 e 79,47% para ovinos e bovinos, respectivamente. Essas combinações tiveram sinergismo por adição, uma vez que tanto o NTX, como as soluções de Cu-II, nas respectivas Cl_{50} tiveram eficácia menor. Isto pode significar uma menor concentração do NTX na formulação em combinação, o que irá causar menor gasto com o produto, irá causar menor seleção para resistência, visto que existe o composto novo de Cu-II, promovendo melhores condições ambientais para a fazenda.

[028] Nos carrapatos, através do TIA, foi observada eficácia de 88,88% na fase de inibição da ovipostura nas concentrações 480 mM para CuCl_2 e CuSO_4 . Na fase de eclodibilidade, as concentrações 30, 60, 120, 240, 480 e 1000 mM, apresentaram eficácia, porém não diferiram estatisticamente entre si para CuCl_2 e CuSO_4 ($P > 0,05$), sugerindo que ambas as soluções agiram na inibição da eclodibilidade de ovos. Para eficácia geral do produto, CuCl_2 apresentou eficácia acima de 80% em todas as concentrações, e CuSO_4 apenas nas concentrações mais altas (240, 480 e 1000 mM). A concentração de 1000 mM é considerada supersaturada, e foi utilizada com o propósito de estudar as lesões histológicas em carrapatos ingurgitados (com ovos). Através da histologia, observou-se lesões nos ovócitos tratados com as soluções de 240, 480 e 1000 mM. Estas lesões sugeriram a ocorrência de estresse oxidativo produzido pelas concentrações utilizadas, uma vez que o excesso de Cu-II pode gerar espécies reativas de oxigênio. O grau das lesões aumentou nos carrapatos conforme aumentou a concentração, tanto para a solução de CuCl_2 , como para CuSO_4 .

[029] As concentrações de ambas as soluções testadas neste estudo não apresentaram toxicidade para a viabilidade celular, pelo método MTT – o que era esperado como uma formulação atóxica.

[030] Os resultados podem contribuir de forma positiva para a qualidade de vida e bem-estar dos animais a campo, pois são promissores para o desenvolvimento de novas formulações de medicamentos antiparasitários em populações mundiais.

Breve Descrição

[031] Para NGI, foram testadas de forma isolada as soluções de cloreto e sulfato de Cu-II e em combinação com o parasiticida NTX, através do

TIML, TEO e TDL. Os resultados encontrados podem trazer muitos benefícios aos animais, pois recebendo uma menor dose do antiparasitário, combinado com uma solução de Cu-II, sugere-se um mecanismo mais amplo e diverso de eficácia, criando uma menor possibilidade para a seleção de parasitos resistentes, inclusive quando as soluções forem associadas ao NTX, prolongando o prazo de utilização da combinação. Os mecanismos de resistência que possam envolver as soluções de CuCl_2 e CuSO_4 nos nematodas gastrintestinais ainda não foram estudados. O produto de inovação aqui proposto prevê a ação farmacológica contra parasitos de animais, agindo contra parasitos internos e externos, descritos na farmacologia como ação endectocida. O produto tem característica ecológica pois terá menor contaminação ambiental, quando comparado ao uso de acaricidas tópicos e que ocasionam grande contaminação ambiental. O presente pedido de registro inclui a possível formulação de dois produtos, um com apresentação tópica e outro com apresentação via oral.

Descrição detalhada

a) Preparo das soluções de Cu-II

[032] Foram utilizados cloreto de Cu-II ICO PA – ACS (Dinâmica, São Paulo, Brasil), dihidratado, com peso molecular de 170,48 g/mol, e sulfato de Cu-II ICO PA – ACS (Synth, São Paulo, Brasil), pentahidratado, com peso molecular de 249,68 g/mol. Ambas as soluções foram diluídas em água destilada. O Cu-II possui peso molecular de 63,54 g/mol e este peso corresponde a 37 e 25% no CuCl_2 e CuSO_4 , respectivamente.

[033] Para os testes TIML, TEO, TDL com os NGLI, e o teste de toxicidade com MTT, as soluções foram preparadas na concentração inicial de 100 mM e posteriormente diluídas para o uso. Para o TIA com os carrapatos,

as soluções foram preparadas na concentração inicial de 1000 mM, e posteriormente diluídas para uso (Figuras 1 e 2).

b) Nematodas Gastrintestinais (NGI)

b.1) OPG e Coprocultura:

[034] As contagens de ovos de parasitos (OPG) das amostras de fezes dos bovinos e ovinos foram determinadas segundo a técnica de Gordon & Withlock (1939) modificada. A técnica de coprocultura foi realizada de acordo com Roberts & Sullivan (1950) para identificar o gênero dos parasitos presentes nas amostras de fezes. A recuperação das larvas de terceiro estágio (L3) foi realizada conforme a técnica descrita por Ueno & Gonçalves (1998). As larvas foram quantificadas e identificadas morfolologicamente em microscópio óptico Olympus, (Olympus System Microscopes, Tóquio, Japão), para determinar a proporção de gêneros, de acordo com a chave de van Wyk & Mayhew (2013).

b.2) Recuperação de ovos:

[035] Para a recuperação de ovos de nematodas, foi seguido o protocolo descrito por Molento et al. (2011). Os ovos recuperados foram imediatamente quantificados e utilizados no mesmo dia, para o teste de eclodibilidade de ovos (TEO) e teste de desenvolvimento larvar (TDL), seguindo protocolo interno adaptado de Chagas et al. (2011) e Dolenga (2020).

b.3) Teste de eclodibilidade de ovos (TEO):

[036] Após a quantificação dos ovos, esses foram distribuídos em placas de 24 poços (100 ovos/poço) em triplicata nas concentrações da Cl_{10} (0,95 μ M), Cl_{50} (25,7 μ M) e Cl_{90} (695 μ M) de $CuCl_2$, e Cl_{10} (1,5 μ M), Cl_{50} (29 μ M) e Cl_{90} (660 μ M) de $CuSO_4$. O controle positivo utilizado foi NTX (68

µg/µl) e o controle negativo foi composto por água destilada. As placas foram incubadas em estufa B.O.D. (Santana Tecnologia Científica, Londrina, Brasil) por um período de 48h a 27C° e a leitura foi feita em microscópio invertido (Optiphase, INV-403, Califórnia, EUA). Para calcular o percentual de eclodibilidade dos ovos, utilizando a seguinte fórmula: **Eclodibilidade (%) = L1 / (ovos + L1) x 100**, onde L1 corresponde as larvas de primeiro estágio. A eficácia neste teste foi obtida com base na quantidade de ovos presentes na amostra inicial, e o número de L1 eclodidas, após o tratamento com as concentrações de CuCl₂ e CuSO₄.

b.4) Teste de desenvolvimento larvar (TDL):

[037] Os ovos de nematodas foram recuperados e plaqueados da mesma maneira que para o TEO. Nos poços, foram adicionados 200 µl de água destilada, e as placas foram incubadas em estufa B.O.D. por um período de 48h a 27C°. Após este período, os ovos se desenvolveram até L1 e os tratamentos foram adicionados em triplicata nas concentrações da Cl₁₀ (0,95 µM), Cl₅₀ (25,7 µM) e Cl₉₀ (695 µM) de CuCl₂, e Cl₁₀ (1,5 µM), Cl₅₀ (29 µM) e Cl₉₀ (660 µM) de CuSO₄. O controle positivo utilizado foi NTX (68 µg/µl) e o controle negativo foi água destilada. Todos os poços receberam 80 µl de uma solução de meio nutritivo contendo *E. coli*, para o garantir a alimentação e o desenvolvimento das larvas. As placas foram incubadas em estufa B.O.D. por um período de 5 dias 27C° e a leitura das larvas L1 e L3 foi feita em microscópio invertido, para o cálculo do percentual de inibição do desenvolvimento larvar. A eficácia neste teste foi obtida com base na quantidade de L1 presente nos poços no início do teste, e o número de L3 após o tratamento.

b.5) Teste de inibição da migração larvar (TIML):

[038] Este teste foi realizado de acordo com o descrito por Molento & Prichard (2001), com adaptações de Demeler et al. (2010). Foram utilizadas L3, desembainhadas com 3% (v/v) de hipoclorito de sódio, durante 15-30 minutos, e posteriormente foram lavadas três vezes por centrifugação, quantificadas e distribuídas em placas de 24 poços (200 L3/poço), em quadriplicata, para cada concentração dos produtos (Figura 3). As L3 foram incubadas em estufa B.O.D. por 18h a 27°C (primeira incubação), contendo as concentrações de 2,0; 7,0; 30; 125, 500 e 2000 μM de CuCl_2 e CuSO_4 . Após 18h, todo o conteúdo de cada poço foi transferido para uma nova placa contendo um aparato previamente preparado em cada poço com malha de 25 μm . As novas placas foram incubadas nas mesmas condições da primeira incubação, com um foco de luz de 150 MHz para estimular a motilidade larvar, durante 24h. Decorrido este tempo, os aparatos foram retirados cuidadosamente dos poços, e a leitura do teste foi feita em microscópio invertido com aumento de 10x. A média da quantidade de larvas que migraram foi calculada de acordo com a fórmula: **Eficácia (%) = (Br - M / Br) x 100**, onde Br é o controle negativo e M representa a média de larvas que migraram após incubação.

b.6) Combinação das soluções de Cu-II com Nitroxinil (NTX):

[039] As concentrações inibitórias (CI) 10, 30, 50, 70 e 90 do CuCl_2 , CuSO_4 e NTX, foram calculadas com base na média das curvas de concentração. Após isto, as curvas foram combinadas entre si para o CuCl_2 com NTX e CuSO_4 com NTX para verificar o comportamento da eficácia entre essas combinações (Figura 4 – “1”: controle negativo (água destilada); “2”: CI₁₀, CI₃₀, CI₅₀, CI₇₀ e CI₉₀ de NTX; “3”: CI 10, 30, 50, 70 e 90 de CuCl_2 ; “4”: combinação das CI 10, 30, 50, 70 e 90 de NTX com a CI₅₀ de CuCl_2 ; 5 = combinação das CI₁₀, CI₃₀, CI₅₀, CI₇₀ e CI₉₀ de CuCl_2 com a CI₅₀ de NTX).

b.7) Análise estatística:

[040] Os resultados obtidos no TEO, TDL, TIML e combinação das soluções com antiparasitário comercial, foram comparados por meio do software R Core Team, versão 3.6.3 (2019). A homogeneidade das variâncias e a normalidade dos resíduos foram avaliadas pelo Teste de Barlett e método de Shapiro-Wilk, com 5% de significância, respectivamente. Foi avaliada a variação estatística entre as concentrações e eficácias dos produtos testados para o TEO, TDL e TIML, e para as duas espécies animais (ovinos e bovinos) para a interação solução-NTX. Após, realizou-se a análise de variância (ANOVA), seguido por Tukey para realização dos agrupamentos. Os agrupamentos por Tukey foram realizados com o auxílio do pacote “*agricolae*” (MENDIBURU, 2017). As curvas de concentração-resposta foram realizadas com auxílio do pacote “*drc*” (RITZ, et al., 2015).

c) Carrapato *R. microplus***c.1) Teste de imersão de adultos (TIA):**

[041] Grupos com 10 teleóginas foram submetidas ao banho de imersão. Os grupos controle negativo recebeu água destilada, controle positivo recebeu a combinação de cipermetrina 20% e clorpirifós 50% (Aspersin, BiogénesisBagó, Curitiba, Brasil), na diluição de 1:1250, indicada pelo fabricante, e os demais grupos receberam 30, 60, 120, 240, 480 e 1000 mM de CuCl_2 e CuSO_4 , durante 5 min sob agitação manual. Os grupos foram distribuídos em placas de Petri e mantidos por um período de 14 dias em estufa B.O.D., a 27°C e 70% de umidade relativa, para oviposição (Figuras 5 e 6). Decorrido esse tempo, os ovos foram removidos das placas e foi separado 0,3 g de ovos de cada grupo e transferidos para tubos de ensaio tipo Falcon. Os tubos foram mantidos em estufa B.O.D nas mesmas condições, durante 26 dias para

incubação e eclosão dos ovos (Figura 7). A leitura da eclodibilidade dos ovos (TEO) foi feita visualmente, adotando-se como parâmetro, intervalos de 5% para a relação do número de ovos eclodidos e não-eclodidos. Os ovos que não eclodiram foram comparados com as cascas e a visualização das larvas vivas, aderidas a parede do tubo. O índice reprodutivo (IR) e a eficácia do produto (EP), para cada tratamento foi determinado a partir das fórmulas (DRUMMOND *et al.*, 1973):

IR = peso total dos ovos (g) x % eclosão x 20.000 / peso das teleóginas (g)

EP = IR do grupo controle – IR do grupo tratado x 100 / IR do grupo controle

c.2) Histologia do ovário das fêmeas de *R. microplus*:

[042] A fim de avaliar possíveis alterações morfológicas nos ovários das fêmeas de *R. microplus* em decorrência dos tratamentos realizados, 10 fêmeas completamente ingurgitadas foram homoganeamente distribuídas por peso em cada um dos oito grupos experimentais: controle negativo (água destilada), controle positivo (combinação de cipermetrina 20% e clorpirifós 50%), e tratamentos nas concentrações de 240, 480 e 1000 mM de CuCl_2 e CuSO_4 . Os grupos foram tratados durante 5 min. Como descrito acima. Em seguida, os grupos foram secos em papel filtro, acondicionadas em placa de *Petri* e mantidas em estufa B.O.D (27°C e 70% de umidade relativa), durante 48h. O protocolo seguido para as etapas seguintes foi descrito por De Oliveira *et al.* (2015), com adaptações. Após 48h, quatro fêmeas de cada grupo foram colocadas individualmente em nova placa de *Petri* contendo solução fisiológica salina tamponada com fosfato (PBS) (NaCl 7.5 g/L, Na_2HPO_4 2.38 g/L e KH_2PO_4 2.72 g/L). Cada fêmea foi dissecada sob microscópio (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), com o auxílio de

pinças e micro-tesoura (Petrovitch, São Paulo, Brasil) para a remoção dos ovários. Cada órgão foi imediatamente transferido para um microtubo de 2 ml, devidamente identificado, contendo 500 µl de solução fixadora contendo álcool 100%, formalina comercial e ácido acético glacial (AFA – 85:10:5), onde permaneceram durante 2 h. Em seguida, os ovários foram lavados com PBS e mantidos em 500 µl de álcool etílico a 70% durante 18 h, para preservação. No dia seguinte, iniciou-se a etapa de desidratação em série crescente de álcool a 80, 90 e 95% (2x), durante 20 min. Na sequência, deu-se início o processo de inclusão em historesina plástica Technovit 7100 (glicol metacrilato) (KulzerGmbH, Hanau, Alemanha), de acordo com as recomendações do fabricante. Após a desidratação, o material foi mantido em 50 µl de solução intermediária contendo álcool etílico 95% e Base Líquida Technovit (v:v) (KulzerGmbH, Hanau, Alemanha), por 2 h para pré-infiltração. Em seguida, a solução foi substituída por 50 µl de solução de infiltração preparada com Base Líquida Technovit, acrescida do endurecedor I. O material preparado foi mantido durante 24 h em temperatura ambiente. Para a inclusão, os ovários foram retirados desta solução, posicionados individualmente em poços nos moldes plásticos (LeicaBiosystems, Nussloch, Alemanha), e cobertos com 500 µl de uma solução composta pela solução de infiltração, adicionada do endurecedor líquido II. Os moldes permaneceram em estufa a 32°C, para secagem durante 48 h. Após endurecimento, os blocos de historesina contendo os ovários, foram destacados do molde e colados em suportes de madeira, para serem seccionados em ultramicrótomo rotativo semiautomatizado Leica RM2245 (LeicaBiosystems, Buffalo Grove, Estados Unidos da América). Os cortes foram obtidos com a espessura de 3 µm, e foram fixados em lâminas de vidro previamente limpas. Depois de secas, as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) conforme rotina histológica e montadas com bálsamo do

Canadá em lamínula. Posteriormente, as lâminas foram observadas e fotografadas para documentação em fotomicroscópio Olympus CX43 (Olympus, Tóquio, Japão), acoplado em microcomputador Dell (Dell Inc, Austin, EUA). As interpretações foram de acordo com SAITO et al. (2005) e DE OLIVEIRA et al, (2005), adaptado (Figura 8 – “A”: controle negativo e “B”: controle positivo; Figura 9 – grupo tratado com CuCl_2 “C = 240 mM”, “D = 480 mM” e “E = 1000 mM”; e Figura 10 – grupo tratado com CuSO_4 “F = 240 mM”, “G = 480 mM” e “H = 1000 mM”; nu = nucléolo; vg = vesícula germinal, vi = vitelo, ch = córion, pe = pedicelo; po = parede do ovário).

c.3) Análise estatística:

[043] Os resultados obtidos no TIA foram analisados por meio do software R Core Team, versão 3.6.3 (2019). A homogeneidade das variâncias e a normalidade foram avaliados pelo Teste de Barlett e método de Shapiro-Wilk, com 5% de significância, respectivamente. Foi avaliada a variação estatística entre as doses e eficácias dos produtos testados. Após, realizou-se a análise de variância (ANOVA), seguido por Tukey para realização dos agrupamentos. Os agrupamentos por Tukey foram realizados com o auxílio do pacote “agricolae” (MENDIBURU, 2017). As curvas de concentração-resposta foram realizadas com auxílio do pacote “drc” (RITZ, et al., 2015).

d) Teste de Toxicidade

d.1) Cultivo de células MDBK:

[044] O cultivo celular foi feito em garrafas T25 com filtro (Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil) e incubadas em estufa de CO_2 , a 37°C , (EscoCelCulture, Eindhoven, Holanda) utilizando meio de cultivo Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, Grand Island, EUA), contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), 10% de caldo de triptose

fosfato (TPB, Gibco, Grand Island, EUA), 5 µg/ml de ciprofloxacina, 40 µg/ml de garamicina, e 2,5 µg/ml de anfotericina B. O repique foi feito a cada 2 dias, em uma taxa de 1:3, utilizando solução Tryple (Gibco, Grand Island, EUA), para promover a desadesão celular.

d.2) Ensaio de viabilidade pelo método MTT:

[045] O efeito das soluções CuCl_2 e CuSO_4 sobre a viabilidade celular foi avaliado utilizando o reagente brometo de 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA). Este ensaio é baseado na capacidade das células vivas em reduzir os anéis tetrazolium do MTT pelas desidrogenases mitocondriais, resultando na formação de cristais de coloração violeta (formazan), como descrito por Mosmann (1983). As células MDBK foram plaqueadas em placas de 96 poços, com densidade de $2,5 \times 10^3$ células por poço em meio completo: DMEM + 10% SFB + 10% TPB + antibióticos + antifúngico, por 24 h. No dia seguinte, o meio de cultivo foi retirado e as soluções de CuCl_2 e CuSO_4 foram diluídas em meio completo, adicionadas às células e incubadas por 24 e 48h. O meio completo foi usado como controle negativo. Após os períodos de incubação, o meio com os tratamentos foi retirado e uma solução de MTT 0,5 mg/ml foi adicionada em cada poço (100 µl). As placas foram mantidas em estufa a 37 °C por 4 h, e o MTT foi substituído por dimetilsulfóxido (DMSO), para solubilizar os cristais de formazan. Deste modo, quanto menor for a viabilidade celular, menor será a redução do MTT e menor o sinal espectrofotométrico. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplaca em comprimento de onda de 540 nm (Figura 11). A viabilidade celular para cada concentração testada foi calculada de acordo com a fórmula:

Viabilidade (%) = (Abs amostra / Abs controle) x 100, na qual "Abs amostra", indica o valor de absorbância obtido na concentração-teste

e “Abs controle”, significa a absorbância obtida nos poços que continham apenas o meio (controle negativo).

d.3) Análise estatística:

[046] As análises estatísticas foram realizadas através do *software GraphPadPrism*, versão 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). A diferença entre as doses, valor de MTT e tempo de reação das soluções de CuCl_2 e CuSO_4 e o coeficiente de correlação (R^2) foram determinados. Foi feita a análise de variância (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Bonferroni. O teste de Tukey foi feito para a realização dos agrupamentos.

Breve descrição das Figuras

Figura 1 – Fluxograma do preparo das soluções de Cu-II para os testes com nematodas gastrintestinais.

Figura 2 – Fluxograma do preparo das soluções de Cu-II para os testes com carrapatos *R. microplus*.

Figura 3 – Modelo de placa utilizada para o TIML, contendo os aparatos preparados com a malha de 25 μm .

Figura 4 – Placas do teste de inibição da migração larvar, com as combinações, contendo controle água destilada, concentrações inibitórias (CI) 10, 30, 50, 70 e 90 do Nitroxinil e da solução de CuCl_2 .

Figura 5 – Grupo de fêmeas adultas de *Rhipicephalus microplus* distribuídas em placa de *Petri* utilizadas no teste de imersão de adultos.

Figura 6 – Oviposição do grupo controle de fêmeas adultas de *Rhipicephalus microplus*, após período de 14 dias em estufa B.O.D.

Figura 7 – Massa de 0,3 g de ovos de *Rhipicephalus microplu* transferidos para tubos identificados e que permaneceram em estufa por 26-28 dias para eclodibilidade.

Figura 8 – Cortes histológicos de ovários de *Rhipicephalus microplu* após 48 h de tratamento. (a): água destilada, (b): combinação de cipermetrina 20% e clorpirifós 50%.

Figura 9 – Cortes histológicos de ovários de *Rhipicephalus microplu* após 48 h de tratamento com 240, 480 e 1000 mM de CuCl_2 .

Figura 10 – Cortes histológicos de ovários de *Rhipicephalus microplu* após 48 h de tratamento com 240, 480 e 1000 mM de CuSO_4 .

Figura 11 – Curva do MTT para cloreto (CuCl_2) e sulfato (CuSO_4), contendo as concentrações (μM) e o coeficiente de correlação (R^2), testadas em 24 e 48h.

Referências

ATHANASIADOU, S.; HOUDIJK, J.; KYRIAZAKIS, J. Exploiting synergisms and interactions in the nutritional approaches to parasite control in sheep production systems. **Small Ruminant Research**, v. 76, p. 2-11, 2008.

BORKOW, G.; GABBAY, J. Copper, an ancient remedy returning to fight microbial, fungal and viral infections. **Current Chemical Biology**, v. 3, p. 272-278, 2009.

BOWMAN, D. D. **Georgis – Parasitologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

CHAGAS, A. C. S.; MOLENTO, M. B. Protocolos fenotípicos para nematóides gastrintestinais. In: CHAGAS, A. C. S.; NICIURA, S. C. M.; MOLENTO, M. B. **Manual Prático: metodologias de diagnóstico da**

resistência e detecção de substâncias ativas em ruminantes. Cap. 3. Brasília/DF: EmbrapaInformaçãoTecnológica, 2011.

CHARLIER, J.; VELDE, F. V.; VAN DER VOORT, M.; VAN MEENSEL, J.; LAUWERS, L.; CAUBERGUE, V.; VERCRUYSSSE, J.; CLAEREBOU, E. One Health: placing helminth infections of livestock in an economic and social context. **Veterinary Parasitology**, v. 212, p. 62–67, 2015.

CRAIG, T. M. Gastrointestinal Nematodes, Diagnosis and Control. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 34, p. 185–199, 2018.

DE OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; DENARDIS, S. E.; NUNES, E. T.; CAMARGO-MATIAS, M. I. Morphological characterization of the ovary and oocytes vitellogenesis of the tick *Rhipicephalus sanguineus*(Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 110, p. 146-156, 2005.

DE OLIVEIRA, P. R.; REMÉDIO, R. N.; BECHARA, G. H.; ANHOLETO, L. A.; CAMARGO-MATIAS, M. I. Dinotefuran-induced morphophysiological changes in the ovaries and midgut of semi-engorged females *Rhipicephalus sanguineus*Latreille, 1806 (Acari: Ixodidae) ticks. **Parasitology Research**, v. 115, p. 829-849, 2015.

DEMELER, J.; KÜTLER, U.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Adaptation and evaluation of three different *in vitro* tests for the detection of resistance to anthelmintics in gastrointestinal nematodes of cattle. **VeterinaryParasitology**, v. 170, p. 61–70, 2010.

DOLENGA, C. J. R. Soluções a base de cobre (Cu-II) para o controle de endo e ectoparasitos de ruminantes. Tese (Doutorado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, p. 175, 2020.

DRUMMOND, R.O.; ERNEST, S. E.; TREVINO, J. L.; GLADNEY, W. J.; GRAHAM, O. H. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory tests for insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v.66: 130-133, 1973.

GORDON, H. M.; WHITLOCK, H. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of the Council for Scientific and Industrial Research**, v. 12, p. 50-52, 1939.

GRAF, J-F.; GOGOLEWSKI, R.; LEACH-BING, N.; MOLENTO, M. B.; BORDIN, E. L.; ARANTES, G. J. Tick control: an industry point of view. **Parasitology**, v. 129. p. S427-S442, 2004.

HOSTE, H.; TORRES-ACOSTA, J. F. J. Non chemical control of helminths in ruminants: adapting solutions for changing worms in a changing world. **Veterinary Parasitology**, v. 180, p. 144-154, 2011.

KUMBHAR, A. S.; PADHYE, S. B.; SARAF, A. P.; MAHAJAN, H. B.; CHOPADE, B. A.; WEST, D. X. Novel broad-spectrum metal-based antifungal agents. **BiologyMetals**, v. 4, p. 141-143, 1991.

LABRUNA, M. B. As gerações anuais. In: PEREIRA, M. C.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. P. J.; KLAFKE, G. M. **Rhipicephalus (Boophilus) microplus: biologia, controle e resistência**. Cap. 4. São Paulo: Medvet, 2008.

MENDIBURU, F. *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*. R package version 1.2-8., 2017. Disponível em <<https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>>, acessado em 10/05/2020.

MOLENTO, M. B.; PRICHARD, R. K. Effect of multidrug resistance modulators on the activity of ivermectin and moxidectin against selected strains of *Haemonchus contortus* infective larvae. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, p. 117-121, 2001.

MOLENTO, M. B. Parasite control in the age of drug resistance and changing agricultural practices. **Veterinary Parasitology**, v. 163, p. 229-234, 2009.

MOLENTO, M. B.; NICIURA, S. C. M.; Chagas, A. C. S. Protocolos básicos de laboratório para a realização de metodologias fenotípicas e genotípicas. In: Chagas, A. C. S.; Niciura, S. C. M.; Molento, M. B. **Manual Prático: metodologias de diagnóstico da resistência e detecção de substâncias ativas em ruminantes**. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, DF, 2011.

MOLENTO, M. B.; VERÍSSIMO, C. J.; AMARANTE, A. T.; VAN WYK, J. A.; CHAGAS, A. C. S.; ARAUJO, J. V.; BORGES, F. A. Alternativas para o controle de nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes. **Arquivo Instituto Biológico**, v. 8, n. 2, 2013.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

R CORE TEAM, versão 3.6.3. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2019. Disponível em <<https://www.R-project.org/>>, acessado em 10/05/2020.

RITZ, C.; BATY, F.; STREIBIG, J. C.; GERHARD, D. Dose-Response Analysis Using R. **Plos One**, v. 10, 2015.

ROBERTS, F. H. S.; O'SULLIVAN, P. J. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 1, p. 99-102, 1950.

RODRIGUES, T. A. D.; ARRUDA, E. J.; FERNANDES, M. F.; CARVALHO, C. T.; LIMA, A. R.; CABRINI, I. Copper II - polar amino acid complexes: toxicity to bacteria and larvae of *Aedes aegypti*. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 89, p. 2273-2280, 2017.

RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; JONSSON, N. N.; BHUSHAN, C. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. **Parasitology Research**, v. 117, p. 3-29, 2018.

SAITO, K. C.; BECHARA, G. H.; NUNES, E. T.; DE OLIVEIRA, P. R.; DENARDI, S. E.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphological, histological, and ultrastructural studies of the ovary of the cattle-tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 129, p. 299-311, 2005.

SARTOR, I. F.; SANTARÉM, V. A. Agentes empregados no controle de ectoparasitos. In: Spinosa, H. S.; Gorniak, S. L.; Bernardi, M. M.

Farmacologia Aplicada a Medicina Veterinária. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2017.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L. WALL, R. L. Ectoparasitas facultativos e vetores artrópodes. In: **Parasitologia Veterinária.** Cap 11. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. **Japan International Cooperation Agency,** 1998.

VAN WIK, J.A., MAYHEW, E. Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: A practical lab guide. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research,** v. 80, p. 1–14, 2013.

REIVINDICAÇÕES

1 – Uso dos produtos de sais de Cu-II e complexos de Cu-II (contraíons) **caracterizado pela** aplicação no controle da contaminação de endo e ectoparasitos como produto veterinário com alta atividade biológica de amplo espectro e com multifuncionalidades quando aplicados no controle sanitário de diferentes formas, combinações com NTX e outros produtos comerciais, ou proporções molares livres ou ainda contidos ou em suporte de matrizes ou substratos poliméricos ou não poliméricos;

2 – Uso de NTX e produtos similares com sais de Cu-II e/ou complexos de Cu-II (contraíons), de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** uso do complexo livre, nano ou microencapsulado de compostos cúpricos ou contido em dispositivos ou matrizes de liberação lenta; quer seja na forma líquida spray/pulverização, gel, sólida, iscas ou ainda dispersos em polímeros naturais e/ou sintéticos puros ou em diferentes proporções de mistura ou combinação para aplicação e controle de endo e ectoparasitos em ruminantes e outros animais;

3 – Uso da mistura NTX e produtos similares – sais de Cu-II e/ou complexos de Cu-II (contraíons), de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado pela** utilização dessas misturas e/ou complexos, e/ou combinações do íon metálico contidos em dispositivos e/ou impregnados para liberação na forma de pós secos, líquidos ou gel em dispositivos de base polimérica, cerâmicos ou argilosos ou ainda em massas de contenção para a fabricação de areias especiais para animais, materiais telhas, tijolos, vasos, recipientes, pisos, cápsulas, artefatos domésticos entre outros artefatos possíveis que sejam bioativos

para controle de endo e ectoparasitos em locais/fazendas de produção, doméstico ou industrial, incluindo dispositivos para controle de parasitos em jardins ou espaços com vegetais como citado em residências, espaços públicos, espaços produtivos ou indústrias;

4 – Uso da mistura NTX e produtos similares - sal de Cu-II e/ou de complexos de Cu-II (contraíons) ou misturas contendo o complexo metálico, de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, **caracterizado pela** utilização da mistura de parasiticidas - sal de Cu (II) e/ou complexo de Cu (II) (contraíons) contidos em dispositivos, substratos ou iscas ou qualquer outra forma de disponibilização aplicados na forma livre por dispersão para o controle de endo e ectoparasitos, principalmente, carrapatos que são susceptíveis às misturas e/ou combinações cúpricas ou ainda em formulações e/ou misturas em diferentes concentrações com outros parasiticidas, inseticidas convencionais ou não convencionais ou ainda outros ativos biológicos em residências, espaços produtivos ou não produtivos, e as aplicações podem ser realizadas a partir da aplicação de NTX e produtos similares - sal de Cu (II) e/ou espécies complexas NTX e produtos similares com Cu (II) livre ou combinadas na forma de formulações ou ainda misturas e/ou formulações parasiticidas, inseticidas, fungicidas, bactericidas, nematicidas ou ainda em quaisquer outras formulações para aplicação veterinária, no solo, areias formuladas comerciais para uso doméstico, agrícola ou agroindustrial, cobertura de vegetais ou iscas parasiticidas e/ou inseticidas para uso na supressão/controle de endo e ectoparasiticidas em usos veterinários, agrícolas e domésticos

DESENHOS

Figuras

Figura 1

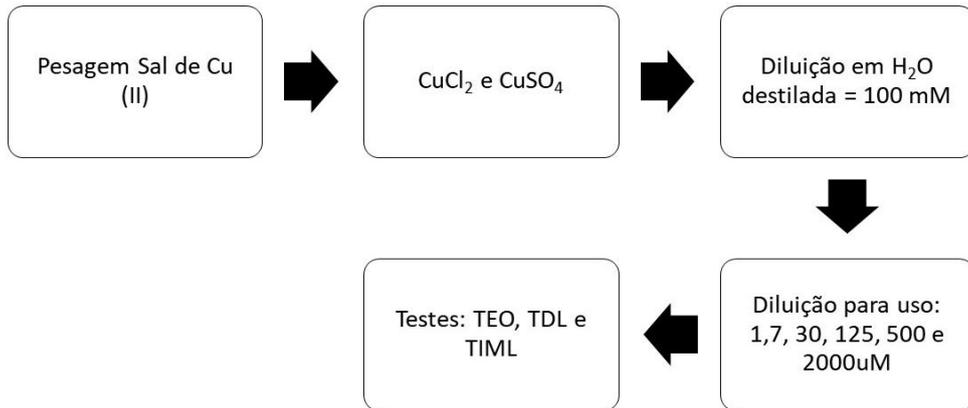


Figura 2

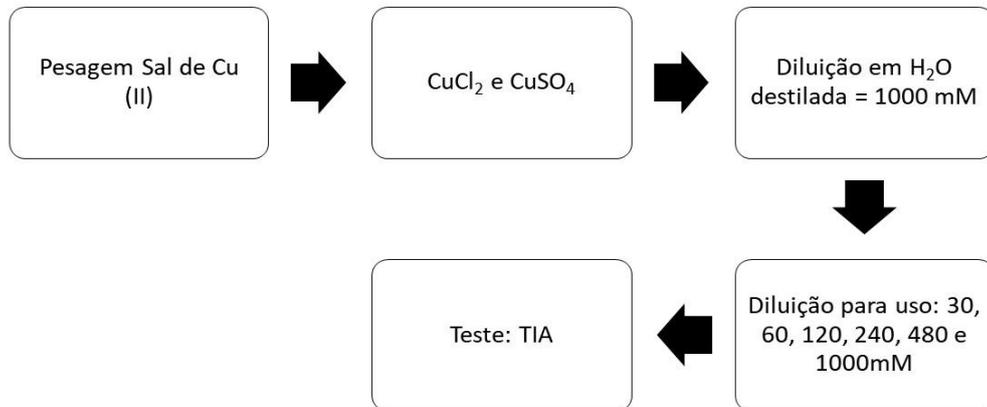


Figura 3

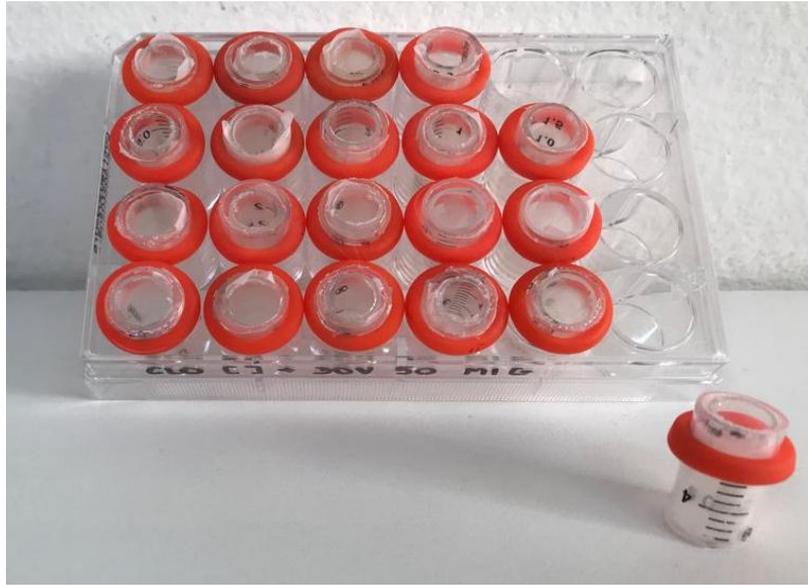


Figura 4

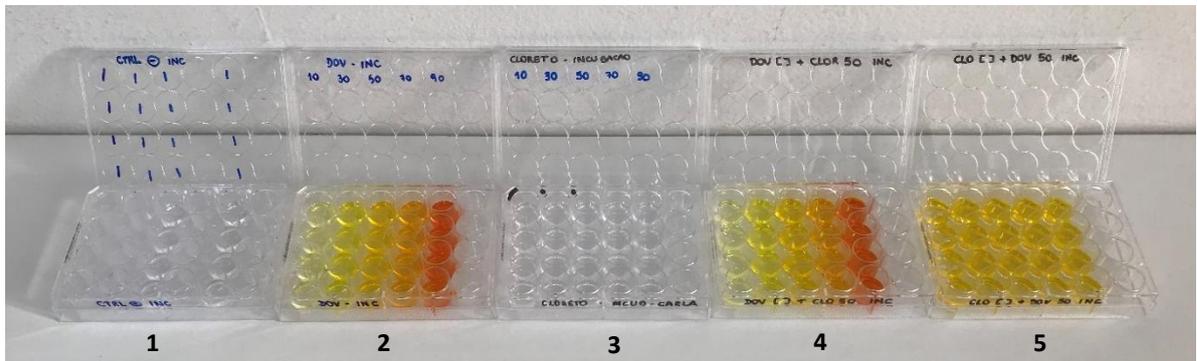


Figura 5



Figura 6



Figura 7



Figura 8

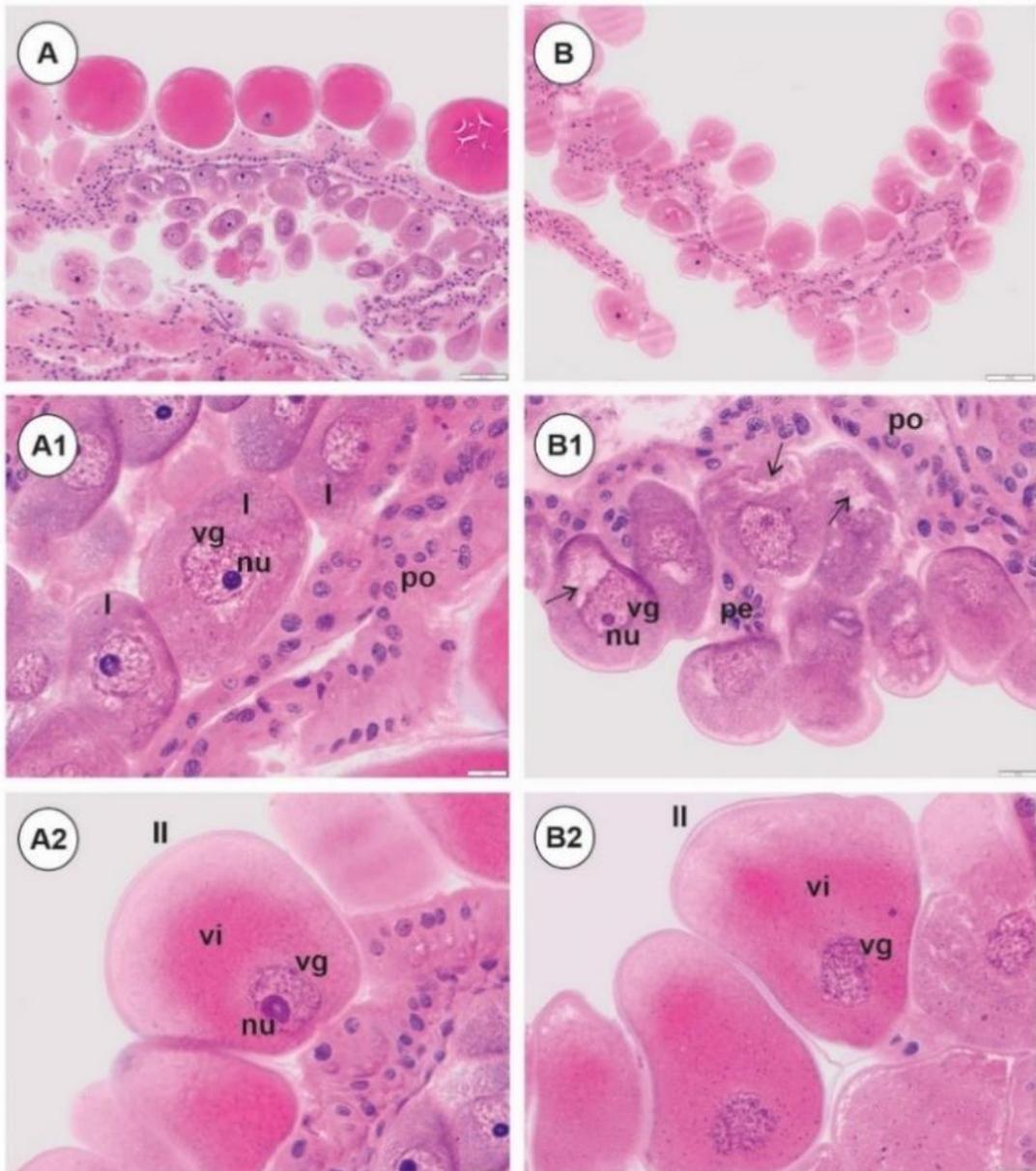


Figura 9

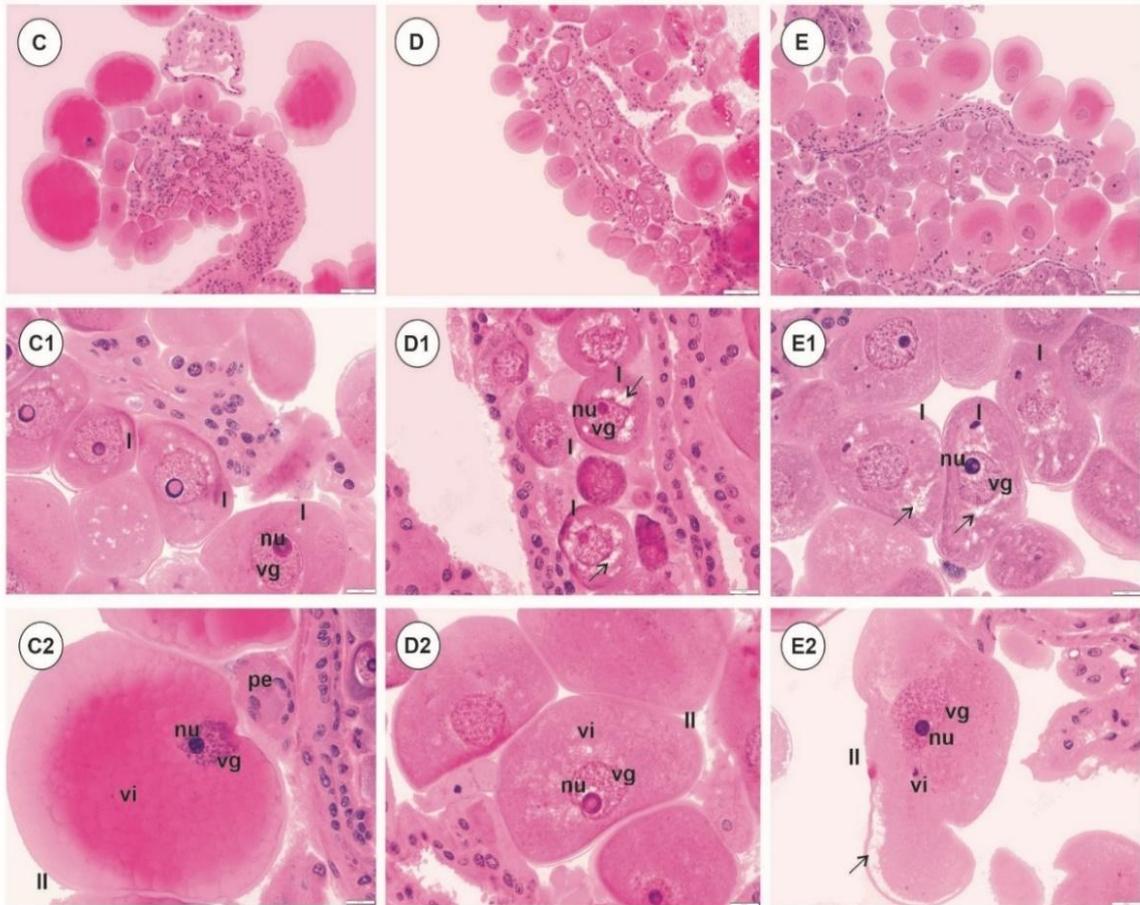


Figura 10

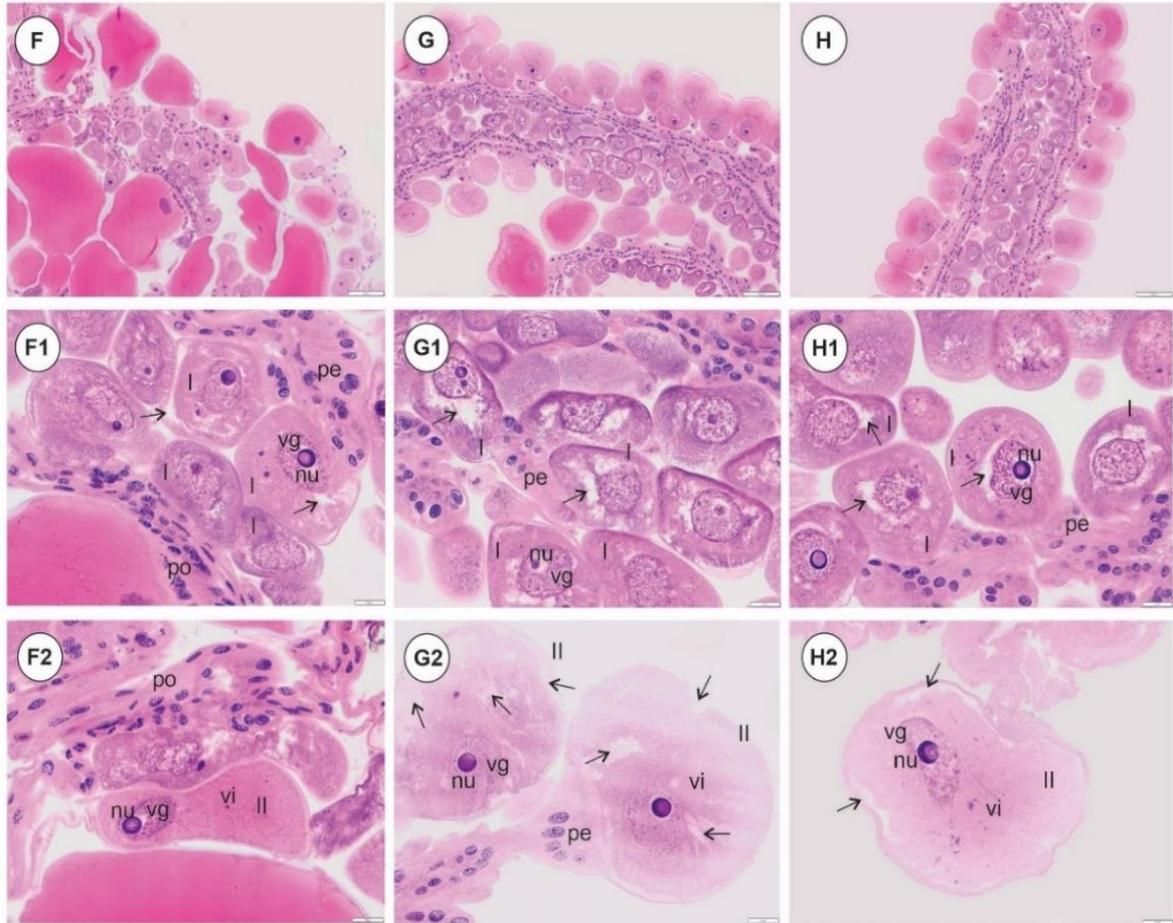
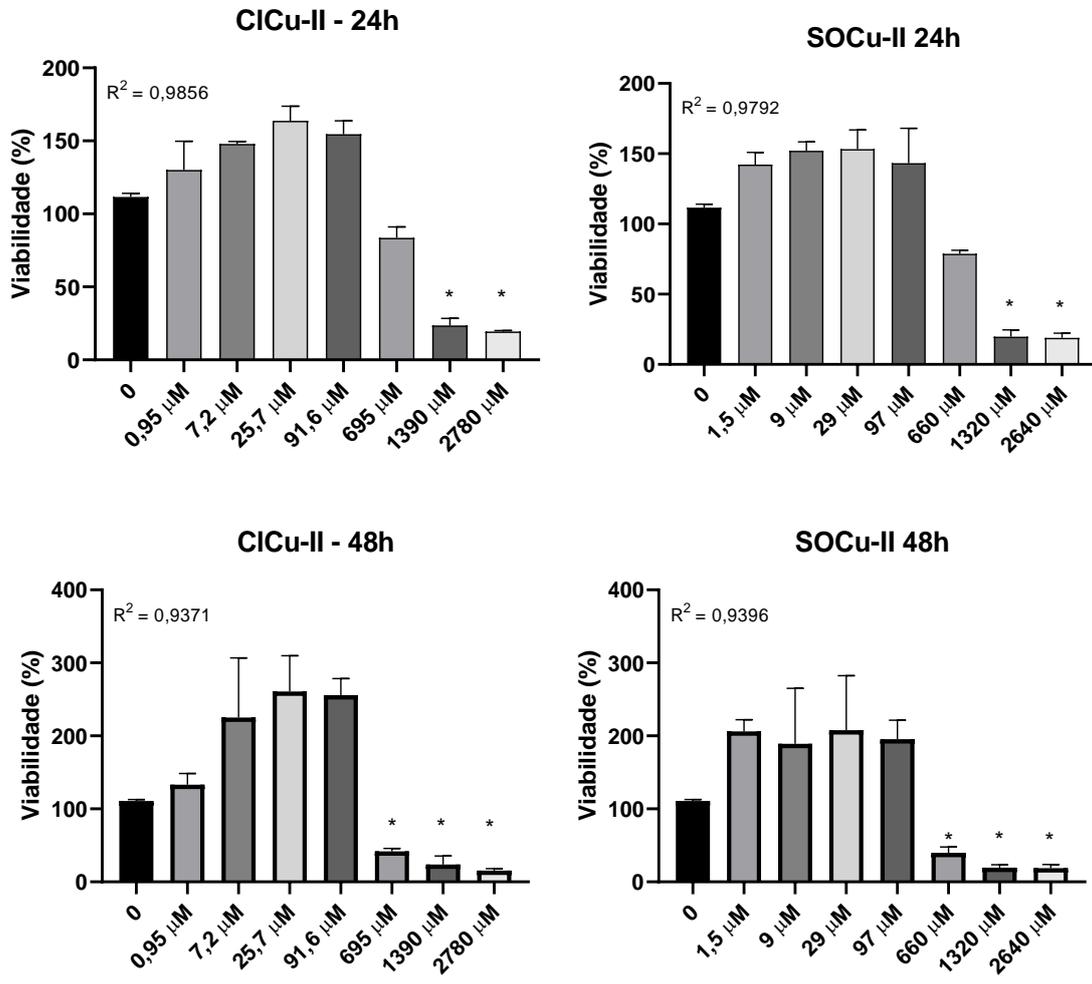


Figura 11



Tabelas

TABELA 1 - EFICÁCIA (%) DAS CONCENTRAÇÕES (μM) QUE FORMARAM A CURVA CONCENTRAÇÃO-DEPENDENTE DAS SOLUÇÕES DE CuCl_2 E CuSO_4 , CONTRA LARVAS DE NEMATODAS DE OVINOS E BOVINOS.

μM	Ovinos		Bovinos	
	CuCl_2	CuSO_4	CuCl_2	CuSO_4
	%	%	%	%
2	12,84	5,75	12,36	8,49
7	34,10	34,29	39,00	33,98
30	48,28	49,62	47,10	47,88
125	77,39	73,37	77,99	69,11
500	86,02	87,93	89,96	84,17
2000	95,21	97,32	95,75	93,44

TABELA 2 - CONCENTRAÇÕES CALCULADAS PARA O NITROXINIL ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) E PARA AS SOLUÇÕES DE CuCl_2 E CuSO_4 (μM), CORRESPONDENTES AS CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIAS (CI) 10, 30, 50, 70 e 90.

CI	NTX ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	CuCl_2 (μM)	CuSO_4 (μM)
10	0,05	0,95	1,5
30	0,48	7,2	9
50	2,17	25,7	29
70	8	91,6	97
90	75	695	660

TABELA 3 – DOSES CALCULADAS ($\mu\text{g/ml}$) PARA O NITROXINIL E PARA AS SOLUÇÕES DE CuCl_2 E CuSO_4 CORRESPONDENTES AS CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIAS (CI) 10, 30, 50, 70 e 90.

CI	NTX ($\mu\text{g/ml}$)	CuCl_2 ($\mu\text{g/ml}$)	CuSO_4 ($\mu\text{g/ml}$)
10	50a	0,16a	0,38a
30	480b	1,2b	2,2b
50	1970c	4,4c	7,2c
70	8000d	15,5d	24,2d
90	75500e	118,0e	150e

TABELA 4 - EFICÁCIA (%) DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA (CI) ENCONTRADA PARA O NITROXINIL E AS SOLUÇÕES DE CuCl_2 E CuSO_4 USANDO O TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR (TIML) CONTRA NEMATODAS DE OVINOS.

CI	NTX ($\mu\text{g/ml}$)		CuCl_2 ($\mu\text{g/ml}$)		CuSO_4 ($\mu\text{g/ml}$)	
	Dose	%	Dose	%	Dose	%
10	50	10,63	0,16	9,29	0,38	5,26
30	480	31,71	1,2	28,17	2,2	29,50
50	1970	49,75	4,4	51,62	7,2	48,47
70	8000	71,78	15,5	69,02	24,2	72,35
90	75500	92,44	118,0	89,97	150	88,21

TABELA 5 - EFICÁCIA (%) DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA (CI) ENCONTRADA PARA O NITROXINIL E AS SOLUÇÕES DE CuCl_2 E CuSO_4 USANDO O TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO LARVAR (TIML) CONTRA NEMATODAS DE BOVINOS.

CI	NTX ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		CuCl_2 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		CuSO_4 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
	Dose	%	Dose	%	Dose	%
10	50	10,32	0,16	11,11	0,38	9,47
30	480	31,43	1,2	25,28	2,2	28,94
50	1970	50,59	4,4	49,59	7,2	50,26
70	8000	70,49	15,5	73,42	24,2	71,57
90	75500	92,42	118,0	92,27	150	88,68

TABELA 6 – EFICÁCIA (%) DAS COMBINAÇÕES DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA (CI_{50}) DE NITROXINIL COM AS CI_{10} , CI_{30} , CI_{50} , CI_{70} E CI_{90} DE CuCl_2 E CuSO_4 , NA INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO DE L3 DE PARASITOS DE OVINOS E BOVINOS.

CI	Ovinos		Bovinos	
	CI_{50} de NTX			
	CuCl_2	CuSO_4	CuCl_2	CuSO_4
10	67,99	14,24	64,41	17,37
30	84,37	40,39	79,09	47,63
50	70,06	14,96	71,18	13,16
70	92,33	63,97	90,66	61,84
90	98,38	88,69	97,10	75,00

TABELA 7 – EFICÁCIA (%) DAS COMBINAÇÕES DAS CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIAS CI₅₀ DE CuCl₂ E CuSO₄ COM AS CI₁₀, CI₃₀, CI₅₀, CI₇₀ E CI₉₀ DE NITROXINIL, NA INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO DE L3 DE PARASITOS DE OVINOS E BOVINOS.

Ovinos			Bovinos	
Nitroxinil				
CI	CI ₅₀ de CuCl ₂	CI ₅₀ de CuSO ₄	CI ₅₀ de CuCl ₂	CI ₅₀ de CuSO ₄
10	88,94	77,02	91,30	79,47
30	79,94	69,54	77,62	65,53
50	80,97	20,35	78,58	16,84
70	87,02	86,71	86,31	80,00
90	98,53	92,46	97,75	90,26

TABELA 8 – EFICÁCIA (%) DO TESTE DE ECLODIBILIDADE DE OVOS DE PARASITOS DE OVINOS, NA PRESENÇA DAS CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIAS (CI) 10, 50 E 90 DAS SOLUÇÕES CuCl₂ E CuSO₄ E NITROXINIL (CONTROLE POSITIVO).

Grupos	CI	Concentração	Eficácia (%)	P
CN	-	-	10,91	d
NTX	-	68 µg/µl	100,00	a
CuCl ₂	10	0,95 µM	13,72	d
CuCl ₂	50	25,7 µM	37,68	c
CuCl ₂	90	695 µM	93,62	ab
CuSO ₄	10	1,5 µM	14,09	d
CuSO ₄	50	29 µM	42,14	c
CuSO ₄	90	660 µM	90,86	b

TABELA 9 – EFICÁCIA (%) DO TESTE DE DESENVOLVIMENTO LARVAR DE PARASITOS DE OVINOS, NA PRESENÇA DAS CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIAS (CI) 10, 50 E 90 DAS SOLUÇÕES DE CuCl₂ E CuSO₄E NITROXINIL (CONTROLE POSITIVO).

Grupos	CI	Concentração	Eficácia (%)	P
CN	-	-	3,33	d
NTX	-	68 µg/µl	94,68	bc
CuCl ₂	10	0,95 µM	91,22	c
CuCl ₂	50	25,7 µM	100,00	a
CuCl ₂	90	695 µM	99,79	a
CuSO ₄	10	1,5 µM	91,71	c
CuSO ₄	50	29 µM	100,00	a
CuSO ₄	90	660 µM	99,27	ab

TABELA 10 - EFICÁCIA DAS SOLUÇÕES DE CuCl₂ e CuSO₄CONTRA TELEÓGINAS DE *Rhipicephalus microplus* NAS FASES DE INIBIÇÃO DA OVIPOSTURA (%), ECLODIBILIDADE (ECLO%), ÍNDICE DE REPRODUTIBILIDADE (IR) E EFICÁCIA GERAL (EP%).

Produto	Inib.Ovip. (%)	ECLO%	IR	EP (%)
CN	20,00c	80,00b	6499,00 (± 656,30)	-
CP	100,00a	0,00a	0,00 (± 0,00)	100,00a
CuCl ₂ 30 mM	20,00c	10,00a	620,08 (± 590,62)	81,29a
CuCl ₂ 60 mM	16,66c	10,00a	601,40 (± 117,02)	82,46a
CuCl ₂ 120 mM	59,44abc	12,50a	275,06 (± 164,56)	89,77a
CuCl ₂ 240 mM	51,11bc	7,50a	525,08 (± 877,64)	87,53a
CuCl ₂ 480 mM	88,88ab	0,00a	0,00 (± 0,00)	100,00a
CuCl ₂ 1000 mM	100,00a	0,00a	0,00 (± 0,00)	100,00a
CuSO ₄ 30 mM	13,33a	5,00a	1458,05 (± 1597,43)	61,73a
CuSO ₄ 60 mM	0,00a	23,33a	1985,12 (± 1177,35)	43,37a
CuSO ₄ 120 mM	32,77a	25,00a	810,11 (± 1041,53)	62,47a
CuSO ₄ 240 mM	61,11a	5,00a	0,00 (± 0,00)	93,09a
CuSO ₄ 480 mM	88,88a	0,00a	0,00 (± 0,00)	100,00a
CuSO ₄ 1000 mM	9,52a	1,66a	0,00 (± 0,00)	98,51a

TABELA 11 – GRAU DE LESÕES VISUALIZADAS NAS LÂMINAS HISTÓLOGICAS DOS OVÁRIOS DE *Rhipicephalus microplus* APÓS TRATAMENTO COM 240, 480 E 1000 mM de CuCl_2 e CuSO_4 .

Ovócitos	Região	CuCl_2 240 mM	CuCl_2 480 mM	CuCl_2 1000 mM	CuSO_4 240 mM	CuSO_4 480 mM	CuSO_4 1000 mM
I	Morfologia	+	++	+++	+	++	+++
	Nucléolo	0	0	0	0	0	0
	Vac. citoplasmática	+	++	++	+	++	++
	Vesicula germinal	0	+	++	0	0	++
	Vitelo	-	-	-	-	-	-
	Córon	-	-	-	-	-	-
	Pedicelo	-	-	-	0	0	0
	Parede do ovário	-	-	-	0	-	-
II	Morfologia	+	++	+++	++	++	+++
	Nucléolo	0	0	0	0	0	+
	Vac. citoplasmática	+	-	-	+	-	-
	Vesicula germinal	0	+	++	0	+	++
	Vitelo	+	++	++	+	++	+++
	Córon	-	-	+++	-	++	+++
	Pedicelo	0	+	-	-	+	-
	Parede do ovário	-	+	-	0	+	+
III	Morfologia	+	++	+++	++	++	+++
	Nucléolo	-	0	-	-	-	-
	Vac. citoplasmática	-	++	-	-	-	-
	Vesicula germinal	0	0	0	+	++	+++
	Vitelo	0	0	0	0	+	++
	Córon	-	-	-	-	++	++
	Pedicelo	0	0	-	-	-	-
	Parede do ovário	-	-	-	-	-	-
IV	Morfologia	+	+	+++	++	++	+++
	Nucléolo	-	-	-	-	-	-
	Vac. citoplasmática	-	-	-	-	-	-
	Vesicula germinal	-	-	-	-	-	-
	Vitelo	0	0	0	0	+++	+++
	Córon	+	++	+++	+	++	+++
	Pedicelo	-	-	-	-	-	+++
	Parede do ovário	-	-	-	-	++	+++
V	Morfologia	+	+	+++	++	++	+++
	Nucléolo	-	-	-	-	-	-
	Vac. citoplasmática	-	-	-	-	-	-
	Vesicula germinal	-	-	-	-	-	-
	Vitelo	0	0	0	0	++	+++
	Córon	+	++	+++	+	++	+++
	Pedicelo	-	-	-	-	-	-
	Parede do ovário	-	-	-	-	-	+++

TABELA 12 – CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIAS (CI) (μM) DAS SOLUÇÕES DE CuCl_2 e CuSO_4 UTILIZADAS EM CÉLULAS MDBK, NO TESTE DE CITOTOXICIDADE.

CuCl_2		CuSO_4	
CI	μM	CI	μM
10	0,95	10	1,5
30	7,2	30	9
50	25,7	50	29
70	91,6	70	97
90	695	90	660
180	1390	180	1320
360	2780	360	2640

RESUMO**Cobre (Cu-II), para uso como parasiticida e ação sinérgica no controle de endo e ectoparasitos (endectocida) em animais domésticos**

A presente invenção consiste na utilização de misturas do parasiticida NTX e produtos similares biologicamente ativos - sal de Cu-II e/ou complexos cúpricos e/ou associação com sais de Cu-II, como cloreto e sulfato de Cu-II (contraíons), para aplicação nos espaços produtivos e não produtivos, para o controle/supressão de endo e ectoparasitos e/ou controle populacional destes. A mistura NTX e sais de Cu-II induz a potencialização e maior atividade biológica ao produto veterinário. Estas misturas foram avaliadas quanto à sua eficiência para o controle de nematodas gastrintestinais de ovinos e bovinose do carrapato *Rhipicephalus microplus*. Os resultados mostraram que a CI50 de ambas as soluções, em combinação com o CI10 de NTX apresentaram efeito sinérgico em L3 de ovinos e bovinos. Desse modo, a mistura NTX com sal de Cu-II (cloreto e sulfato) atendem ao propósito de novas formulações para o controle de endo e ectoparasitos, tendo ação sinérgica para aplicações com ações abrangentes/multifuncionais, com utilização veterinária e agregação de valor a produtos convencionais como NTX e similares comerciais para o controle/supressão de endo e ectoparasitos.