

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Impregnação de diferentes tipos de tecidos de vestuário com nanopartículas de permetrina para ação repelente de insetos de longa duração

Evelise Rodrigues Assumpção

Porto Alegre, 2012.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTIC

Impregnação de diferentes tipos de tecidos de vestuário com nanopartículas de permetrina para ação repelente de insetos de longa duração

Dissertação apresentada por **Evelise Rodrigues Assumpção** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres

Porto Alegre, 2012.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 28 de março de 2012, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Alexandre José Macedo
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Assumpção, Evelise Rodrigues
Impregnação de diferentes tipos de tecidos de vestuário com nanopartículas de permetrina para ação repelente de insetos de longa duração / Evelise Rodrigues Assumpção. -- 2012.
119 f.

Orientadora: Sílvia Staniçuaski Guterres.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. repelentes de insetos. 2. nanopartículas lipídicas. 3. tecidos. 4. lavagens. I. Guterres, Sílvia Staniçuaski, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios 405 e 103 do Departamento de Produção e Controle de Medicamentos da Faculdade de Farmácia na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com bolsa de estudo CNPq.

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial aos meus pais e minhas avós, por todas as oportunidades que me proporcionaram, pelo apoio, confiança, amor incondicional e por serem meu porto seguro.

À Professora Silvia Stanisçuaski Guterres, pela oportunidade de fazer parte do grupo de pesquisa, pela confiança em mim depositada, pela paciência, pela atenção dispensada durante todo o trabalho e pelo exemplo de conduta profissional.

À Professora. Adriana R. Pohlmann pelo exemplo de conduta profissional.e pelas contribuições realizadas ao longo desses anos de vida acadêmica.

Aos colegas e amigos do laboratório 405 e do grupo de pesquisa pela amizade, paciência e auxílios prestados. Em especial, meu agradecimento aos amigos Kelly Bueno Condotta, Ana Luiza Silva, Thatiana Terroso, Mariana Bianchin e Manoel Ortiz pelo apoio e amizade.

À minha querida amiga e companheira Denise Jornada pela amizade, apoio e principalmente pela paciência em todos os momentos dessa etapa da minha vida.

Aos amigos Paulo Roberto Rodrigues, Raquel Bobrowski, Andresa Borges, Melissa Vasconcelos e Mariana Marchiori pelo apoio, companheirismo, paciência e amizade.

À Empresa Meias Pé Brasil que proporcionou a tecelagem do fio de algodão.

Ao CNPq, órgão financiador da bolsa de estudos. À FAPERGS e CAPES pelo apoio financeiro recebido ao longo deste trabalho.

A todas as pessoas que de alguma forma fizeram parte dessa etapa da minha vida, com apoio ou palavras de incentivo, a todos muito obrigado do fundo do meu coração.

RESUMO

O desenvolvimento de formulações tópicas contendo repelentes e inseticidas residuais impregnados em tecidos tem sido um grande avanço na prevenção de picadas de insetos. A nanotecnologia pode ser usada para contornar as limitações da utilização de fármacos na forma livre na área têxtil, como irritação da pele e duração do efeito. As nanopartículas lipídicas (NP), representadas pelos carreadores lipídicos nanoestruturados, apresentam como uma vantagem a possibilidade de utilizar lipídeos líquidos com atividade repelente, potencializando o efeito desejado. O objetivo desse trabalho foi desenvolver NP contendo repelentes de insetos e avaliar a permanência deles em diferentes tecidos após várias lavagens. As NP foram preparadas, caracterizadas e posteriormente impregnadas nos tecidos através da imersão dos diferentes tecidos (algodão e poliéster) em um becker contendo a suspensão de NP, sob agitação. Após a impregnação, os tecidos foram submetidos à análise de microscopia eletrônica de varredura. Estudos de permeação cutânea *in vitro* foram realizados utilizando células de difusão de Franz. Os tecidos foram lavados por imersão em água com sabão (1 vez) e água (2 vezes), sob agitação. O conteúdo de repelente de insetos nos tecidos antes e após as lavagens foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (detecção por UV). As NP apresentaram tamanho de partícula nanométrico, distribuição monomodal e potencial zeta adequado. A concentração de repelente nos tecidos após a impregnação variou conforme o tipo de tecido e NP impregnadas. As fotomicrografias mostraram a presença das NP em ambos os tecidos. As NP não causaram a absorção através da pele para ambos tecidos avaliados. Com relação ao conteúdo de repelente após as lavagens, os tecidos contendo NP mostraram maior tempo de permanência do que o tecido impregnado com o fármaco livre. Assim, as NP contendo repelentes de insetos foram impregnadas com sucesso, permanecendo após várias lavagens nos diferentes tecidos, o que demonstra a potencialidade destes sistemas como uma nova estratégia para aplicação repelente.

Palavras-chave: Repelente de insetos, nanopartículas lipídicas, tecidos, lavagens.

ABSTRACT

Impregnation of different fabrics types of clothing with permethrin nanoparticles for action insect repellent long-term

The development of topical formulations containing repellents and residual insecticides impregnated in fabrics has been a great advance in prevention of insect bites. Nanotechnology can be used to circumvent the limitations of the use of drugs in free form in the textile field, as skin irritation and duration of action. Lipid nanoparticles, represented by nanostructured lipid carriers, present as an advantage the possibility of using liquid lipids with repellent activity, potentiating the desired effect. The aim of this study was to develop lipid nanoparticles containing insect repellent and to evaluate the permanence of them in different fabrics after several washes. Lipid nanoparticles were prepared, characterized and impregnated in fabrics by immersion of different pieces of fabrics (cotton and polyester) in a becker containing an aqueous dispersion of nanoparticles, under stirring. After the impregnation, the fabrics were submitted to a scanning electron microscopy analysis. *In vitro* permeation studies were carried out using the Franz diffusion cell system. The fabrics were washed by immersion in water with soap once and water twice under stirring. The content of insect repellent in fabrics before and after the washes was determined by high pressure liquid chromatography (UV detection). Nanoparticles showed nanometric particle size, monomodal distribution and appropriate zeta potential value. The concentration of repellent in fabrics after impregnation varied depending on type of fabric and nanoparticles impregnated. Photomicrographs showed no presence of the nanoparticles in both fabrics. Nanoparticles impregnated showed no absorption through the skin to both fabrics evaluated. Regarding the content of insect repellent after washes, the fabrics containing nanoparticles show better retention than the fabric with free drug. Insect repellent-loaded nanoparticles were successfully impregnated, remaining after several washes in different fabrics which show these systems are promising as new repellent strategies.

Keywords: Insect repellent, lipid nanoparticles, fabric, impregnated, washes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural dos principais princípios ativos do óleo essencial de Cymbopogon: a. citronelal; b. geraniol.	35
Figura 2. Fórmula estrutural da permetrina.	40
Figura 3. Cromatograma referente ao ponto de concentração 10 µg/mL da permetrina.	69
Figura 4. Representação gráfica das três curvas de calibração.	70
Figura 5. Distribuição do tamanho de partícula por difratometria de laser, da formulação de nanocarreadores contendo óleo de citronela (NPCa).	74
Figura 6. Distribuição do tamanho de partícula por difratometria de laser, da formulação de nanocarreadores lipídicos antes - NPCr (a) e após revestimento - NPCR (b) com polímero. Os resultados representam a média e o desvio padrão da medida de 3 lotes.	77
Figura 7. Perfil das determinações do potencial zeta para obtenção dos nanocarreadores revestidos (NPCR).	77
Figura 8. Diâmetro de partícula e PDI das formulações de nanocarreadores lipídicos (NPCa, NPCr e NPCR) após 0, 15 e 30 dias. Os resultados representam à média e o desvio padrão da medida de 3 lotes.	79
Figura 9. Distribuição do diâmetro de partícula por difratometria de laser, das formulações de nanocarreadores lipídicos NPCa (a), NPCr (b) e NPCR (c) após 0, 15 e 30 dias do preparo. Os resultados representam a média da medida de 3 lotes.	80
Figura 10. Quantidades de permetrina impregnada nos tecidos em diferentes tempos com NPCa e com solução hidroalcolica de permetrina (Perm).	82
Figura 11. Fotomicrografias dos tecidos sem as formulações: (a) algodão; (b) poliéster.	85
Figura 12. Fotomicrografias dos tecidos: (a) algodão e permetrina livre (A+Perm); (b) poliéster e permetrina livre (P+Perm).	85
Figura 13. Fotomicrografias dos tecidos: (a) algodão e NPCa; (b) poliéster e NPCa; (c) algodão e NPCR; (d) poliéster e NPCR.	86
Figura 14. Fotomicrografias: (a) fio de algodão; (b) fio de algodão e NPCa e (c) fio de algodão tecido.	87

Figura 15. Perfis de liberação de permetrina nos nanocarreadores e permetrina livre incorporados no algodão (a) e poliéster (b).....93

Figura 16. Perfil de liberação de permetrina no tecido contendo os nanocarreadores e no tecido confeccionada a partir do fio impregnado.94

Figura 17. Comparação da permanência de permetrina no tecido contendo os nanocarreadores e no tecido confeccionada a partir do fio impregnado. Os resultados representam a média \pm DP da porcentagem de permetrina. a) A+Perm; b) A+NPCa; c) AT+NPCa.95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das suspensões de nanopartículas lipídicas.	58
Tabela 2. Parâmetros cromatográficos utilizados na metodologia analítica para doseamento da permetrina em sistemas nanoparticulados.	59
Tabela 3. Soluções receptoras testadas.	65
Tabela 4. Diâmetro médio das partículas (D[4,3]) e distribuição granulométrica (span) das formulações dos nanocarreadores com diferentes óleos.	72
Tabela 5. Características físico-químicas das dispersões de nanocarreadores lipídicos contendo óleo de citronela. Os resultados representam a média e o desvio padrão da medida de 3 lotes.	73
Tabela 6. . Características físico-químicas das dispersões de nanocarreadores lipídicos antes (NPCr) e após (NPCR) o revestimento com polímero. Os resultados representam a média e o desvio padrão da medida de 3 lotes.	76
Tabela 7. Quantidade de permetrina impregnada nos tecidos (algodão e poliéster) empregando as suspensões de nanopartículas NPCa e NPCR e no algodão tecido empregando a suspensão de nanopartículas NPCa . Os resultados representam a média e o desvio padrão da medida de 4 amostras de tecido.	83
Tabela 8. Concentração total de permetrina nos tecidos após total solubilização no volume contido na célula de Franz.	89
Tabela 9. Estudo da solubilidade da permetrina.	90
Tabela 10. Concentração de permetrina após várias lavagens nos nanocarreadores e permetrina livre incorporadas no algodão e poliéster.	92

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivos específicos	25
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	27
3.1. Repelente de insetos.....	29
3.2. Repelentes tópicos.....	30
3.3. Impregnação de repelente de insetos em tecidos.....	36
3.3.1. Permetrina	39
3.4. Sistema de liberação de fármacos	42
3.4.1. Nanopartículas lipídicas.....	46
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
4.1. Matérias-primas.....	55
4.2. Aparelhos e equipamentos.....	55
4.3. Preparação das dispersões aquosas de nanopartículas lipídicas.....	56
4.3.1. Revestimento da dispersão aquosa de NPCr.....	57
4.4. Parâmetros de validação das análises por CLAE	59
4.4.1. Linearidade.....	59
4.4.2. Especificidade.....	60
4.4.3. Limite de detecção e quantificação.....	60
4.4.4. Precisão.....	61
4.5. Caracterização físico-química das formulações.....	61
4.5.1. Determinação do diâmetro de partícula.....	61
4.5.2. Potencial zeta	62
4.5.3. Teor de permetrina nas nanopartículas lipídicas	62
4.5.4. Estabilidade das suspensões de nanopartículas lipídicas	63
4.6. Impregnação das nanopartículas no tecido.....	63
4.7. Caracterização dos tecidos após impregnação.....	63
4.7.1. Determinação do teor de permetrina após impregnação.....	63
4.7.2. Análise morfológica	64
4.8. Estudo de permeação cutânea in vitro	64

4.8.1. Escolha da solução receptora	64
4.8.2. Ensaio da permeação cutânea <i>in vitro</i>	65
4.9. Lavagens dos tecidos.....	66
4.9.1. Análise estatística.....	66
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1. Desenvolvimento das suspensões de nanopartículas.....	69
5.2. Impregnação dos nanocarreadores lipídicos nos tecidos.....	81
5.3. Estudo de permeação cutânea <i>in vitro</i>	87
5.4. Avaliação da permanência da permetrina nos tecidos após lavagens	91
6. CONCLUSÕES	97
7. REFERÊNCIAS	101

1. INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por insetos acometem milhões de pessoas em todo o mundo, causando milhares de mortes. Mosquitos são vetores de doenças para cerca de 700 milhões de habitantes ao ano, especialmente em países tropicais e subtropicais (WHO, 2011a). Além de serem vetores de doenças infecciosas, insetos podem ser causa de desconforto por suas picadas. Há séculos, a humanidade busca maneiras de prevenir as picadas de insetos por meio de práticas naturais e/ou artificiais, na tentativa de evitar algumas doenças e também suas incômodas picadas (COMMITTEE, 2005; SORGE et al., 2007). Considerando que uma única picada de um inseto contaminado pode provocar doenças e que vacinas e quimioprofilaxia não estão ainda disponíveis para todos os casos, passa a ter importância o uso de repelentes (FARDIN, 2002). Desta forma, um grande avanço na proteção pessoal de alto risco (por exemplo, os trabalhadores ao ar livre, os viajantes e os soldados) tem sido o desenvolvimento de formulações repelentes tópicas e inseticidas residuais que podem ser impregnadas em roupas, tendas e redes (WHO, 2001a, b).

As formulações tópicas são divididas em dois tipos de repelentes de insetos, os sintéticos e os naturais (CATMAT, 2005). Os repelentes sintéticos apresentam alguns efeitos adversos, tais como irritação dérmica, urticária, dermatite de contato, entre outros que têm ocasionado à procura por outras alternativas. Por isso, repelentes naturais como óleos essenciais têm sido empregados para repelir insetos (DE PAULA et al., 2003; TRABOULSI et al., 2005). Uma infinidade de plantas tem sido testada como fontes potenciais para o desenvolvimento de repelentes. Dentre os vários óleos essenciais relatados na literatura, o óleo de citronela é o que mais se destaca, sendo a substância mais presente em formulações repelentes de insetos (BROWN e HERBERT, 1997). O óleo de citronela é extraído da planta *Cymbopogon nardus* e tem demonstrado boa eficácia contra os insetos, sendo utilizado sozinho ou em associação com outros repelentes (naturais ou sintéticos) (FRADIN, 1998).

Apesar dos repelentes aplicados sobre a pele apresentarem eficácia, eles possuem algumas desvantagens como a necessidade de extensas e frequentes aplicações e irritação da pele (SCHRECK et al., 1984). Devido a isso, tem ganhado

destaque a impregnação de inseticida em tecidos. Por exemplo, mosquiteiros com aplicação de inseticidas são indicados na proteção noturna de adultos e crianças e na proteção diurna de lactentes jovens (WHO, 2010b). Tendões tratadas com inseticidas são altamente eficazes, seguras, duradouras e de acesso relativamente fácil (COMMITTEE, 2005). Além disso, repelentes aplicados em roupas, conferem proteção prolongada e diminuição do uso tópico dessas substâncias.

Alguns estudos têm utilizado a permetrina para impregnação em tecidos, devido a sua atividade repelente e inseticida altamente eficazes (ASILLIAN et al., 2002; ROMI et al., 2005; FAULDE, 2006a e b; APPEL et al., 2008; ROSSBACH et al., 2010). A permetrina é um piretróide sintético derivado de piretrinas naturais (derivados da flor do *Chrysanthemum cinerariifolium*) por modificação estrutural (FRADIN, 1998). A permetrina age através do contato direto com o inseto, sendo altamente neurotóxico para esses insetos (ROSSBACH et al., 2010).

A utilização da permetrina apresenta diversas vantagens, como por exemplo, um elevado nível de potência contra uma ampla variedade de insetos vetores e carrapatos (BROWN e HERBERT et al., 1997; FAULDE, 2003), múltiplos efeitos repelentes e toxicológicos sobre artrópodes (FAULDE, 2003; MUSTAPHA et al., 2008; ROSSBACH et al., 2010), rápida reatividade (FAULDE, 2003), excelente fotoestabilidade (FAULDE, 2003), resistência ao intemperismo (FAULDE, 2003; MUSTAPHA et al., 2008) e baixa toxicidade a mamíferos (BROWN e HERBERT et al., 1997; FAULDE, 2003; APPEL et al., 2008). Porém, a aplicação da permetrina em roupas é mais efetiva do que na pele, porque ela é pobremente absorvida pela pele (BROWN e HERBERT et al., 1997; FRADIN, 1998). Devido a isso, a permetrina tem sido utilizada como repelente na impregnação de roupas e tecidos devido a sua repelência e atividade residual (FRADIN, 1998; BROWN e HERBERT et al., 1997; FAULDE, 2006 a e b; APPEL et al., 2008; ROSSBACH, et al., 2010). As roupas ou tecidos apresentam ampla aplicação, como por exemplo, em uniformes de combatentes das forças armadas, mosquiteiros e turistas para uso em áreas endêmicas, refugiados e populações ameaçadas de doenças causadas por insetos vetores (FAULDE, 2006 a e b; MIOT et al., 2008).

A impregnação da permetrina em roupas pode ser realizada por diversos métodos, principalmente através pulverização individual e imersão em soluções de permetrina (APPEL et al., 2008; ROSSBACH et al., 2010). Porém, esses métodos de impregnação que utilizam as soluções de permetrina implicam em problemas como distribuição desigual do ativo, perda considerável da atividade após as lavagens e exposição do usuário pela solução de tratamento (ROSSBACH et al., 2010).

A aplicação da nanotecnologia na indústria têxtil ainda é muito recente. Ela tem sido utilizada para proporcionar novas características aos tecidos, como por exemplo, antibactericida, hidratante e desodorizante (SIS, 2012). Mais recentemente, uma nova característica promissora que tem sido proposta é a impregnação de repelentes de insetos proporcionando ao tecido ação repelente. A partir da utilização da nanotecnologia na impregnação de tecidos é possível contornar as limitações existentes na utilização de fármacos na forma livre, como curta duração de ação.

As nanopartículas lipídicas sólidas foram desenvolvidas no começo dos anos 90, e são derivadas de emulsões O/A por simples substituição do óleo por um lipídeo sólido, o qual permanece nesse estado sob a temperatura corporal (MÜLLER et al., 2007). Estes sistemas, com diâmetro médio na faixa de 50 a 1000 nm, representam uma alternativa aos lipossomas e às nanopartículas poliméricas, pois contornam desvantagens como uso de solvente orgânico e baixa estabilidade (WISSING et al., 2004). Recentemente, a segunda geração de nanopartículas lipídicas foi proposta, sendo pelos carreadores lipídicos nanoestruturados, os quais foram desenvolvidos a partir da mistura de um lipídeo sólido com um lipídeo líquido, a qual também se apresenta sólida à temperatura ambiente (MÜLLER et al., 2007). A vantagem desta segunda geração é a maior capacidade de carga de ativos em comparação às nanopartículas lipídicas clássicas devido a maiores imperfeições existentes na partícula e, ainda, a firme inclusão do ativo dentro da matriz da partícula durante períodos de estocagem (STECOVÁ et al., 2007).

Diversos materiais lipídicos podem ser empregados na preparação de nanopartículas lipídicas. Entre os materiais lipídicos mais promissores estão derivados de frutas e as plantas oleaginosas extraídas da Floresta Amazônica, pois fazem parte da flora brasileira (ROSSO e MERCADANTE, 2007, COLOMÉ et al., 2010). Além disso, outros lipídeos líquidos que podem ser incorporados ao material lipídico das nanopartículas potencializando a ação desejada, são os que possuem características de repelentes de insetos. Os lipídeos líquidos que possuem essas características são inúmeros, como por exemplo, óleo de gerânio (FRADIN, 1998; BURFIELD, 2005; KARTZ et al., 2008; STEFANI et al., 2009), cinamomo (BROWN e HERBERT, 1997; FRADIN, 1998), óleo de citronela (BROWN e HERBERT, 1997; FRADIN, 1998; SAKULKU et al., 2009; STEFANI et al., 2009), soja (FRADIN, 2002; KARTZ et al., 2008; STEFANI et al., 2009), neem (SHARMA et al., 1993; CHIO et al., 2008), entre outros. Em um estudo desenvolvido anteriormente no nosso grupo de pesquisa, foi proposta pela primeira vez a utilização de lipídeo não refinado natural, biodegradável e biocompatível – manteiga de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) para preparação de nanopartículas lipídicas. Os resultados demonstraram que a manteiga de cupuaçu é um componente alternativo e promissor para formulações lipídicas (COLOMÉ et al., 2010).

Considerando o exposto, o presente trabalho de dissertação está centrado no desenvolvimento inédito de nanopartículas lipídicas contendo permetrina para impregnação em tecidos, visando aliar as vantagens das nanopartículas lipídicas na incorporação de um repelente de insetos (permetrina). O racional da proposta é obter nanopartículas que proporcionem uma distribuição homogênea e maior permanência do ativo no tecido após várias lavagens. Além da utilização da permetrina, o presente trabalho, visa também estudar a co-encapsulação de óleo que também possua ação repelente incorporado nas nanopartículas lipídicas, como parte de seu material estruturante.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Desenvolver nanopartículas lipídicas contendo permetrina e um óleo com ação repelente e estudar sua impregnação em diferentes tecidos, avaliando o tempo de liberação e permanência do ativo nos tecidos após várias lavagens.

2.1. Objetivos específicos

- Preparar nanopartículas lipídicas contendo óleo repelente de insetos e permetrina através do método de homogeneização a alta pressão;
- Revestir as nanopartículas lipídicas com polímero catiônico, visando estudar o aumento da capacidade de impregnação aos tecidos;
- Caracterizar as formulações determinando o diâmetro das partículas, polidispersão, potencial zeta e teor de permetrina;
- Impregnar as nanopartículas lipídicas revestidas ou não em tecidos com diferentes caracteres de hidrofobicidade e hidrofiliabilidade e analisar sua morfologia nesses tecidos;
- Impregnar as nanopartículas em fios de algodão que serão utilizados para tecer tecidos e analisar sua morfologia após a tecelagem;
- Verificar a permeação cutânea *in vitro* da permetrina contida nas formulações impregnadas nos tecidos;
- Avaliar a cinética de liberação e tempo de permanência da permetrina após a impregnação das nanopartículas contendo o repelente de inseto nos tecidos e no fio de algodão tecido.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Repelente de insetos

As doenças transmitidas por insetos acometem milhões de pessoas em todo o mundo, causando milhares de mortes. Insetos são vetores de doenças para cerca de 700 milhões de habitantes ao ano, especialmente em países tropicais e subtropicais (FRADIN et al., 2002; WHO, 2011b). Segundo a Organização Mundial da Saúde, somente a dengue acomete 50 milhões de pessoas no mundo anualmente, só a título de exemplo, nas Américas 890 mil casos foram reportados em 2007 (WHO, 2011a). Em relação à malária, 216 milhões de casos foram relatados no mundo em 2010 (WHO, 2011a).

Além de serem vetores de doenças infecciosas, insetos podem ser causa de desconforto por suas picadas. Essas picadas podem causar efeitos locais, tais como, irritação local, prurido, pápulas, vesículas, estrófilos, infecção secundária local, dor, desconforto, entre outros (STEFANI et al., 2009).

Sabe-se também que alguns fatores proporcionam uma notável predisposição individual a picadas de insetos como as substâncias exaladas pela pele (principalmente pele suada), a presença de eczema (aumenta 4 vezes a atração dos insetos), idade adulta, sexo masculino, vestimentas escuras, calor, umidade e odor (CO₂, ácido láctico, suor e perfumes) exalados pela pele (BROWN e HEBERT, 1997; STEFANI et al., 2009). Há ainda fatores climáticos bem descritos, ou seja, em climas quentes e úmidos, há um aumento na notificação de doenças transmitidas por insetos, bem como alergias e picadas (BROWN e HEBERT, 1997).

Devido a isso medidas para reduzir o impacto e tentar minimizar a predisposição para essas picadas são importantes no esforço mundial de saúde pública para proteger os pacientes e prevenir a propagação das doenças.

O uso de repelentes contra picada de mosquitos é uma das estratégias utilizadas na prevenção e redução da incidência de doenças transmitidas por mosquitos (THAVARA et al., 2001). Em muitas circunstâncias o uso de repelentes representa o

único artifício capaz de evitar a transmissão da doença, visto que uma única picada por mosquito infectado é capaz de contaminar o indivíduo (FRADIN, 2002).

Dentre os vários repelentes existentes, pesquisas têm buscado o repelente ideal, que deve apresentar determinadas características como: possuir tempo prolongado de ação, ser eficaz frente a diversas espécies de artrópodes, volatilidade suficiente para manter a concentração no ar próximo à pele, não permitindo que a substância volátil dissipe em pouco tempo, não causar irritação a pele, mucosas ou apresentar toxicidade sistêmica, possuir odor agradável e/ou ser inodoro e não causar danos à roupa (BROWN e HEBERT, 1997). Infelizmente, até o momento nenhum repelente que atende todos esses requisitos.

As medidas mais comumente empregadas de proteção pessoal utilizando repelente de insetos são o uso de repelente tópico, na forma de loção ou creme, e a aplicação destes em vestimentas, cortinas e mosquiteiros, que possuem elevado poder residual, com a intenção de impedir que os insetos se aproximem ou pousem para realizar repasto sanguíneo (FRANCES, 1987; SCHECK, 1991; FRADIN, 1998).

3.2. Repelentes tópicos

Os repelentes de aplicação tópica são substâncias empregadas para afastar ou modificar o comportamento do inseto, impedindo-os de picarem. Eles atuam formando sobre a pele uma camada de vapor com odor repulsivo aos insetos (BROWN e HERBERT, 1997).

Em muitas circunstâncias, a aplicação de repelente na pele pode ser a única alternativa para evitar a picada dos insetos. Levando em conta que uma única picada infectada pode resultar em transmissão de doença, é necessário escolher um repelente que seja eficaz e, preferencialmente, possua efeito duradouro (FRADIN, 2002). Para o repelente tópico ser considerado eficaz, vários parâmetros devem ser considerados como frequência e uniformidade de aplicação, grau de volatilidade do ativo, absorção

pela pele, lavagem pelo suor, quantidade e espécie de inseto tentando picar e atração inerente do usuário (OLIVEIRA, 2008).

Existem citações na literatura relatando quais características ideais o repelente tópico especificamente deve possuir, são elas: ser eficiente contra diversas espécies, proporcionar um tempo de proteção prolongado, não ser tóxico, irritante ao homem, nem ser plastificante (não aderir à pele dando um aspecto oclusivo), possuir odor pouco perceptível e ser resistente à abrasão e a água (BROWN e HEBERT, 1997; FRADIN, 1998). Segundo Smith (1966) não existe um repelente ideal, pois nenhum candidato a repelente é totalmente inodoro e, geralmente, os repelentes possuem relativa substantividade, sendo dificilmente removidos da pele devido a sua natureza física oleosa ou plastificante.

Diversos repelentes de insetos são usados popularmente e esses podem ser divididos em duas categorias: os óleos (voláteis e fixos) derivados de plantas e as substâncias químicas sintéticas. Dentre os derivados de plantas, podemos citar: óleo de citronela, óleo de andiroba, piretróides, dentre outros (MUSTAPHA et al., 2008). Os repelentes de origem sintética mais comuns são: indalona, dimetilftalato (DMP), hexanodiol, IR3535, RUTGERS 612, DEPA (dietil- fenilacetamida), picaridina e DEET (MUSTAPHA et al., 2008).

Dentre os repelentes sintéticos, o mais utilizado é o N,N-dietil-3-metilbenzamida (DEET). Esta substância é geralmente considerada o “padrão-ouro” dos repelentes, pois apresenta uma eficácia comprovada, fornecendo uma proteção duradoura por até 8 horas após a aplicação (FRADIN, 1998). Dogan e colaboradores (1999) mostraram que o DEET não atua exatamente como um repelente, mas como um inibidor da atração causada pelo ácido láctico presente na pele. É usado em formulações comerciais em concentrações que variam de 7 a 50% do ativo (THAVARA et al., 2001). Embora esteja presente no mercado há muitos anos, o DEET pode causar efeitos tóxicos. Thavara e colaboradores (2001) relataram casos de encefalites relacionadas ao uso do DEET, principalmente em crianças. Por sua vez, Wright e colaboradores (1992)

sugerem que o DEET possua algumas desvantagens em relação à toxicidade reprodutiva e desenvolvimento em animais. Reações adversas ocasionadas pelo uso tópico do DEET também são relatadas, como irritação dérmica, urticária e dermatite de contato, relacionadas às altas doses utilizadas na pele. Devido ao seu caráter lipofílico, é facilmente absorvido pela pele (FRADIN, 1998 e 2002). Além disso, possui o inconveniente de derreter plásticos causando deterioração de óculos, pulseiras, relógios e causar danos às roupas sintéticas, devendo-se evitar o contato do produto com esses materiais (FRADIN, 1998; TRONGTOKIT et al., 2005). Outros inconvenientes são os relatos dos consumidores em relação ao odor e a sensação desagradável que o DEET proporciona na pele (TRONGTOKIT et al., 2005).

Além do DEET, outros repelentes sintéticos apresentam reações alérgicas após aplicação na pele como a picaridina e o DEPA (MUSTAPHA et al., 2008). Por sua vez, o DMP causa irritação aos olhos e mucosas, além de ser facilmente absorvido (MUSTAPHA et al., 2008).

Devido aos efeitos adversos apresentados na utilização de repelentes sintéticos, têm-se buscado outras alternativas como, por exemplo, o uso de repelentes naturais obtidos através de extratos de plantas, que assim como os sintéticos apresentam boa atividade repelente.

Uma infinidade de plantas tem sido testada como fontes potenciais para o desenvolvimento de repelentes. A grande maioria dos estudos avalia plantas aromáticas e seus óleos essenciais. A triagem de produtos repelentes de origem botânica tem sido realizada a partir de extratos da planta inteira ou partes específicas destas, como folha, frutos, flores, raiz e casca (SUKUMAR et al., 1991). As plantas por conterem substâncias que repelem insetos, como por exemplo, eucaliptol, citral, mentol e citronelal, têm sido vistas como fontes promissoras de repelentes proporcionando a prevenção de doenças transmitidas por insetos (YANG et al., 2005; MAIA e PARENTE, 2008).

Os óleos essenciais das plantas são misturas complexas de constituintes voláteis produzidos como metabólitos secundários em plantas que conferem aromas e sabores característicos (FAO, 1995). Apresentam viscosidade em geral pouco acentuada, lipossolubilidade e em temperatura ambiente são altamente voláteis, característica que os diferencia dos óleos fixos. Geralmente esses óleos são instáveis na presença de luz, calor, umidade, ar e metais (SIMÕES et al., 1999).

A composição química dos óleos essenciais varia muito, incluindo hidrocarbonetos (terpenos e sesquiterpenos) e compostos oxigenados (álcool, cetona, ésteres, éteres, aldeídos, lactonas, fenóis e éteres de fenóis) (FAO, 1995). É comum encontrarmos óleos voláteis contendo mais de 200 constituintes, sendo um predominante e os demais aparecendo como elementos-traços. Esses componentes, mesmo apresentando apenas traços, têm importância fundamental nos aromas. Dos constituintes predominantes nos óleos essenciais se destacam os terpenos que são hidrocarbonetos responsáveis pela atividade repelente apresentada pelos óleos (IBRAHIM et al., 2001). Uma desvantagem que esses óleos apresentam com relação a sua utilização é a falta de eficácia por longos períodos de tempo devido à presença de componentes relativamente voláteis, necessitando de reaplicações frequentes.

Há muitos relatos na literatura de diversos óleos essenciais utilizados devido a sua atividade repelente, tais como, alfazema, eucalipto, gerânio, cravo, citronela, manjeriço, andiroba, dentre outros.

Em um estudo realizado por Trongtokit e colaboradores (2005) avaliando a atividade repelente de 38 óleos essenciais em diferentes concentrações (10%, 50% e não diluído) demonstrou que o óleo de cravo não diluído dentre todos os testados, foi o que apresentou a maior duração de repelência (100%) por 2-4 horas para as três espécies de insetos testadas (*Culex quinquefasciatus*, *Anopheles dirus* e *Aedes aegypti*). Além disso, esse trabalho confirmou que com o aumento da concentração do óleo há um aumento do tempo atividade repelente em relação às três espécies testadas.

No estudo onde 41 óleos essenciais foram avaliados quanto a sua atividade repelente para diferentes espécies de insetos, os óleos de citronela, gerânio, eucalipto, limão e manjeriço apresentaram uma atividade repelente de 100% em 4 horas de exposição e o óleo de lavanda em torno de 86% no mesmo período para espécie *Culex quinquefasciatus*. Para espécie *Anopheles stephensi* o óleo de lavanda foi o único que apresentou a maior atividade repelente (80%) em 4 horas de exposição. Já para a espécie *Aedes aegypti*, os óleos que apresentaram maior atividade repelente foram os de citronela, gerânio e manjeriço em torno de 80% em 2 horas de exposição (AMER e MEHLHORN, 2006).

Tawatsin e colaboradores (2001) realizaram um estudo que visou avaliar a repelência de óleos voláteis em 3 diferentes espécies de mosquito (*Aedes. aegypti* – vetor da dengue hemorrágica, *Anopheles dirus* - vetor da malária, *Culex quinquefasciatus* Say - vetor da filariose). Nesse estudo foi demonstrado um efeito prolongado de proteção dos óleos de citronela, açafreão e manjeriço juntamente com a adição de 5% de vanilina como fixador, em que cada um teve o potencial de repelir as 3 espécies de insetos por até 8 horas.

Dentre os vários óleos essenciais relatados na literatura o óleo de citronela é o que mais se destaca. Descoberto em 1901, por muitos anos utilizado em preparações caseiras, hoje é uma das substâncias mais presentes em formulações repelentes de insetos.

3.2.1. Óleo de citronela

A citronela é uma planta do gênero *Cymbopogon* que compreende muitas espécies aromáticas (*Cymbopogon nardus* e *Cymbopogon winterianus*) típicas de regiões tropicais e temperadas. Existem duas espécies de citronela conforme a região de procedência. Seus óleos essenciais são parecidos em aroma e possuem as mesmas indicações, sendo a diferença entre eles o teor de citronelal do óleo. O óleo essencial

com atividade repelente é retirado das folhas da planta, tendo como componentes principais citronelal (32 a 45%) e geraniol (11 a 15%) (**Figura 1**) (RAHULA et al., 1973).

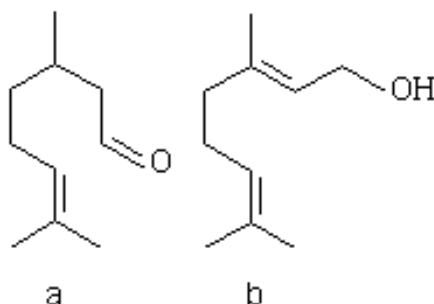


Figura 1. Fórmula estrutural dos principais princípios ativos do óleo essencial de *Cymbopogon*: a. citronelal; b. geraniol.

O óleo de citronela apresenta boa eficácia contra os insetos, em concentrações que variam de 0,05% a 15% (m/v) (FRADIN, 1998). Com eficiência similar ao DEET, evapora, no entanto, muito rapidamente perdendo a atividade. A rápida evaporação se deve a forte volatilidade do citronelal, responsável por grande parte do odor. O citronelal é também responsável pela sensibilidade cutânea ocasionada quando usada uma alta concentração de óleo de citronela sobre a pele (BARNARD e XUE, 2004).

Pesquisas conduzidas com óleo de citronela têm demonstrado ação inseticida e de repelência contra diversas espécies de mosquitos, porém o tempo de proteção desse óleo, em laboratório, varia de acordo com a espécie de inseto estudada. Em um estudo realizado por Phasomkusolsil e colaboradores. (2010) o óleo de citronela apresentou para 3 espécies de insetos diferentes estudadas (*Aedes aegypti*, *Anopheles minimus* e *Culex quinquefasciatus*), tempos de proteção e percentuais de picadas em torno de 2 horas e 0,85%, respectivamente. Em um estudo realizado com outra espécie de mosquito (*Aedes albopictus*) dos vários óleos avaliados, o óleo de citronela apresentou uma repelência expressiva em diferentes concentrações (5 e 10%) com um índice médio de proteção de 98% (BUENO e ANDRADE, 2010).

Uma investigação utilizando a espécie *Culex pipiens pallens* foi conduzida visando determinar o percentual de repelência do extrato de citronela no campo e *in vitro*, usando uma pulseira impregnada com o extrato na concentração de 30%. Os resultados demonstraram que extrato de citronela quando testado *in vitro* apresentou um percentual de repelência de 73%, já quando usado no campo o percentual foi de 80% (KIM et al., 2005). Yang colaboradores (2005) demonstraram ainda que a atividade repelente do óleo de citronela pelo inseto da espécie *Aedes albopictus* aumentou significativamente quando foi adicionada vaselina a 5% de na formulação, que atuou como fixador.

3.3. Impregnação de repelente de insetos em tecidos

A indústria têxtil está cada vez mais interessada em desenvolver tecidos caracterizados por diferentes propriedades, um exemplo, é a utilização de repelentes de insetos em roupas proporcionando proteção contra picadas e transmissão de doenças causadas por algumas espécies de insetos. O desenvolvimento de repelentes de insetos impregnados em roupas, tendas ou redes tem sido um grande avanço na proteção de pessoas em risco de serem picadas, como por exemplo, trabalhadores ao ar livre, viajantes, soldados e pessoas em áreas endêmicas (WHO, 2001 a,b).

Repelentes de insetos permanecem eficazes por mais tempo quando aplicados na roupa do que na pele, além de serem mais seguros (FRADIN, 1998). Todos os repelentes adequados para uso na pele (DEET, piretróide, icaridina) podem ser usados nas roupas também, mas alguns apresentam uma melhor eficácia quando aplicados nas roupas do que na pele (FAULDE, 2006b). Essa maior eficácia apresentada pelos tecidos impregnados com repelentes de insetos se deve à maior resistência a lavagens e a atividade residual aumentada, proporcionando uma elevada eficiência na proteção contra insetos (WHO, 2005).

Os tecidos não tratados são considerados barreiras eficientes impedindo a ação de insetos, porém esses só funcionam quando as malhas estão intactas. Já com os tecidos tratados isso não ocorre, pois continuam a proteger mesmo depois que as malhas estão em mal estado.

Um dos fatores mais importantes na impregnação de substâncias é o tipo de tecido utilizado. O material de mosquiteiros de malha aberta, por exemplo, é muito diferente do material de roupas e tendas, isso reflete diretamente na quantidade de repelente absorvido (MUSTAPHA et al., 2008). A propriedade do fio que constitui tecido, por exemplo, caráter hidrofílico (algodão) ou hidrofóbico (poliéster) afeta diretamente também na absorção do repelente (ALCÂNTARA, 1996). A impregnação de repelentes em roupas pode ser realizada, utilizando vários métodos, incluindo a pulverização individual, imersão em soluções contendo o repelente e a recente técnica de polimerização (revestimento do tecido com polímero) (MUSTAPHA et al., 2008). A pulverização apresenta como desvantagem problemas como a desigual distribuição do ativo, considerável perda após as lavagens e a exposição maior do usuário para a solução de tratamento (FAULDE et al., 2003). Por outro lado, as técnicas de imersão e polimerização apresentam como vantagem uma distribuição mais homogênea do ativo e o aumento da permanência do repelente no tecido, respectivamente (FAULDE, 2006b).

O uso de mosquiteiros impregnados com repelente já tem sua eficácia comprovada na diminuição da morbidade e mortalidade por malária em várias partes do mundo (COLLINS e PASKEWITZ, 1995; LENGELER e SMITH, 1997). Algumas regiões da África utilizam esse processo a alguns anos, reduzindo consideravelmente os casos de malária principalmente em crianças (COLLINS e PASKEWITZ, 1995). Alguns países da América Latina, como a Guatemala fazem uso de mosquiteiros impregnados com repelentes para evitar epidemias de algumas doenças (RICHARDS et al., 1994). No Brasil, estudo utilizando mosquiteiros impregnados com repelentes de insetos, demonstrou uma redução nos casos de malária justamente no período de elevação da endemia (SANTOS et al., 1998).

Um estudo realizado utilizando tecido de celulose impregnado com DEET e óleo de Neem pelo método convencional visou avaliar a atividade repelente em 3 espécies de insetos para cada repelente (*Culex pipiens pallens*, *Aedes aegypti* e *Ochlerotatus togoi*). O DEET impregnado no tecido apresentou uma significativa repelência para as espécies *Culex pipiens pallens* e *Aedes aegypti*. Por sua vez, o óleo de Neem se

mostrou menos eficaz quando comparado com o DEET para as 3 espécies testadas (LEE et al., 2004).

Estudo realizado utilizando tecido impregnado com DEET e IR3535 pelo método de revestimento de polímero demonstrou que a atividade repelente é dose dependente, pois quanto maior a dose de repelente presente no tecido menor tempo para ocorrer 100% de *knockdown* para os 2 repelentes testados. Nesse mesmo estudo foi demonstrado que para obter 100% de repelência, a dose de repelente necessária de DEET era menor do que para o IR3535 (FAULDE et al., 2010). Em outro estudo, utilizando a mesma técnica de impregnação com cipermetrina como repelente de insetos, foi demonstrado que o tecido pode ser armazenado em temperatura ambiente (25 °C) por 18 meses sem perder sua eficácia e que as lavagens não reduzem substancialmente o efeito repelente do tecido (HEBEISH et al., 2010).

A ciclodextrina tem sido muito utilizada juntamente com repelente de insetos para impregnação de tecidos. Abdel-Mobdy e colaboradores (2008), utilizando ciclodextrina (MCT- β -CD) para formar um complexo de inclusão com o repelente cipermetrina e paletrina na impregnação em tecido, obtiveram como resultados uma ação rápida sobre os insetos e uma atividade tóxica e concentração do repelente aumentada no tecido. Em 2009, os mesmos autores utilizando permetrina e bioletrina como repelentes obtiveram os resultados semelhantes aos do trabalho anterior (ABDEL-MOHDY et al., 2009). Outro trabalho utilizando ciclodextrina e um óleo essencial (limoneno) objetivou comparar a influência de diferentes métodos impregnação (método convencional, revestimento de superfície e utilizando ciclodextrina) na atividade repelente. O limoneno associado com a ciclodextrina apresentou uma maior toxicidade aos insetos quando comparado com outros métodos de impregnação. Também foi demonstrado que quanto ao tempo de permanência tanto os revestidos como os com ciclodextrinas mantiveram a propriedade de repelente de insetos após lavagem e armazenamento (HEBEISH et al., 2008).

Os acabamentos em tecidos também têm sido testados, como por exemplo, a utilização de repelente de água que pode ter um efeito sobre ou ser afetado pelo repelente de inseto. Estudo realizado utilizando os repelentes de insetos M-1960, benzoato de benzila e DEET em combinação com repelente de água (Quarapel), visou determinar a atividade repelente de insetos nessa associação. A utilização de repelente de água aumentou a resistência do M-1960, benzoato de benzila e DEET às lavagens e também melhorou a duração de repelência de insetos para M-1960 e DEET (MARKARIAN et al., 1968). Outro teste utilizando repelentes de inseto (permetrina, deltametrina e lambdacialotrina) e repelente de água (amino silicone) aumentou a repelência com aumento da hidrofobicidade por 17,5 semanas (AMALRAJ et al., 1996).

Embora o DEET seja um repelente de insetos utilizado em tecidos, sua volatilidade reduz a duração em roupas e seu efeito plastificante torna inconveniente sua utilização. Devido a isso, o desenvolvimento da permetrina aplicada a vestimentas foi um grande avanço nesse campo, proporcionando um ingrediente ativo que permanece aderido às fibras de uma forma que resiste a desgaste e as lavagens (MUSTAPHA et al., 2008).

3.3.1. Permetrina

Comercializada pela primeira vez em 1973, a permetrina pertence à classe dos piretróides sintéticos derivados da flor de crisântemo (BEYOND, 2004). Age como repelente e inseticida sendo ativa contra uma ampla variedade de pragas, incluindo mosquitos, moscas, piolhos, carrapatos, pulgas e outros artrópodes (BEYOND, 2004).

A permetrina (Figura 2) apresenta 2 diastereoisômeros com diferentes propriedades químicas, físico-químicas e toxicológicas (EDWARDS e FORD, 1997). O isômero cis é considerado um pouco mais tóxico e excretado em uma taxa mais baixa que o isômero trans. Devido a isso, preparações com menor proporção de cis-permetrina são usadas em seres humanos, de modo que a relação cis/trans na maioria dos preparativos é 25:75 (CATALAMESSA, 1993). A permetrina é um produto químico apolar, com solubilidade em água de 0,2 mg/L e log P de 6,1.

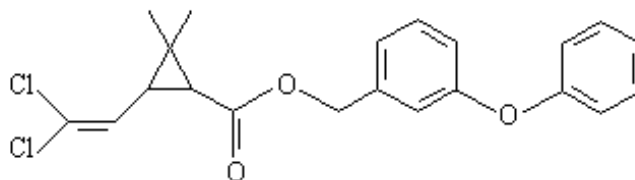


Figura 2. Fórmula estrutural da permetrina.

A permetrina não repele insetos como o DEET, mas funciona como um inseticida de contato. Como um neurotóxico, o mecanismo principal de ação é a hiperestimulação do sistema nervoso do inseto devido ao bloqueio do movimento de sódio através da membrana do nervo, causando toxicidade ao sistema nervoso e paralisia, espasmos musculares ou morte do inseto (MARSHALONIS et al., 2006; SODERLUND, et al., 2002).

Essa substância possui uma reatividade rápida, excelente fotoestabilidade, resistência ao intemperismo e baixa toxicidade aos mamíferos (FAULDE et al., 2003). A baixa toxicidade aos mamíferos se deve ao fato de a permetrina ser pouco absorvida e rapidamente inativada por hidrólise da ligação éster quando aplicada sobre a pele (MUSTAPHA et al., 2008). Em um estudo realizado por Franz e colaboradores (1996) visando avaliar a absorção da permetrina através da pele, após a exposição por 48 horas, menos de 0,1% da dose foi absorvida através da pele humana e baixos níveis foram detectados na epiderme e derme .

Por esse motivo a permetrina é mais utilizada na impregnação em tecidos do que aplicada diretamente na pele humana. Pode ser utilizada em roupas, mosquiteiros, equipamentos de *camping* e uniformes de combatentes das forças armadas (ZIELINKI-GUTIERREZ et al., 2011). A permetrina também tem sido amplamente testada no controle de vetores de doenças, demonstrando benefícios na diminuição da morbidade e mortalidade ocasionada por essas doenças (LENGELER e SMITH, 1997).

Testes conduzidos em campo (dentro e fora das tendas) avaliaram a eficácia contra o mosquito *Aedes spp.* comparando tendas tratadas com permetrina e tendas não tratadas. As tendas tratadas com permetrina apresentaram uma proteção significativa dentro da tenda (redução em 84-94% das mordidas) durante 42 dias. No ambiente externo (fora da tenda) houve uma redução de 43-82% de picadas de mosquitos quando comparada com os indivíduos fora da tenda sem tratamento (HEAL et al., 1995).

Estudos avaliando a eficácia da permetrina impregnada em tecidos na prevenção da leishmaniose também foram realizados. Reyburn e colaboradores (2000) realizaram um estudo randomizado em Cabul (Afeganistão) comparando mosquiteiros tratados com repelentes e *chaddars* (pano islâmico utilizado para dormir) na prevenção de leishmaniose. Tanto os mosquiteiros quanto os *chaddars* tratados com permetrina apresentaram eficácia semelhante, proporcionando cerca de 65% de proteção. Em um estudo mais recente realizado com soldados iranianos de forma randomizada por 3 meses, não houve diferença estatística na proteção dos grupos que usavam uniformes tratados com permetrina e os que não usavam, demonstrando que permetrina impregnada em tecido não é eficaz na prevenção da leishmaniose (ASILIAN et al., 2002).

Mais recentemente, também foi realizado estudo avaliando a eficácia de tecidos tratados com permetrina na prevenção das infecções por malária. Neste estudo realizado em campo de refugiados de Dahaab (Quênia) as roupas tratadas com permetrina apresentaram uma redução significativa tanto nas taxas de infecções por malária quanto para a densidade de mosquitos (KIMANI et al., 2006).

Testes avaliando os diferentes métodos de impregnação foram realizados. Comparando o método de revestimento de polímero e o de imersão antes e depois de 100 lavagens contra *Aedes Aegypti* foi demonstrado que a quantidade de permetrina residual era consideravelmente maior para o método de revestimento (280 mg/m²) após 100 lavagens do que o método de imersão (16 mg/m²). Assim como a quantidade de

permetrina residual, a atividade repelente antes e depois das lavagens apresentou uma maior atividade para o método de revestimento de polímero (FAULDE et al., 2003; FAULDE, 2006b). Em outro estudo realizado por Gupta e colaboradores (1990) comparando diferentes métodos de impregnação (imersão e aerossol) em diferentes tecidos (algodão e algodão/nylon) foi verificado que para o tecido de algodão impregnado pelo método de imersão a proteção foi consideravelmente superior àquela observada para o tecido impregnado pelo método de aerossol. Para o tecido algodão/nylon a proteção foi similar para os 2 métodos testados .

Pesquisadores realizaram estudos para determinar a longevidade da atividade repelente da permetrina quando submetida ao intemperismo. Gupta e colaboradores (1989,1990) após submeter o tecido impregnado com permetrina ao intemperismo, sob ambiente úmido e tropical simulado, observaram que o efeito tóxico (*knockdown*) da permetrina impregnada no tecido contra 2 espécies (*Anopheles stephensi* e *Aedes aegypti*) diminuiu rapidamente após uma semana em relação ao efeito repelente .

3.4. Sistema de liberação de fármacos

Os sistemas de liberação controlada de fármacos vêm recebendo atenção especial na área da pesquisa científica, pois representam uma fronteira da ciência, a qual envolve diferentes aspectos multidisciplinares, podendo contribuir para o avanço na saúde humana. Os sistemas de liberação, frequentemente descritos como “*drug delivery systems*”, são formulações que visam o desenvolvimento de estratégias para veiculação de agentes bioativos na forma de dispositivos, tais como nanopartículas e micropartículas.

A aplicação desta tecnologia surgiu a partir do desenvolvimento da microencapsulação, técnica de transformação de líquidos (polímeros e outras substâncias) em pós com tamanhos de partículas micrométricas. As micropartículas obtidas por microencapsulação são de 2 tipos: as partículas poliméricas esféricas matriciais (microesferas) ou reservatórios (microcápsulas). A microencapsulação é bastante utilizada nas indústrias alimentícia, têxtil, farmacêutica e cosmética por

promoverem a liberação controlada de fármacos ou substâncias biologicamente ativas hidrofílicas ou hidrofóbicas (AHSAN et al., 2002). Com o surgimento dessa técnica, abriu espaço para o desenvolvimento de técnicas mais sofisticadas, em escala nanométrica, chamada de nanotecnologia.

A nanotecnologia consiste no desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas em escalas nanométricas. Essa ciência possui como princípio que os materiais nanométricos apresentam propriedades químicas, físico-químicas e/ou biológicas diferentes daquelas em escalas maiores. Uma das áreas da nanotecnologia com maior potencial de aplicação são os sistemas de carreamento e liberação de fármacos (SCHAFFER, 2005). Nas últimas décadas, diferentes sistemas carreadores têm sido estudados visando à liberação controlada de fármacos e o possível aumento da eficácia e seletividade das formulações (SCHAFFAZICK et al., 2003). Esses sistemas têm se tornado uma ótima alternativa para carreamento de fármacos principalmente lipofílicos, com vistas a uma liberação homogênea do ativo aliado a um aumento de seletividade ao alvo de ação farmacológica.

Atualmente existem na literatura inúmeros nanossistemas descritos que diferem na sua composição, tais como, lipossomas, nanoemulsões, nanopartículas poliméricas e lipídicas (SILVA, 2004). Os lipossomas são vesículas aquosas circundadas por uma ou duas camadas de fosfolípidios podendo servir como veículos de fármacos a serem encapsulados na cavidade aquosa da vesícula ou na bicamada (LASIC, 1998). As nanoemulsões são dispersões nanométricas compostas por gotículas oleosas em uma fase aquosa externa, estabilizadas por um sistema tensoativo adequado (MEHNERT e MÄDER, 2001; FRONZA et al., 2004). Por sua vez, as nanopartículas poliméricas incluem as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e a organização estrutural. As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso e as nanoesferas, que não apresentam óleo na sua composição, são formadas por uma matriz polimérica (SCHAFFAZICK et al., 2003). Esses nanossistemas apresentam diversas vantagens quando comparados com sistemas convencionais, tais como: proteção de substâncias lábeis e voláteis, liberação progressiva e controlada do fármaco, utilização de menor

dose do princípio ativo para obtenção do efeito terapêutico e possibilidade de incorporação tanto de substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas (VERMA e GARG, 2001).

Na literatura encontramos aplicações dos sistemas de liberação de fármacos em diversas áreas. De acordo com Salamanca-Buentello e colaboradores (2005), a incorporação de inseticidas e repelentes de insetos em nanopartículas visando prolongar seu efeito é uma área promissora, destacando-se entre as dez maiores aplicações futuras da nanotecnologia em países subdesenvolvidos.

Os artigos científicos encontrados na literatura sobre micropartículas geralmente avaliam permeação, liberação e taxa de evaporação do fármaco nesses sistemas. Solomon e colaboradores (2012) desenvolveram microcápsulas de gelatina reticuladas com formaldeído a fim de reduzir a taxa de evaporação do óleo de citronela. As micropartículas reticuladas apresentaram uma eficiência de encapsulação de 70%, liberação sustentada e uma diminuição na permeação do óleo através da pele em pelo menos 50%. O uso como agente reticulador glutaraldeído também foi estudado para as microcápsulas de gelatina e óleo de *Zanthoxylum limonella* empregado como ativo. Da mesma forma, as microcápsulas reticuladas aumentaram a eficiência de encapsulação e diminuíram a taxa de liberação do óleo. Nesse mesmo artigo, também foi demonstrado que com o aumento da quantidade de óleo, a eficiência de encapsulação diminuiu e a taxa de liberação do óleo aumentou; isso se deve a diminuição da espessura da cápsula, pois a gelatina acaba sendo utilizada para encapsular o óleo deixando a parede da microcápsula mais fina (MAJI et al., 2007). Kasting e colaboradores (2008) desenvolveram microcápsulas com parede de polissacarídeos com o objetivo de determinar a taxa de absorção na pele de DEET. Essa formulação de microcápsulas apresentou uma redução na taxa de permeação do fármaco na pele de 25-35 %.

Nos estudos utilizando nanotecnologia para a encapsulação de inseticidas e repelentes de insetos, os parâmetros mais avaliados são o perfil de liberação e o LC₅₀ para a atividade larvicida dos nanossistemas. Sakulku e colaboradores (2009) demonstraram que o método de preparação e a concentração de tensoativo e glicerol

tem influência na cinética de liberação e tempo de proteção das nanoemulsões de citronela. Outro estudo que desenvolveu uma nanoemulsão com 3 óleos na sua constituição (óleo de citronela, manjerição e vetiver), demonstrou que a combinação dos 3 óleos aumentou a proteção contra as picadas de *Aedes aegypti* para 4,7 horas, em comparação com óleo de citronela isolado que era de 1,5 horas de proteção. Neste mesmo artigo os autores descreveram que com a diminuição do tamanho da gotícula da nanoemulsão a taxa de liberação dos óleos aumentou (NUCHUCHUA et al., 2009). Em relação à propriedade larvicida, um estudo determinou que a nanopermetrina preparada pelo método de evaporação de solvente apresentou uma LC₅₀ menor para larvas de *Culex quinquefasciatus* quando comparada com permetrina na forma *bulk* (ANJALI et al., 2010). Outro grupo de pesquisa utilizando nanopartículas de prata com extrato aquoso de *Eclipta próstata* também verificou que o LC₅₀ para nanopartículas foi menor do que para o da solução aquosa bruta, tanto para a espécie *Culex quinquefasciatus* quanto para *Anopheles subpictus Grassi* (RAJAKUMAR et al., 2011).

Uma característica que também tem se explorado nos sistemas de liberação é a sua multifuncionalidade. Devido a isso tem se buscado aliar duas áreas diferentes para produzir materiais com características específicas. Um exemplo disso é a indústria farmacêutica e têxtil. Nesse contexto, a indústria têxtil tem disponibilizado uma série de tecidos com características especiais como: antibactericida à base de prata, minúsculas cápsulas de agentes hidratantes, desodorizantes e repelentes de insetos (SIS, 2012). No Brasil, já existem pequenas empresas desenvolvendo soluções principalmente em nanotecnologia para aplicação em vestuário, como por exemplo, TNS – tecnologia antimicrobiana; Nanovetores e Innovida (SIS, 2012).

Na literatura existem vários artigos utilizando sistemas de liberação com antimicrobianos e fragrâncias (principalmente óleos essenciais) aplicados em vestuário. Porém ainda são raros os artigos utilizando repelentes de insetos para esses sistemas com a mesma aplicação. Os trabalhos existentes empregando sistemas de liberação e repelentes descritos geralmente usam a técnica de microencapsulação para impregnação em vestuário em vez da nanotecnologia.

Guesan e colaboradores (2008) desenvolveram microcápsulas de DEET impregnadas em mosquiteiros e avaliaram a atividade repelente destes para o vetor da malária. Essas microcápsulas demonstraram possuir capacidade de repelir, inibir e matar os mosquitos por um período de 6 meses em condições laboratoriais. Outro trabalho desenvolveu microcápsulas de citronela impregnadas em tecido de algodão, com o objetivo de avaliar também a atividade repelente para o vetor da malária. Assim como o artigo anterior, as microcápsulas contendo o ativo apresentaram uma maior proteção do que o ativo livre, com efeito repelente superior a 90 % durante 3 semanas (MIRÓ SPECOS et al., 2010).

Por existirem poucos artigos utilizando nanotecnologia com ação repelente impregnados em tecidos na literatura, se faz necessário mais estudos em relação a essa aplicação da tecnologia.

3.4.1. Nanopartículas lipídicas

Os sistemas carregados, como por exemplo, lipossomas, nanoemulsões e nanopartículas poliméricas, apesar de estarem bem descritos na literatura apresentam algumas limitações relacionadas à sua utilização. Os lipossomas apesar das vantagens relacionadas à ausência de toxicidade dos materiais constituintes apresentam limitações de estabilidade química e física, havendo a possibilidade de agregação das vesículas lipossomais e de degradação do fármaco incorporado durante a estocagem. Além disso, apresentam alto custo de produção (MEHNERT e MÄDER, 2001). Por sua vez, as nanoemulsões possuem uma liberação controlada da substância veiculada limitada devido ao estado líquido do carreador, ocorrendo uma rápida liberação do fármaco (MEHNERT e MÄDER, 2001). As limitações existentes quanto à aplicação de nanopartículas poliméricas derivam da possibilidade de resíduos de solventes orgânicos utilizados no processo produtivo, produtos de degradação, citotoxicidade de alguns polímeros e dificuldade de produção em grande escala e alto custo de produção (MÜLLER et al., 2004; ÜNER, 2006).

Como uma alternativa para contornar as já mencionadas limitações existentes dos carreadores citados, foram desenvolvidas nanopartículas lipídicas a partir de lipídeos sólidos que são derivadas de emulsões O/A por simples substituição do óleo por um lipídeo sólido, o qual permanece nesse estado sob a temperatura corporal (MÜLLER et al., 2007). Estes sistemas possuem diâmetro médio de 50 a 100 nm e utilizam lipídeos fisiologicamente compatíveis (0,1% a 30%) e tensoativos não tóxicos (0,5% a 5%) como Poloxamers[®] e lecitinas, que recobrem a superfície das partículas e, desse modo, estabilizam a dispersão (ZUR MÜHLEN et al., 1998).

As nanopartículas lipídicas apresentam como vantagens o fato de serem constituídas de materiais lipídicos biodegradáveis e fisiológicos que se assemelham à estrutura da pele e, portanto, nenhuma ou apenas pequena alteração pode ocorrer quando o produto entra em contato com a pele (SOUTO et al., 2007). Para a estruturação dessas partículas, os materiais lipídicos derivados de frutas e plantas oleaginosas provenientes da Amazônia são especialmente promissores, sendo muitas desta matérias-primas excepcionalmente ricas em micronutrientes, particularmente em antioxidantes, como os carotenóides, antocianinas e outros polifenóis (ROSSO e MERCADANTE, 2007). Além disso, essas formulações podem ser preparadas evitando a utilização de solvente orgânico e outros aditivos tóxicos, minimizando o risco toxicológico e citotóxicos (SOUTO et al., 2007).

Outra vantagem dos sistemas lipídicos coloidais é possuir propriedades oclusivas devido à formação de um filme lipídico. Quanto maior a espessura da camada de nanopartículas lipídicas aplicadas maior é efeito oclusivo, sendo necessário no mínimo 8 mg/cm² de nanopartículas lipídicas para proporcionar um efeito monocamada sobre uma superfície (WISSING et al., 2001). A característica de adesividade das nanopartículas à superfície é, em geral, uma característica de materiais ultra-finos, observando-se aumento das propriedades adesivas com a diminuição do diâmetro médio. O fator de oclusão determinado para micropartículas foi de apenas 10%, em comparação com um fator de 50% quando se utilizou nanopartículas lipídicas de aproximadamente 200 nm (MÜLLER et al., 1998). Assim, as nanopartículas lipídicas

levam a formação de filme proporcionando um efeito de oclusão que é determinado pelo tamanho da partícula (MÜLLER et al., 2007).

As nanopartículas lipídicas por serem constituídas de uma matriz lipídica sólida possuem vantagem de retardar a liberação do fármaco ou ativo, podendo ser utilizadas para modulação da liberação das substâncias incorporadas. O perfil de liberação da substância a partir dessas nanopartículas será dependente do método de obtenção, da composição da formulação (composição e concentração do tensoativo), as propriedades de solubilização do agente tensoativo para o ativo incorporado, em adição a solubilidade (concentração) do ativo na matriz lipídica (coeficiente de partição óleo/água). Estes fatores influenciam a estrutura interna das nanopartículas lipídicas e consequentemente a taxa de liberação do ativo (SOUTO et al., 2004; BUNJE et al., 2007). Dependendo da estrutura da matriz, o perfil de liberação pode ser modulado, como por exemplo, proporcionar uma liberação muito lenta, média ou extremamente prolongada (MÜLLER et al., 2002).

Entretanto, as nanopartículas lipídicas também possuem desvantagens. Devido ao fato de serem compostas por lipídeos sólidos puros ou blends de lipídeos sólidos, elas formam partículas com poucas imperfeições, nas quais o fármaco se acumulará. Devido a esta limitação, um novo sistema carreador foi desenvolvido, chamado carreador lipídico nanoestruturado (WISSING e MÜLLER, 2003). Os carreadores lipídicos nanoestruturados são produzidos a partir da blenda de lipídeos diferentes, os lipídeos líquidos e os lipídeos sólidos. Essa blenda é formada por diferentes comprimentos de cadeia de ácidos graxos e a mistura de mono-, di-, e triglicerídeos que não é capaz de formar uma estrutura altamente ordenada, apresentando como resultados muitas imperfeições na partícula, o que favorece a melhor acomodação do fármaco nessas imperfeições (WISSING e MÜLLER, 2003; MÜLLER et al., 2004). Para obter as misturas para a matriz das nanopartículas, os lipídeos sólidos são misturados com lipídios líquidos, de preferência em uma proporção de 70:30 até 99,9:0,1. Quando esses nanocarreados são comparados com lipossomas e nanopartículas lipídicas sólidas apresentam como vantagem uma maior capacidade de encapsulação de uma

variedade de compostos ativos, um menor teor de água na formulação e evita/minimiza a potencial expulsão de compostos ativos durante a armazenagem (MEHNERT e MÄDER, 2001). Outra grande vantagem dos nanocarreadores quando comparados as nanopartículas lipídicas sólidas é a possibilidade de incorporar óleos que possuam atividade terapêutica. Esses óleos podem atuar sozinhos ou em conjunto com outro ativo incorporado na formulação, potencializando assim a ação desejada.

A técnica mais comum para obtenção das nanopartículas lipídicas é a homogeneização à alta pressão que tem emergido como uma técnica poderosa e confiável para obtenção de tais sistemas, pois ela leva a produtos de tamanhos relativamente homogêneos, proporcionando uma alta estabilidade física para dispersões aquosas. Essa técnica oferece possibilidades para a obtenção das partículas: homogeneização de uma fase lipídica fundida por alta temperatura (técnica de homogeneização à quente) e homogeneização de uma suspensão lipídica sólida em uma fase aquosa em temperatura ambiente ou menor (técnica de homogeneização à frio). Em ambas as técnicas, o fármaco é dissolvido ou solubilizado no lipídeo fundido à aproximadamente 5-10°C acima do seu ponto de fusão (MEHNERT e MÄDER, 2001; SOUTO et al., 2007; ÜNER, 2006). Para produção de nanopartículas lipídicas, geralmente, é utilizado o método de homogeneização à quente, que proporciona tamanho e distribuição de partícula menores devido a exposição a temperaturas mais altas do que a homogeneização à frio. Sendo assim, esse método é realizado através da dissolução do fármaco no lipídeo fundido. O lipídeo fundido contendo o fármaco é disperso em uma solução aquosa aquecida contendo o tensoativo. Essa dispersão é conduzida ao ultra-turrax formando uma pré-emulsão, que posteriormente é homogeneizada em homogeneizador à alta pressão. Essa nanoemulsão obtida é resfriada levando a recristalização do lipídeo e a formação das nanopartículas lipídicas (ÜNER, 2006; SOUTO et al., 2007).

Deve-se levar em consideração, que o aumento da pressão de homogeneização ou número de ciclos, muitas vezes, resulta em um aumento da dimensão das partículas devido à coalescência que ocorre como resultado da alta energia cinética das partículas

(MEHNERT e MÄDER, 2001). Os parâmetros considerados suficientes para obtenção de partículas nanométricas são pressão de homogeneização de 500 a 1500 bar e o número de ciclos de 3 a 5 (MEHNERT e MÄDER, 2001). A homogeneização à quente, técnica preferencialmente utilizada para a produção de nanopartículas lipídicas é adequada para fármacos sensíveis à temperatura, porque a exposição à temperatura é relativamente pequena. Essa técnica também é aplicada com sucesso para fármacos insolúveis ou lipofílicos, mas não é inteiramente adequada para fármacos hidrofílicos porque ocorre uma partição para fase aquosa resultando em uma baixa eficiência de encapsulação (MÜLLER, 2000; ÜNER, 2006).

Um pré-requisito importante para o controle de qualidade das nanopartículas lipídicas é uma adequada caracterização físico-química. Os principais parâmetros avaliados são o tamanho das partículas e o potencial zeta (MÜLLER, 2000). A medida de tamanho de partícula e distribuição de tamanho são frequentemente os parâmetros mais importantes que determinam a qualidade do produto. Partículas maiores que 1 μm e o aumento do número dessas partículas com o tempo são indicadores da instabilidade física da formulação (ÜNER, 2006).

O diâmetro das nanopartículas lipídicas é afetado por vários parâmetros tais como a composição da formulação (mistura tensoativo/tensoativo e propriedade estrutural do lipídeo), método de produção e condições (tempo, temperatura, pressão, número de ciclos e equipamento). A encapsulação do fármaco também é um parâmetro importante, pois quando a concentração do fármaco é alta o tamanho da partícula tende a aumentar provocando uma instabilidade no sistema. Se todos esses parâmetros forem modificados de acordo com a necessidade, uma alta qualidade de produção será alcançada (ÜNER, 2006).

As técnicas de espalhamento de luz dinâmico e de difração de laser são as mais poderosas técnicas para a medição de tamanho de partícula. A espectroscopia de correlação de fótons (também conhecido como espalhamento de luz dinâmico) mede a variação da intensidade da luz que é causado pelo movimento das partículas.

Entretanto, este método abrange uma escala de tamanho de alguns nanômetros a cerca de 3 μm . Isto significa que é uma boa ferramenta para caracterizar nanopartículas, mas não é capaz de detectar micropartículas maiores presentes simultaneamente (MEHNERT e MÄDER, 2001). Por sua vez, a técnica de difração de laser, que se baseia na dependência do ângulo de difração do raio da partícula, abrange uma ampla faixa de tamanho que vai de nanômetros a micrômetros, sendo utilizada para detectar artefatos micrométricos na formulação (MÜLLER, 2000).

O potencial zeta, outro parâmetro importante, permite fazer previsões sobre a estabilidade de armazenamento da dispersão coloidal. Em geral, agregação de partículas é menos provável de ocorrer em partículas carregadas (alto valor de potencial zeta em módulo), devido à repulsão elétrica (MEHNERT e MÄDER, 2001). O potencial zeta é afetado pelo aumento da temperatura ou da luz, pois nestas condições há um aumento da energia cinética dos sistemas levando à agregação em combinação com a redução do potencial zeta. A energia pode levar a troca da estrutura cristalina do lipídeo, provocando uma reorientação cristalina. Essa reorientação pode resultar na troca da carga da superfície da partícula e, conseqüentemente, na troca do potencial zeta (ÜNER, 2006).

As nanopartículas lipídicas têm sido investigadas para várias aplicações como para a veiculação de ativos de uso cosmético, bem como farmacêuticas empregando as vias parenteral, pulmonar e oral para a administração de fármacos. Na literatura existem apenas 2 estudos da incorporação de repelentes de insetos nas nanopartículas lipídicas.

Em um estudo realizado por ISCAN e colaboradores (2006) o repelente de insetos DEET (N,N-dietil m-toluamida) foi incorporado em nanopartículas lipídicas sólidas, a fim de reduzir a permeação percutânea, evitar os efeitos tóxicos e também manter o efeito do fármaco por um tempo prolongado. As nanopartículas lipídicas com DEET foram comparadas com DEET livre. Os resultados mostraram que a incorporação do DEET nas nanopartículas lipídicas reduziram o perfil de liberação e a permeação na

pele. Estudos de imagens realizados com microscopia eletrônica de varredura mostraram que existiam ainda nanopartículas lipídicas na superfície da pele depois de 2 h, indicando que o DEET pode permanecer por um período prolongado no local de aplicação . Outro estudo que incorporou óleo de gerânio em nanopartículas lipídicas sólidas a fim de determinar o perfil de liberação do óleo, demonstrou que as nanopartículas lipídicas sólidas reduziram o perfil de liberação do óleo, e consequentemente a rápida evaporação do óleo (ASNAWI et al., 2009).

Em resumo, as nanopartículas lipídicas possuem grande potencial como sistemas carreadores para incorporação de repelentes de insetos, porém ainda há necessidade de mais estudos para aprofundar as possibilidades de aplicações destas nanopartículas, em específico para incorporação em tecidos, o que ainda é inédito.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Matérias-primas

- Tecido algodão -Sarja, Empório das sedas, Porto Alegre-RS, Brasil;
- Tecido poliéster- Musseline, Empório das sedas, Porto Alegre-RS, Brasil;
- Fio de algodão, Meias Pé Brasil, Portão-RS, Brasil;
- Manteiga de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) – Inovam, Cuiabá – MT, Brasil;
- Óleo de citronela (*Cymbopogon nardus*) – Delaware, Porto Alegre- RS, Brasil;
- Óleo de soja – IMCOPA, Araucária – PR, Brasil;
- Permetrina – Delaware, Porto Alegre – RS, Brasil;
- Silicone Dow Corning[®] C2-0563 – Daltomare, São Paulo – SP, Brasil.
- Plantaren[®] 1200 (Lauril glicosídeo) – Cognis do Brasil, Jacareí – SP, Brasil;
- Vitamina E oleosa - Alpha química, Porto Alegre - RS, Brasil ;
- Ácido benzóico – Importadora química Delaware, Porto Alegre – RS, Brasil;
- Benzoato de sódio – Valdequímica produtos químicos, São Paulo – SP, Brasil;
- Fosfatidilcolina 40% (Lipoid[®] 40%) – Gerbras – Anápolis – GO, Brasil;
- Polissorbato 80 (Tween 80[®]) – Henrifarma, São Paulo – SP, Brasil.
- Polissorbato 20 (Tween 20[®]) – Delaware, Porto Alegre – RS, Brasil;
- Lauril sulfato de sódio – ALZ, Porto Alegre – RS, Brasil;
- Propilenoglicol 400 – Delaware, Porto Alegre – RS, Brasil;
- Sabonete Savon de Marseille – Bonne mère- L'occitane

4.2. Aparelhos e equipamentos

- Balança analítica – Denver APX200;
- Ultra-turrax - T25, Ika;
- Mastersizer[®] 2000, Malvern;
- Zetasizer[®] nano-ZS, modelo ZEN 3600, Malvern;
- Homogeneizador a alta pressão - Panda 2K NS1001L, Niro Soavi;
- Metalizador Jeol Jee 4B SVG-IN (Jeol, Tóquio, Japão);
- Microscópio eletrônico de varredura: JSM-5800 (Jeol, Tóquio, Japão),

- Célula de Franz automatizada – MicroettePlus™, Hanson Research, USA;
- HPLC – Shimadzu (LC-20A prominence), São Paulo, Brasil;
- Agitador de hélice – RW 20, Ika, São Paulo, Brasil;
- Banho termostatizado, Oxylab, São Leopoldo-RS, Brasil;
- Ultrassom- 1400A Ultracleaner, Unique, Indaiatuba-SP, Brasil;
- Câmara climática – Nova ética, Vargem Grande Paulista-SP, Brasil;
- Centrífuga - 5417R, Eppendorf, São Paulo-SP, Brasil;
- Vórtex – Certomat MV, B. Braun Biotech.
- Equipamento para tecer meias – KDY- 5DE, Soosan.

4.3. Preparação das dispersões aquosas de nanopartículas lipídicas

As dispersões aquosas de nanopartículas lipídicas foram preparadas pela técnica de homogeneização a alta pressão. A fase lipídica contendo manteiga de cupuaçu e os óleos (citronela ou soja) foi fundida a 37 °C. Em seguida as demais matérias-primas foram adicionadas (permetrina, vitamina E, silicone DC C2-0563, ácido benzóico e lecitina – utilizada somente nas nanopartículas que foram posteriormente revestidas). A mistura foi dispersa sob alta agitação (8000 rpm, 30 s) usando um Ultra-Turrax em uma solução aquosa contendo o Plantarem® 1200 e Polissorbato 80® (tensoativo utilizado para a preparação das nanopartículas sem e com revestimento, respectivamente) e benzoato de sódio, mantidos à mesma temperatura da fase lipídica. A pré-emulsão obtida foi homogeneizada a alta pressão aplicando-se 3 ciclos de 350 bar. Após a homogeneização, a nanoemulsão O/A produzida foi mantida a 25 °C, permitindo desse modo a recristalização do lipídeo e originando as nanopartículas. A concentração utilizada de cada componente está indicada na Tabela 1. As partículas foram denominadas nanopartículas lipídicas de citronela teste (NPCT), nanopartículas lipídicas de soja teste (NPSt), nanopartículas lipídicas de citronela após ajustes na concentração (NPCa) e nanopartículas lípicas que serão revestidas (NPCr). Para fins de comparação uma solução hidroalcolica 70% de permetrina (Perm) na mesma concentração dos nanocarreadores foi preparada.

4.3.1. Revestimento da dispersão aquosa de NPCr

Para o revestimento da formulação de NPCr foi utilizado solução de Eudragit[®] E100 (1,5%) em ácido acético (2%). A solução de Eudragit[®] E100 foi adicionada a formulação de NPCr sob agitação com volumes pré-determinados (solução de Eudragit[®] E100 era adicionada a cada 30 minutos) até a inversão do potencial zeta para valores positivos (de -25,00 mV para aproximadamente +25,00 mV), indicando o total revestimento da partícula. As formulações de nanopartículas lipídicas já revestidas com Eudragit E100 foram denominadas de NPCR.

Tabela 1. Composição das suspensões de nanopartículas lipídicas.

Matéria-prima	Concentração (%)			
	Fase lipídica	NPCt	NPSt	NPCa
Manteiga de cupuaçu	8,00	8,00	7,00	7,00
Óleo de citronella	1,50	—	1,00	1,00
Óleo de soja	—	1,50	—	—
Permetrina	0,50	0,50	0,50	0,75
Ácido benzóico	0,10	0,10	0,10	0,10
Vitamina E	0,10	0,10	0,10	0,10
Silicone DC C2-0563	2,50	2,50	2,00	2,00
Fosfatidilcolina 40%	—	—	—	2,00
Fase aquosa				
Plantaren® 1200	3,00	3,00	4,00	—
Polissorbato 80	—	—	—	2,00
Benzoato de sódio	0,20	0,20	0,20	0,20
Água (qsp)	100,00	100,00	100,00	100,00

Obs.: Por se tratarem de testes, apenas um lote das formulações NPCt e NPSt foram preparados. As formulações NPCa e NPCr, foram preparadas em triplicatas. Os percentuais (%) mencionados na tabela estão expressos em g/100 mL.

4.4. Parâmetros de validação das análises por CLAE

O método analítico para o doseamento da permetrina foi realizado através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), partindo-se da técnica desenvolvida por García et al (2001) sendo realizadas algumas modificações nos parâmetros cromatográficos.

Os parâmetros avaliados foram: linearidade, precisão intermediária, repetibilidade, limites de detecção e quantificação e especificidade (frente a uma formulação de nanocarreadores- NPC2), sendo os ensaios realizados em cromatógrafo Shimadzu com detector UV/VIS. Os parâmetros precisão intermediária, repetibilidade e especificidade também foram determinados para os nanocarreadores contendo permetrina impregnados nos tecidos. Os parâmetros cromatográficos encontram-se na **Erro! Fonte de referência não encontrada..**

Tabela 2. Parâmetros cromatográficos utilizados na metodologia analítica para doseamento da permetrina em sistemas nanoparticulados.

Parâmetros	Condições
Detecção	UV ($\lambda = 272 \text{ nm}$)
Fluxo	0.8 mL/min
Coluna	LiChrospher 100 RP ₁₈ (5 μm) (Merck)
Fase móvel	Metanol:água (90:10 v/v)
Volume de injeção	100 μL

4.4.1. Linearidade

Para a avaliação da linearidade três curvas de calibração foram construídas, com uma faixa de concentração utilizada de 1,0 a 20,0 $\mu\text{g/mL}$, sendo todas diluições realizadas em metanol. As amostras foram filtradas através de membrana com 0,45 μm

de poro (Millipore®) antes das análises e injetadas no cromatógrafo, registrando-se os valores das áreas.

4.4.2. Especificidade

Para avaliação da especificidade, uma suspensão dos nanocarreadores foi preparada da mesma forma que a suspensão dos nanocarreadores contendo permetrina, porém sem a presença do fármaco. Para avaliação de especificidade dos tecidos, um pedaço de tecido foi utilizado sem a impregnação dos nanocarreadores. Para ambos, o mesmo volume, tratamento e diluição das partículas utilizado no teste de precisão foram utilizado para o teste de especificidade, porém utilizando-se a suspensão sem fármaco ou o tecido sem os nanocarreadores.

4.4.3. Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação (Erro! Fonte de referência não encontrada. e Erro! Fonte de referência não encontrada.) foram calculados matematicamente através da relação entre o desvio padrão da curva de calibração e sua inclinação, usando o fator multiplicador sugerido pela norma da *International Conference on Harmonization* (2005).

Equação (1)

$$LD = \frac{3,33 \cdot DP}{A}$$

Equação (2)

$$LQ = \frac{10 \cdot DP}{A}$$

onde LD é o limite de detecção, LQ o limite de quantificação, DP o desvio padrão da reta de calibração e B o coeficiente angular da reta de calibração.

4.4.4. Precisão

Na avaliação da repetibilidade para os nanocarreadores seis amostras foram preparadas a partir das suspensões dos nanocarreadores, para uma concentração de 10 µg/mL de permetrina. Para tanto os nanocarreadores foram diluídos em metanol e deixadas em banho de ultrassom por 15 minutos para a total liberação do fármaco. Para a avaliação da repetibilidade para os nanocarreadores impregnados nos tecidos, foi necessária a extração da permetrina nesses tecidos. Pedacos de tecidos (algodão e poliéster) foram diluídos em metanol, conduzidos ao vórtex por 5 minutos e sonicados por 30 minutos, após uma alíquota foi retirada e diluída para concentração de 10 µg/mL de permetrina. Posteriormente, as amostras (nanocarreadores livre e impregnado no tecido) foram filtradas em filtro de 0,45 µm de poro (Millipore®) e injetadas no CLAE, sendo o resultado da análise expresso em termos de desvio padrão relativo (DPR). A precisão intermediária foi avaliada através da comparação entre as injeções dessa mesma concentração (10 µg/mL) realizadas em dois dias consecutivos, calculando-se posteriormente o DPR dos resultados das determinações.

4.5. Caracterização físico-química das formulações

4.5.1. Determinação do diâmetro de partícula

Todas as formulações preparadas tiveram seu diâmetro de partículas e índice de polidispersão (PDI) determinados através de espalhamento de luz dinâmico (Zetasizer® nano-ZS modelo ZEN 3600, Malvern), após diluição das dispersões (500 vezes, v/v) em água filtrada em filtro 0,45 µm Millipore.

Foram também determinados o diâmetro médio e a distribuição de tamanho de partícula pela técnica de difratometria de laser (Mastersizer® 2000, Malvern). Para essa determinação foram utilizados como parâmetro o índice de refração da manteiga de

1,46 e um espectro de leitura compreendido entre 0,02 – 2000 µm. O diâmetro médio baseado no volume ($d_{4,3}$) foi utilizado como parâmetro para a distribuição de tamanho de partículas. Medidas do diâmetro de partículas correspondentes a 10 %, 50 % e 90 % da distribuição acumulada ($d_{0,1}$, $d_{0,5}$ e $d_{0,9}$, respectivamente) também foram realizadas. Por meio dessas medidas foi realizada a determinação do SPAN, definido como uma medida da dispersão granulométrica, a qual relaciona os valores encontrados do diâmetro das partículas correspondentes a 10 %, 50 % e 90 % da distribuição acumulada para uma amostra, sendo calculado pela Equação 3 (CHEN e DAVIS, 2002):

$$span = \frac{d_{0,9} - d_{0,1}}{d_{0,5}} \quad \text{Equação (3)}$$

4.5.2. Potencial zeta

O potencial zeta das dispersões contendo os nanocarreadores foi obtido através da medida da mobilidade eletroforética (Zetasizer[®] nano-ZS modelo ZEN 3600, Malvern), após diluição das dispersões (500 vezes, v/v) em solução de NaCl 10 mM previamente filtrada através de membrana 0,45 µm Millipore. Os resultados foram obtidos através da média de três determinações.

Para as formulações de NPCR o potencial zeta foi determinado a cada volume adicionado de solução de Eudragit E100 até a inversão do potencial zeta para valores positivos (de -25,00 para aproximadamente +25,00 mV).

4.5.3. Teor de permetrina nas nanopartículas lipídicas

A concentração total de permetrina nas formulações foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando parâmetros do método validado. Cada suspensão foi tratada com metanol, posteriormente filtrada (Millipore 0,45 µm) e injetada (100 µL) no HPLC.

4.5.4. Estabilidade das suspensões de nanopartículas lipídicas

As suspensões contendo nanopartículas lipídicas (NPCa, NPCr e NPCR) foram avaliadas quanto à estabilidade com base no diâmetro de partícula (medidos por difratometria de laser) e diâmetro médio de partícula (medidos por espalhamento de luz dinâmico). As formulações ficaram armazenadas em prateleira à temperatura ambiente, ao abrigo da luz e foram avaliadas no tempo 0, 15 e 30 dias.

4.6. Impregnação das nanopartículas no tecido

A impregnação das nanopartículas em diferentes tecidos (algodão e poliéster) foi realizada através da imersão de pedaços de tecidos (6 cm x 6 cm), em um becker contendo as dispersões aquosas das nanopartículas (NPCa e NPCR), sob agitação magnética. Esses pedaços de tecidos foram deixados imersos em diferentes tempos (0,25; 0,5; 2,5; 6 e 24 horas) para determinar o melhor tempo de imersão. Posteriormente os tecidos foram secos a temperatura ambiente por 24 horas.

Para fins de comparação fios de algodão cru foram submetidos a impregnação e posteriormente foram tecidos para obtenção do algodão tecido. O rolo contendo o fio de algodão foi imerso em uma dispersão aquosa de NPCa que ficou sob agitação (agitador de hélice) por 24 horas. A secagem do rolo foi realizada em câmara climática com temperatura (25°C) e umidade (40%) controlada por 72 horas. Após a secagem, o fio foi conduzido até empresa Meias Pé Brasil, obtendo-se o tecido impregnado com NPCa através do equipamento para tecer meias (KDY - 5DE, Soosan).

4.7. Caracterização dos tecidos após impregnação

4.7.1. Determinação do teor de permetrina após impregnação

A concentração de permetrina nos tecidos (algodão - A, poliéster - P e algodão tecido - AT) após a impregnação foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Um pedaço de cada tecido (6 cm x 6cm) foi picotado e inserido em um tubo de ensaio com metanol sendo submetido ao vortéx por 5 min e,

posteriormente, ao ultrassom por 30 minutos para extração do fármaco. Após extração, foi retirada uma alíquota da solução e transferida para um balão volumétrico. A solução no balão volumétrico foi filtrada e conduzida ao HPLC para quantificação.

4.7.2. Análise morfológica

Após a impregnação os tecidos (algodão, poliéster e algodão tecido) e o fio de algodão impregnado foram analisados através de microscopia eletrônica de varredura (Scanning Microscope JSM-5800-Jeol). As amostras foram recobertas com ouro antes das análises e visualizadas em aumentos de até 15.000 vezes (Centro de Microscopia Eletrônica/UFRGS, Porto Alegre, Brasil).

4.8. Estudo de permeação cutânea *in vitro*

Para este estudo, inicialmente foi necessária a realização de testes prévios de solubilidade da permetrina, visando à escolha da solução receptora que mantivesse a condição *sink*.

4.8.1. Escolha da solução receptora

A escolha da solução receptora a ser utilizada no estudo da permeação cutânea *in vitro* foi baseada na solubilização da quantidade de fármaco presente em um volume de solução receptora que demonstrasse ser capaz de manter a condição *sink* ($C_t < 0,1 C_s$) (SINKO, 2008). O teste foi realizado através da adição de uma quantidade excessiva de permetrina na solução receptora que foi submetida ao vórtex e que, posteriormente, foi deixada em repouso por 24 horas. Foi coletada uma alíquota da fase límpida, diluída e analisada em HPLC. A (Tabela 3) descreve as várias soluções receptoras testadas.

Tabela 3. Soluções receptoras testadas.

Meio receptor
Etanol 40%
Etanol 60%
PBS 0,2 M pH 7,4
PBS 0,2 M pH 7,4:Etanol (50:50)
Tween 20 (2,5%) + PBS 0,2M pH 7,4
Tween 20 (4%)
Tween 20 (2%):Etanol (60:40)
Lauril sulfato de sódio – LSS (0,5%)
LSS (0,5%) + PBS 0,2 M pH 7,4

4.8.2. Ensaio da permeação cutânea *in vitro*

Os ensaios de permeação cutânea *in vitro* foram realizados em células de Franz automatizadas. Esse aparelho é constituído de 6 células que são envoltas por uma “jaqueta” onde passa água com temperatura controlada, cada uma com compartimento receptor de 7 mL e uma área disponível para difusão. Todo esse sistema é ainda acoplado a uma placa de agitação magnética. No estudo foi empregada membrana natural (pele de abdômen de porcas, sem pêlo e sem o tecido subcutâneo e gorduroso presente abaixo da derme) com espessura de 1,65-1,90 mm. O ensaio foi realizado com temperatura controlada de 32°C ± 0,5°C. A solução receptora foi colocada no compartimento receptor. Sobre a extremidade das células foram esticadas as membranas, com a derme voltada para a solução receptora e sobre essas foram colocado os tecidos (A+Perm; P+Perm; A+NPCa; P+NPCa). Para fins de comparação a permetrina livre (Perm) e a formulação de NPCa aplicadas diretamente na pele também

foram avaliadas. Alíquotas das amostras no meio receptor foram coletadas a cada 2, 6, 12, 18 e 24 horas e levadas ao HPLC para quantificação.

4.9. Lavagens dos tecidos

O teste foi conduzido conforme protocolo da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2005). As amostras foram introduzidas em um béquer que continha 500 mL de água destilada com 2 g/L de sabão (Savon de Marseille) totalmente dissolvido. O béquer foi introduzido em banho termostaticado a 30°C. O tecido foi agitado utilizando um agitador de hélice por 10 minutos a 200 rpm. Posteriormente, os pedaços de tecidos foram removidos e lavados 2 vezes em água limpa (destilada) nas mesmas condições acima descritas. A cada 1, 5, 10, 15 e 20 lavagens os pedaços de tecidos eram retirados e secos a temperatura ambiente. Os pedaços de tecidos foram tratados com o solvente metanol a fim de extrair a permetrina contida no tecido para determinar a quantidade de permetrina restante após determinada lavagem através do HPLC.

4.9.1. Análise estatística

O resultado de permanência da permetrina no tecido contendo os nanocarreadores e o tecido confeccionado a partir do fio impregnado após as lavagens foram analisados estatisticamente com auxílio do *software* GraphPad Prism versão 5.0, sendo os resultados expressos como média \pm desvio padrão. Os resultados foram comparados através da análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.10. Gerenciamento de resíduos

Todos os resíduos químicos gerados durante a preparação e caracterização das nanopartículas lipídicas foram devidamente armazenados em bombonas plásticas e/ou frascos de vidro âmbar com bocal largo. Os mesmos foram identificados e acondicionados de acordo com o Plano de Gerenciamento de Resíduos implementado pela Resolução COSAT, 2007.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Desenvolvimento das suspensões de nanopartículas

Primeiramente foi realizada a validação do método analítico para doseamento da permetrina incorporada nos nanocarreadores e nos nanocarreadores impregnados nos tecidos através de cromatografia líquida de alta eficiência.

Para a construção da curva de calibração foi utilizada a Permetrina constituída da proporção 75:35 (cis:trans), como essa proporção não variou no momento da quantificação apenas o pico do isômero cis foi considerado para quantificação. A Figura 3 mostra o cromatograma obtido com a amostra de Permetrina 75:35 (cis:trans), em que o tempo de retenção do isômero cis conseguido com as condições de trabalho foi de 9,1 minutos.

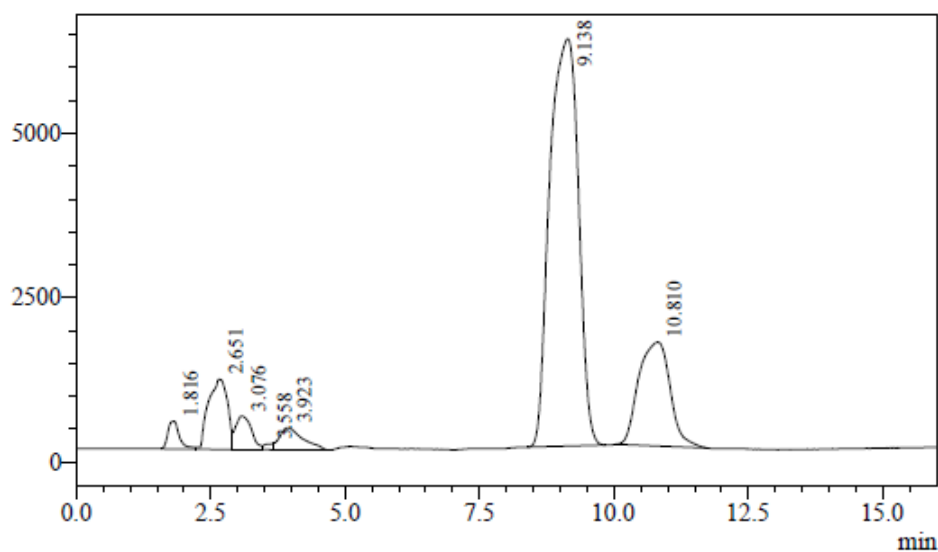


Figura 3. Cromatograma referente ao ponto de concentração 10 µg/mL da permetrina.

A linearidade do método foi determinada através da curva de calibração, na qual foi verificada a proporcionalidade entre as diferentes concentrações do padrão e as áreas obtidas nos cromatogramas (Figura 4). O coeficiente de correlação foi de 0,99, demonstrando que a solução padrão de Permetrina apresentou boa correlação linear.

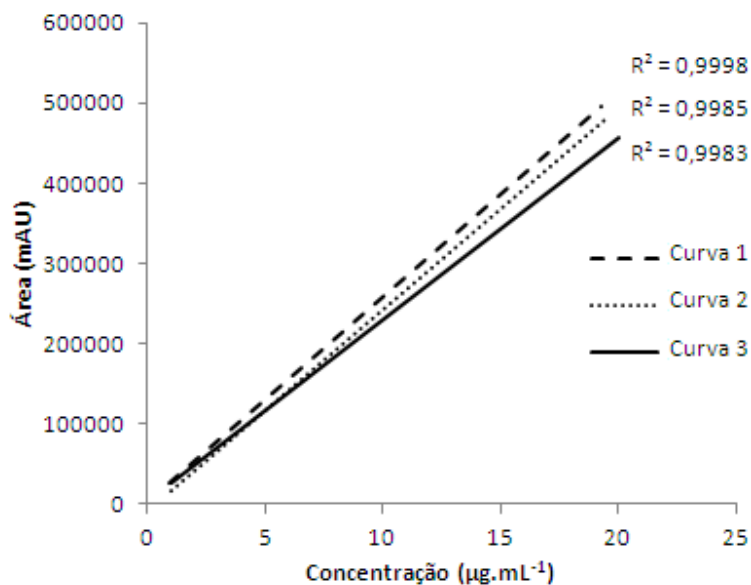


Figura 4. Representação gráfica das três curvas de calibração.

Os valores encontrados para os limites de detecção e quantificação foram de 0,30 µg/mL e 0,89 µg/mL, respectivamente.

Os resultados de repetibilidade e precisão intermediária foram expressos em termos de desvio padrão relativo (DPR). A repetibilidade para os nanocarreadores apresentou DPR de 1,87 % para a sextuplicata da concentração média de 10,51 µg/mL. A precisão intermediária dos nanocarreadores foi avaliada em dois dias consecutivos, com seis amostras em cada dia, na concentração média de 10,51 e 10,34 µg/mL. Os valores de DPR foram 1,51 % e 1,34 % para cada dia. Para os nanocarreadores impregnados nos tecidos a repetibilidade apresentou um DPR de 4,18% e 2,41% nas concentrações médias de 11, 71 e 10,74 µg/mL para o poliéster e algodão, respectivamente. A precisão intermediária dos nanocarreadores impregnados nos tecidos também foram avaliados em dois dias consecutivos nas concentrações médias de 11,91 e 11,81 µg/mL para o poliéster e 11,44 e 11,54 µg/mL. O poliéster contendo os nanocarreadores apresentou um DPR de 3,31 % e 4,63 % e o algodão 2,51% e 2,76% para cada dia de estudo. Para ambos os estudos os valores de desvios padrões

relativos foram inferiores a 5 %, conforme preconizado pelo ICH (2005) demonstrando repetibilidade e precisão intermediária adequadas para o método analítico em questão.

Na análise de especificidade nenhum pico de absorção foi detectado no tempo de retenção onde a permetrina é detectada.

Posteriormente, foram conduzidos testes para escolha do óleo para compor as formulações de nanopartículas. A Tabela 4 relaciona as características de diâmetro médio e *span* das formulações de nanocarreadores lipídicos preparadas com diferentes óleos. O diâmetro médio baseado no volume (D[4,3]) foi utilizado como parâmetro para avaliação da distribuição de tamanho médio das partículas e o *span* como representativo da distribuição granulométrica.

A manteiga de cupuaçu foi escolhida por se mostrar um componente alternativo composto por ácidos graxos saturados e insaturados, principalmente ácidos linoléico e palmíticos, e zinco (ROGEZ et al., 2004) e promissor para o desenvolvimento de formulações de nanocarreadores lipídicos (COLOMÉ et al., 2010). Os óleos foram escolhidos devido a suas características repelentes de insetos que podem potencializar a ação da permetrina. Há diversos relatos na literatura sobre o uso desses óleos como repelentes de insetos, tanto do óleo de citronela (BROWN e HERBERT, 1997; FRADIN, 1998; SAKULKU et al., 2009; STEFANI et al., 2009), como o de soja (FRADIN, 2002; KARTZ et al., 2008; STEFANI et al., 2009). O óleo de citronela é um óleo essencial que age repelindo os insetos devido ao odor que exala, constituído principalmente de geraniol, trans-citral, cis-citral, acetato de geraniol, citranelal e citranelol (RAHULA et al., 1973; YANG et al., 2005; MAIA e PARENTE, 2008). O óleo de soja é um óleo vegetal que age sobre o inseto através da sua aderência na cutícula do inseto bloqueando os orifícios da traqueia matando-o por asfixia, sendo constituído principalmente de cinco ácidos graxos: palmítico (15:0), esteárico (18:0), oléico (18:1), linoléico (18:2) e linolênico (18:3) (COSTA et al., 2000; MOREIRA et al., 2012).

A formulação preparada com óleo de soja (NPSt) apresentou diâmetro médio micrométrico e *span* em torno de 1,2, não sendo este óleo considerado adequado para

preparação dos nanocarreadores lipídicos. A formulação preparada com óleo de citronela (NPCt), logo após a fabricação apresentou diâmetro médio nanométrico e distribuição monomodal, sem a presença de populações micrométricas. Após 15 dias de preparação as formulações apresentaram aumento significativo da viscosidade, conforme avaliação visual. O aumento da viscosidade com a perda do tamanho nanométrico indica ocorrência do fenômeno de geleificação. Esse fenômeno caracteriza-se pela transformação de uma dispersão de baixa viscosidade em um gel viscoso (MEHNERT e MÄDER, 2001). A ocorrência desse fenômeno pode ser atribuído ao desbalanço na proporção da concentração de lipídeos com o tensoativo que proporcionava uma instabilidade no sistema.

Tabela 4. Diâmetro médio das partículas (D[4,3]) e distribuição granulométrica (span) das formulações dos nanocarreadores com diferentes óleos.

	D [4,3] (t=0)	span	D [4,3] (t=15)	span
NPCt	124 nm	0,98	geleificação	—
NPSt	963 nm	1,19	—	—

Como a formulação contendo óleo de citronela (NPCt) apresentou o fenômeno de geleificação após 15 dias de preparação, foi necessário reajustar as concentrações de alguns componentes dos nanocarreadores lipídicos. Os componentes escolhidos para ajuste de concentrações foram a manteiga de cupuaçu, o óleo de citronela e o silicone. O silicone DC C2-0563 foi utilizado nas formulações de nanocarreadores devido a sua característica de repelir água, o que proporciona uma impermeabilização no local de aplicação (DALTIMORE, 2010). As características físico-químicas do nanocarreadores lipídicos com as modificações (NPCa) realizadas estão demonstradas na Tabela 5.

As formulações (n=3) dos nanocarreadores lipídicos contendo óleo de citronela após o reajuste das concentrações (NPCa) apresentaram diâmetro médio de 133 nm e span 1,15 (medidos por difratometria de laser) com uma distribuição monomodal, sem a

presença de populações micrométricas, conforme pode ser observado na Figura 5. Quanto ao diâmetro de partículas (\emptyset), verificado através de espalhamento de luz dinâmico, as formulações apresentam 131 nm e índice de polidispersão (PDI) de 0,11, indicando homogeneidade na distribuição de tamanho de partículas da amostra.

O potencial zeta da formulação apresentou-se em torno de -23,00 mV. De acordo com ÜNER (2006), formulações que apresentam potencial zeta próximos a -30 mv são consideradas com boa estabilização eletrostática. Valores elevados, em módulo, de potencial zeta indicam suspensões de nanopartículas mais estáveis pois a repulsão entre as partículas previne a agregação (SCHAFFAZICK et al., 2003).

O teor apresentado pelos nanocarreadores lipídicos contendo citronela (NPCa) foi em torno de 100%. Esse resultado corrobora aos dados existentes na literatura em relação aos nanocarreadores lipídicos, que proporcionam uma boa capacidade de encapsulação da maioria dos ativos. (SCHÄFER-KORTING et al., 2007).

Tabela 5. Características físico-químicas das dispersões de nanocarreadores lipídicos contendo óleo de citronela. Os resultados representam a média e o desvio padrão da medida de 3 lotes.

	D [4,3] (nm)	Span	\emptyset (nm)	PDI	PZ (mV)	Teor (%)
NPCa	133±2	1,15±0,11	131±3	0,11±0,02	-22,6±0,7	99,00±2,13

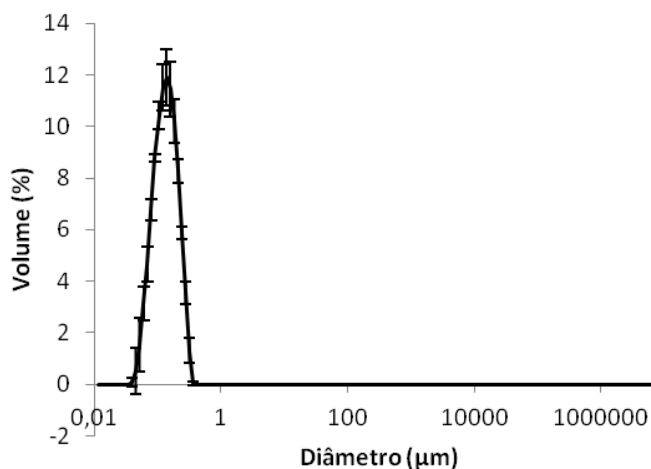


Figura 5. Distribuição do tamanho de partícula por difratometria de laser, da formulação de nanocarreadores contendo óleo de citronela (NPCa).

Para fins comparativos com dados existentes na literatura que utilizam polímero para retardar a liberação do ativo em tecidos, no presente trabalho também foram desenvolvidos nanocarreadores lipídicos revestidos com polímeros (NPCR). O polímero escolhido foi o Eudragit[®] E100 que é um copolímero (polimetacrilato) que possui caráter catiônico com estrutura central hidrofóbica e ramificações hidrofílicas e característica de boa adesão a superfície aplicada (PILLAI e PANCHAGNULLA, 2000). Esse polímero foi escolhido com o objetivo de determinar se o caráter catiônico e sua característica de boa adesão influenciariam na permanência dos nanocarreadores no tecido após as lavagens.

Para o desenvolvimento dos nanocarreadores lipídicos revestidos (NPCR) foi necessária a modificação do sistema tensoativo da formulação. A formulação com modificação do sistema tensoativo antes do revestimento foi nomeada NPCr. O novo sistema tensoativo utilizado foi lecitina de soja e polissorbato 80. O polissorbato 80 é um tensoativo não-iônico que possui o mecanismo de estabilização por impedimento estérico (JÄGER et al., 2009). A lecitina de soja é um emulsionante constituído de uma mistura de glicolipídeos, triglicerídeos e principalmente fosfolipídeos. Os fosfolipídeos são formados por 2 longas cadeias hidrocarbônicas que constituem a parte apolar da

molécula e porção polar formada pelo glicerol e um grupo fosfato e uma molécula polar (ASSUMPÇÃO e MACHADO, 2005). A porção polar dos fosfolípídeos fica exposta nos nanocarreadores o que favorece a interação dessa parte com a porção catiônica do polímero Eudragit[®] E100, formando o revestimento polimérico (MAGDASSI e MUMCUOGLU, 1997).

Na Tabela 6 estão representados as características avaliadas das formulações antes (NPCr) e após (NPCR) o revestimento com polímero. As duas formulações (NPCr e NPR) apresentaram tamanho de partícula (101 nm) e PDI (0,120) iguais, indicando que o revestimento com o polímero não influenciou o tamanho das partículas. Assim como o diâmetro de partícula, determinado por difratometria de laser, os diâmetros médios das duas formulações (NPCr e NPCR) apresentaram resultados iguais (101 nm) com distribuição monomodal representada na Figura 6 para as duas formulações.

O valor de potencial zeta medido para formulação de nanocarreadores antes do revestimento foi de -30,00 mV. Esse valor se deve mais a utilização do tensoativo aniônico que estabiliza as partículas por repulsão de carga do que pela utilização do tensoativo não-iônico (como o polissorbato 80), cujo mecanismo de estabilização dos colóides ocorre através de impedimento estéreo pela formação de um filme interfacial (MEHNERT e MÄDER, 2001). Para garantir o total revestimento dos nanocarreadores lipídicos com o polímero catiônico foi necessário adicionar vagarosamente pequenos volumes da solução Eudragit[®] E100, sob agitação, até obtenção de potencial zeta positivo. Os perfis das determinações de potencial zeta podem ser observados na Figura 7. Após o revestimento, o potencial zeta final da formulação de nanocarreadores lipídicos (NPCR) foi cerca de + 27,00 mV, pois valores de potencial zeta maiores em módulo a formulação apresentava populações micrométricas. Como o potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas (SCHAFFAZICK et al., 2003), podemos atribuir o potencial zeta positivo dos nanocarreadores lipídicos ao total revestimento com polímero que possui caráter catiônico.

Os nanocarreadores revestidos apresentaram (NPCR) um teor de fármaco após a preparação em torno de 50 %. Esse valor baixo pode ser decorrência de dois fatores. Primeiramente, a difícil solubilização da lecitina de soja que foi observada durante a preparação dessas formulações, o que pode ter ocasionado a perda do fármaco no momento de verter a formulação no homogeneizador. Outro fator pode ser devido a densidade da permetrina (1,19 g/mL) ser maior do que a água, o que pode ter ocasionado a precipitação do repelente no funil após ser vertido no equipamento, por não estar bem estabilizado pelo sistema tensoativo, há uma perda parcial do repelente no descarte inicial.

Tabela 6. . Características físico-químicas das dispersões de nanocarreadores lipídicos antes (NPCr) e após (NPCR) o revestimento com polímero. Os resultados representam a média e o desvio padrão da medida de 3 lotes.

	D [4,3] (nm)	span	Ø (nm)	PDI	PZ (mV)	Teor (%)
NPCr	123±0	0,99±0,07	101±0	0,12±0,00	-30,6±0,6	—
NPCR	123±0	1,09±0,06	101±0	0,12±0,01	+26,5±1,2	46,76±0,44

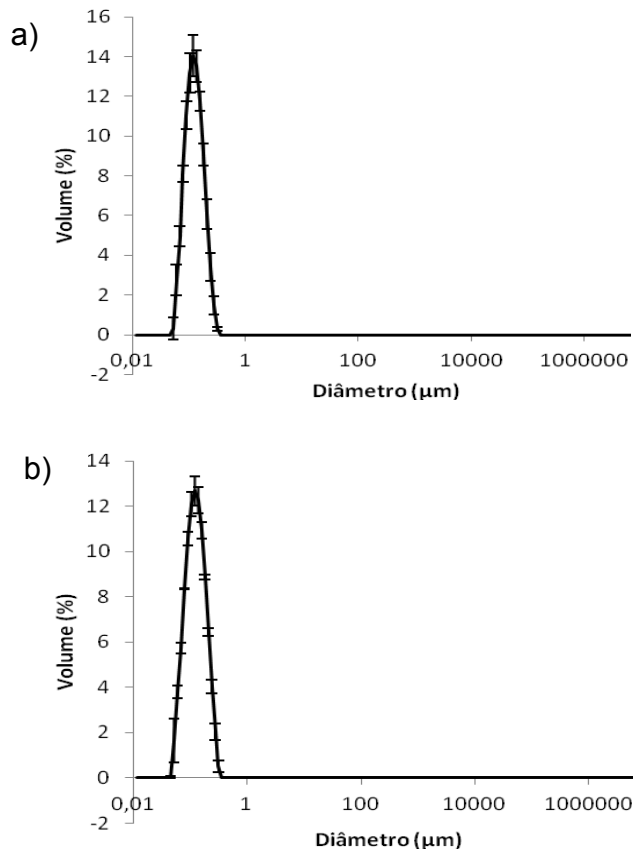


Figura 6. Distribuição do tamanho de partícula por difratometria de laser, da formulação de nanocarreadores lipídicos antes - NPCr (a) e após revestimento - NPCR (b) com polímero. Os resultados representam a média e o desvio padrão da medida de 3 lotes.

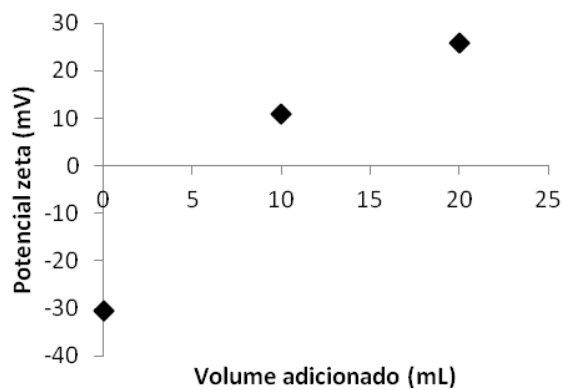


Figura 7. Perfil das determinações do potencial zeta para obtenção dos nanocarreadores revestidos (NPCR).

Para todas as formulações (NPCa, NPCr e NPCR) o diâmetro de partícula, PDI e *span* foram determinados nos tempos 0, 15 e 30 dias armazenadas à temperatura ambiente, empregando as técnicas de espalhamento de luz dinâmico e difratometria de laser. O diâmetro de partícula é um parâmetro importante a ser avaliado porque determina a estabilidade física de dispersões e, conseqüentemente, a qualidade da formulação (MÜLLER-GOYMAN, 2004). O tamanho das partículas das formulações com seus respectivos PDI podem ser observados na Figura 8. A única formulação que apresentou aumento de tamanho de partículas após 30 dias de preparação foi a NPCa, porém o PDI permaneceu estável. As demais formulações apresentaram tamanhos de partícula estáveis e aumentos dos valores de PDI ao longo dos 30 dias. Os diâmetros médios, determinado pela técnica de difratometria de laser, parâmetros também importantes de serem determinados, podem ser observados na Figura 9. A formulação NPCa apresentou um leve aumento no diâmetro médio e de *span* ao longo do tempo, mas a distribuição de tamanho continuou monomodal, sem a presença de populações micrométricas. Em relação às outras formulações, estas se apresentaram estáveis mantendo constantes os valores de diâmetro médio e de *span* com distribuição monomodal.

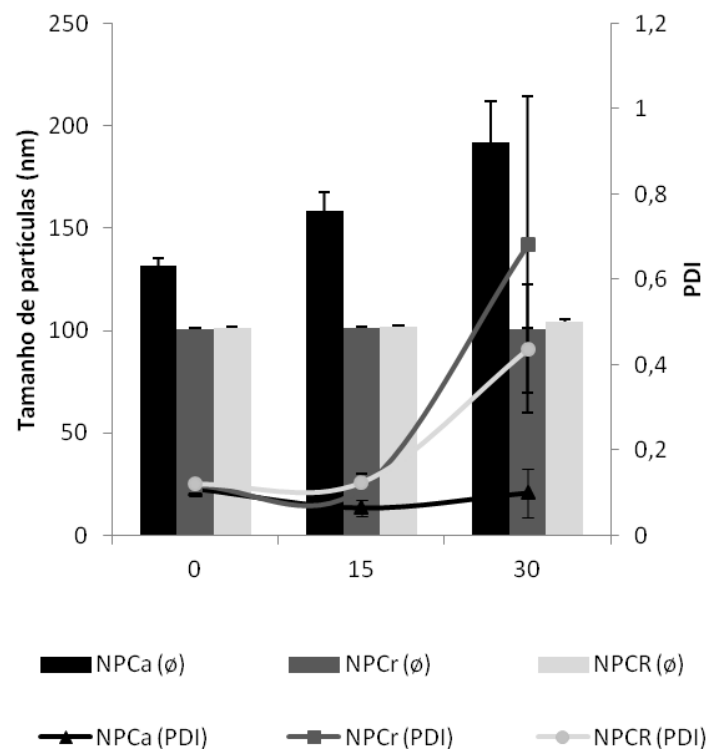


Figura 8. Diâmetro de partícula e PDI das formulações de nanocarreadores lipídicos (NPCa, NPCr e NPCR) após 0, 15 e 30 dias. Os resultados representam à média e o desvio padrão da medida de 3 lotes.

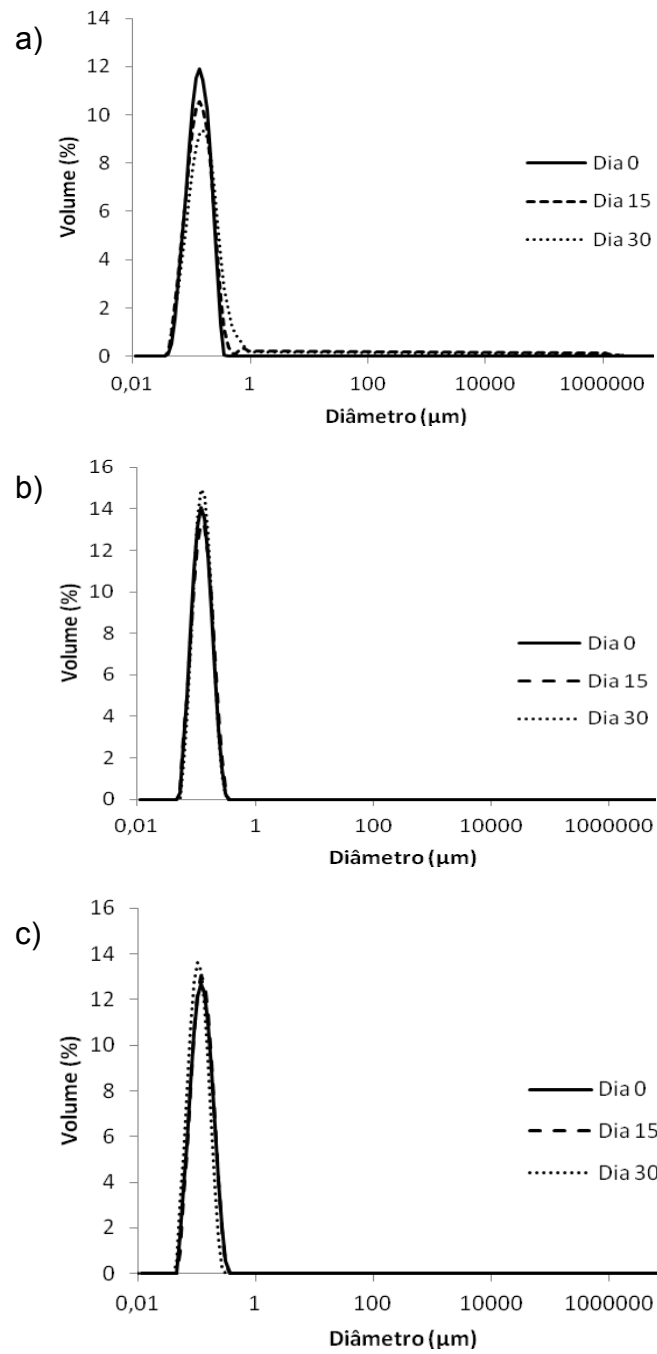


Figura 9. Distribuição do diâmetro de partícula por difratometria de laser, das formulações de nanocarreadores lipídicos NPCa (a), NPCr (b) e NPCR (c) após 0, 15 e 30 dias do preparo. Os resultados representam a média da medida de 3 lotes.

5.2. Impregnação dos nanocarreadores lipídicos nos tecidos

Após a preparação dos nanocarreadores, as formulações foram impregnadas em dois tipos de tecidos. Esses tecidos foram selecionados por possuírem características distintas, o que pode, em tese, proporcionar uma adesão dos nanocarreadores diferenciada. O algodão é constituído basicamente de celulose, essa celulose possui um número muito grande de hidroxilas o que propicia uma grande capacidade de absorver água e um caráter hidrofílico (ALCÂNTARA e DALTIM, 1996). Além disso, a grande quantidade de fios e a trama firme do tecido de algodão são fatores importantes nas características do tecido. Por sua vez, o poliéster é constituído de fibras que contém grupamento éster na sua cadeia principal proporcionando um caráter hidrofóbico ao tecido (ALCÂNTARA e DALTIM, 1996). Diferentemente do tecido de algodão, o poliéster escolhido possui uma quantidade de fio menor e a trama mais flexível.

A impregnação das formulações foi conduzida através da imersão de um pedaço do tecido que permaneceu sob agitação na suspensão de nanopartículas. Para a determinação do tempo necessário para impregnação completa dos nanocarreadores nos tecidos (algodão - A ou poliéster - P), foram realizados testes em diferentes tempos. Como se tratava de teste preliminar, apenas para determinar o tempo de impregnação, apenas a formulação NPCa foi utilizada. O resultado desse ensaio pode ser observado na Figura 10. Após a impregnação pode-se observar que a quantidade de permetrina não variou consideravelmente com o aumento do tempo; devido a isso, o tempo de impregnação escolhido para continuação dos estudos foi de 0,25 horas.

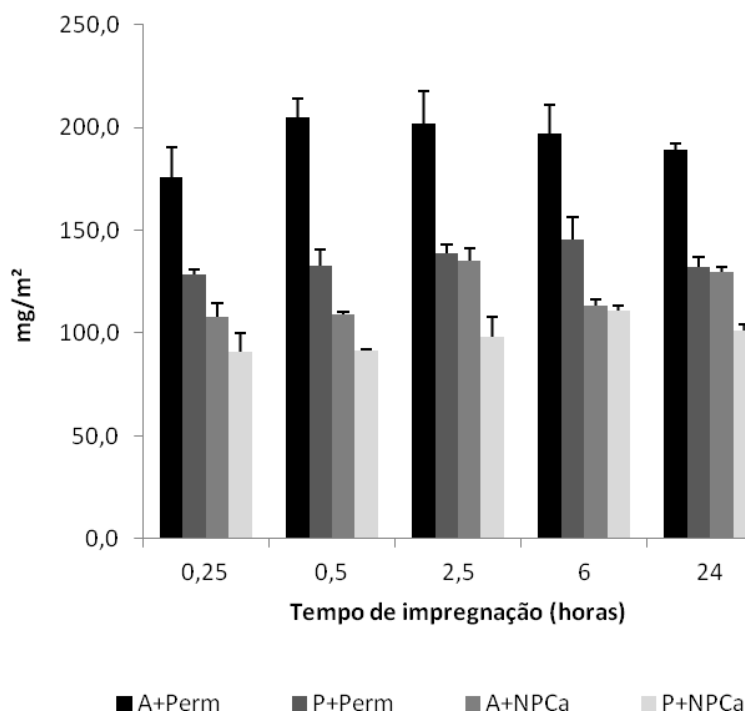


Figura 10. Quantidades de permetrina impregnada nos tecidos em diferentes tempos com NPCa e com solução hidroalcoólica de permetrina (Perm).

A quantidade de permetrina impregnada varia conforme o tipo de tecido e a formulação utilizada (Tabela 7). A permetrina livre apresentou maior quantidade impregnada de fármaco para os dois tecidos (A+Perm: 192 ± 18 mg/m² e P+Perm: 132 ± 5 mg/m²) quando comparada com as formulações dos nanocarreadores (A+NPCa: 117 ± 13 mg/m² e P+NPCa: 91 ± 1 mg/m²). Isso se deve a formulação com permetrina livre ser uma solução apenas com a presença do fármaco, que fica mais disponível para interação com a fibra do tecido. Com as nanopartículas isso não ocorre, pois quem interage diretamente com o tecido são as nanopartículas, já que a permetrina está encapsulada, proporcionando uma menor disponibilidade do fármaco para interação com a fibra. Conforme verificado na literatura, a quantidade de permetrina impregnada difere conforme o tipo de método utilizado, a área do tecido e a concentração de permetrina na solução, variando geralmente de 200 a 1300 mg/m². Quanto maior a área de tecido utilizada e a concentração de permetrina na solução, maior será a quantidade

de permetrina impregnada (REYBURN, 2000; ASSILIAN et al., 2002; FAULDE et al., 2003, 2006 a,b; APPEL et al., 2008; ROSSBACH et al., 2010). Os resultados verificados nesse trabalho estão de acordo com a literatura, pois a quantidade de permetrina nos tecidos não foi maior devido a menor área do tecido e concentração de permetrina utilizadas. Em relação aos dois nanocarreadores avaliados, o NPCa apresentou uma maior quantidade de fármaco impregnada, isso provavelmente pode ser atribuído a uma menor interação química entre o NPCR e o tecido. Quando comparamos os dois tecidos avaliados, o algodão apresentou uma maior quantidade de permetrina impregnada do que o poliéster para todas as formulações testadas, isso ocorre devido a uma maior superfície de contato apresentada pelos fios de algodão.

A fim de avaliar eventuais diferenças nas quantidades de permetrina impregnadas nos tecidos empregando os nanocarreadores, uma nova comparação foi realizada. A impregnação de NPCa foi efetuada em um tecido já tecido e também nos fios de algodão, que posteriormente confeccionou um tecido a partir destes. O algodão tecido (AT: 231 ± 21 mg/m²) apresentou uma maior quantidade de permetrina quando comparada com tecido já tecido impregnado com a permetrina livre (A+Perm: 192 ± 18 mg/m²) e os nanocarreadores (A+NPCa: 117 ± 13 mg/m²) (Tabela 7). Este fato ocorre porque o tecido como produto final apresenta uma trama firme o que impede uma maior incorporação dos nanocarreadores, já o fio de algodão apresenta-se mais “livre” para a maior interação desses nanocarreadores com a fibra de algodão.

Tabela 7. Quantidade de permetrina impregnada nos tecidos (algodão e poliéster) empregando as suspensões de nanopartículas NPCa e NPCR e no algodão tecido empregando a suspensão de nanopartículas NPCa . Os resultados representam a média e o desvio padrão da medida de 4 amostras de tecido.

	Permetrina (mg/m²)	NPCa (mg/m²)	NPCR (mg/m²)
Tecido de algodão	192±18	117±13	63±4
Tecido de poliéster	132±5	91±1	38±4
Fio de Algodão tecido	_____	231±21	_____

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada para verificar a presença e a forma dos nanocarreadores nos tecidos. Essa técnica ilustra a superfície da amostra de maneira tridimensional quando ocorre varredura por um feixe de elétrons. As fotomicrografias dos tecidos sem os nanocarreadores demonstraram que as fibras dos tecidos apresentam superfície lisa com contaminação por partículas de poeira tanto para algodão (Figura 11a) como para poliéster (Figura 11b). As análises do tecido contendo permetrina livre através das fotomicrografias evidenciou a presença do fármaco na fibra dos dois tecidos (Figura 12). Todas as formulações dos nanocarreadores (NPCa e NPCR) apresentaram-se em forma de filme e aglomerados sobre as fibras dos 2 tecidos (Figura 13). A desestruturação dos nanocarreadores formando um filme sobre as fibras pode ser atribuída à técnica de MEV. Essa técnica consiste em utilizar um feixe de elétrons de pequeno diâmetro para explorar a superfície da amostra, ponto a ponto, por linhas sucessivas e transmitir o sinal do detector a uma tela catódica cuja varredura está perfeitamente sincronizada com aquela do feixe incidente (DEDAVID et al., 2007). Geralmente, a fonte de elétrons utilizada é um filamento de tungstênio (W) aquecido, operando numa faixa de tensões de aceleração de 1 a 50 kV. Devido a isso quando o feixe de elétrons incide sobre os nanocarreadores, que são constituídos de lipídeos que fundem quando em contato com altas temperaturas, pode ter ocorrido a desestruturação desses nanocarreadores formando um filme sobre as fibras. Observa-se ainda que as fibras de algodão apresentam uma desestruturação após o contato com a solução de permetrina livre e com os nanocarreadores lipídicos (Figura 12 e Figura 13). Essa desestruturação provavelmente se deve a característica desse tipo de fibra de absorver água acarretando em um desordenamento das fibras. Em relação às fotomicrografias do fio impregnado (Figura 14a e b) e do fio de algodão tecido (Figura 14c) pode-se constatar que a impregnação individual do fio de algodão proporcionou uma melhor distribuição dos nanocarreadores, formando um filme mais uniforme com menos aglomerados sobre a fibra.

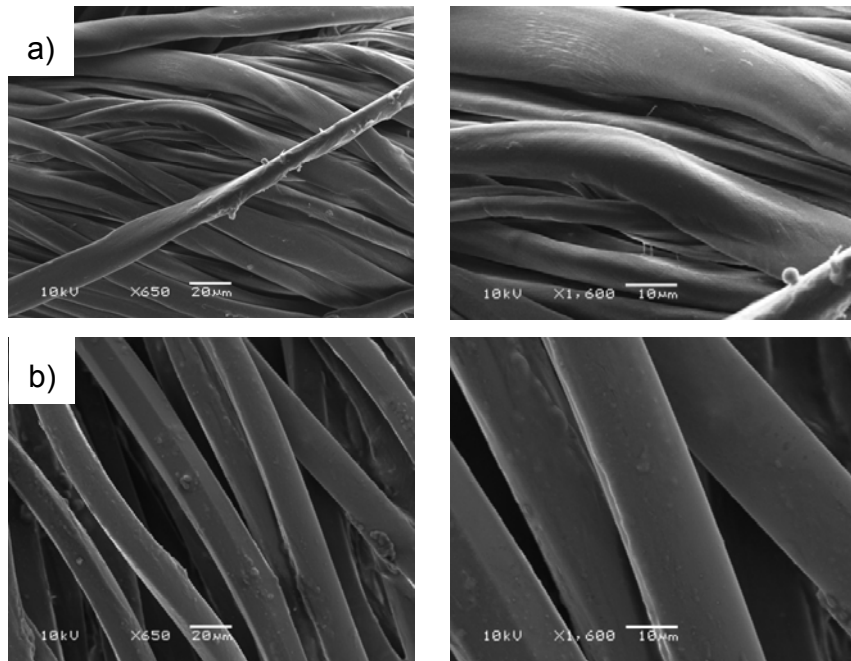


Figura 11. Fotomicrografias dos tecidos sem as formulações: (a) algodão; (b) poliéster.

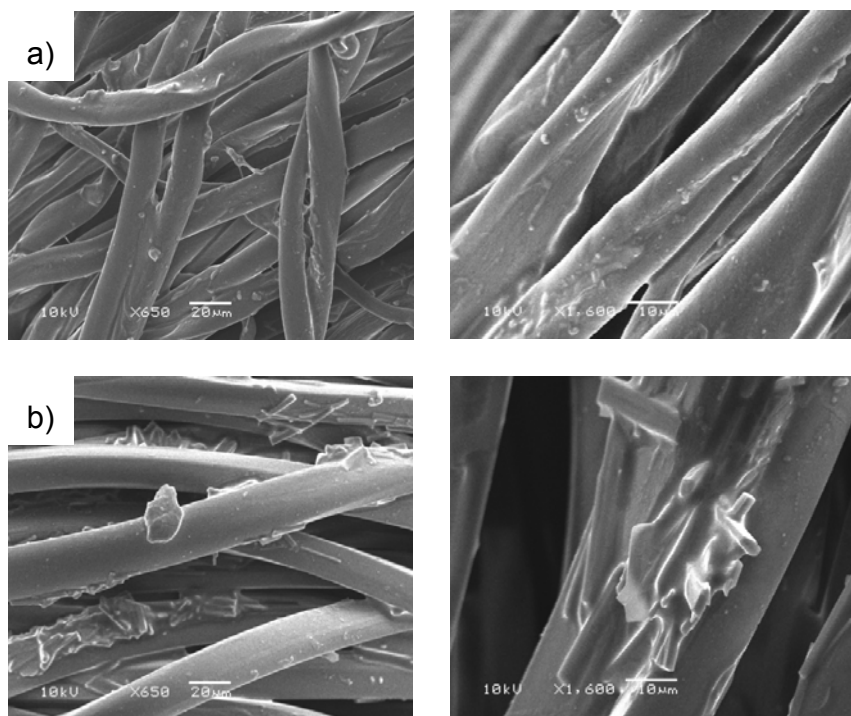


Figura 12. Fotomicrografias dos tecidos: (a) algodão e permetrina livre (A+Perm); (b) poliéster e permetrina livre (P+Perm).

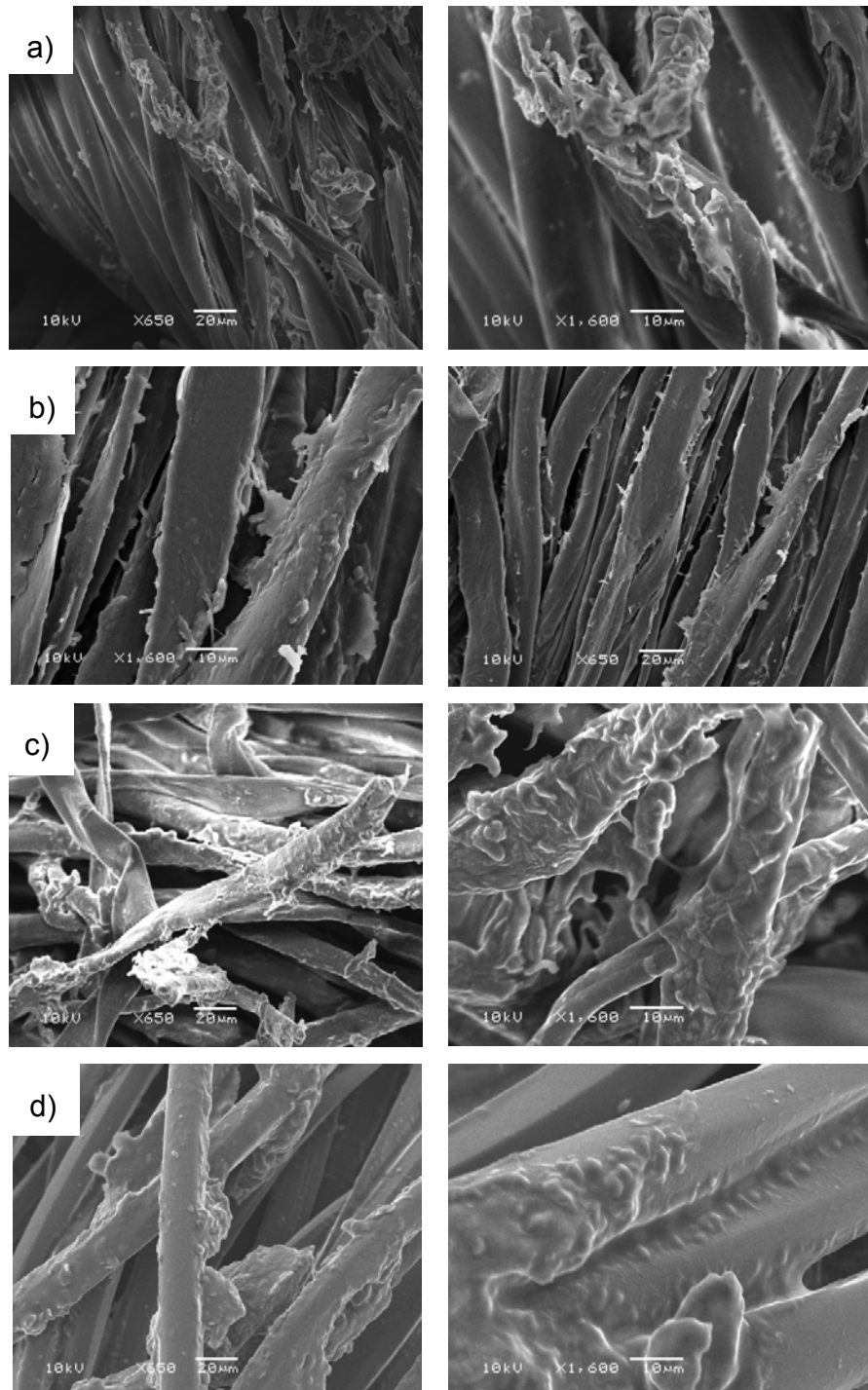


Figura 13. Fotomicrografias dos tecidos: (a) algodão e NPCa; (b) poliéster e NPCa; (c) algodão e NPCR; (d) poliéster e NPCR.

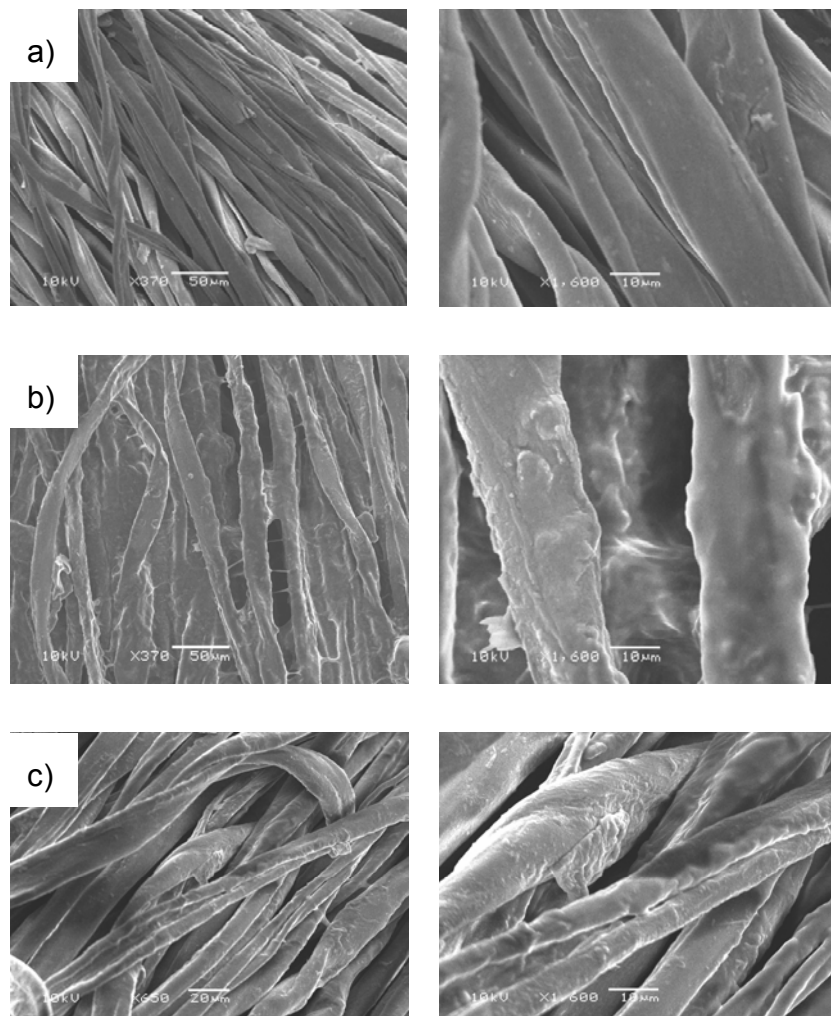


Figura 14. Fotomicrografias: (a) fio de algodão; (b) fio de algodão e NPCa e (c) fio de algodão tecido.

5.3. Estudo de permeação cutânea *in vitro*

O estudo de permeação *in vitro* é uma ferramenta muito valiosa e determinante na avaliação do comportamento de formulações ou produtos que entram em contato com a pele, pois através deles se obtém dados que possibilitam um maior entendimento dos fatos ocorridos, desde a aplicação na pele, liberação do fármaco da forma farmacêutica, retenção e absorção cutânea. (NOKHODCHI et al., 2003). Essa técnica é capaz de avaliar os parâmetros que influenciam desde a liberação do fármaco

no veículo até a difusão nas camadas da pele, quantificando a penetração do ativo e a possibilidade distribuição sistêmica dos mesmos (permeação). No caso de uso de repelentes de insetos, esta técnica pode contribuir para um melhor entendimento do potencial de toxicidade dos produtos que quando em contato com a pele não é desejável que haja absorção cutânea.

Dois parâmetros são fatores críticos para o sucesso do experimento de permeação cutânea, a escolha da membrana que serve de suporte separando o produto a ser testado e do meio receptor responsável por solubilizar o fármaco na concentração utilizada (SHAH et al., 1994).

A pele de porco foi selecionada para esta pesquisa, por ser de fácil aquisição e manipulação, ser histológica e bioquimicamente similar à pele humana, e com características de permeabilidade cutâneas bem próximas a estas (ANDEGA et al., 2001). As fibras elásticas na derme, as enzimas presentes na epiderme, o tempo de *turnover* do tecido epidermal, as proteínas queratínicas e a espessura da epiderme da pele de porco, são características de similaridade à pele humana, havendo diferenças, no entanto, em relação à constituição do tecido gorduroso e na vascularização das glândulas cutânea (OECD, 2004).

A composição do meio receptor deve demonstrar ser capaz de manter a condição *sink*. Quando a concentração do fármaco dissolvido no meio de liberação é menor que 10% da sua concentração saturação (C_s), diz se que o sistema está operando sob condição *sink* (SINKO, 2008). No caso de fármacos lipofílicos, o estudo de solubilidade é uma etapa crucial, já que a solubilidade desses fármacos em soluções aquosas é baixa. A permetrina é um fármaco de alta lipofilicidade, apresentando valor de Log P em torno de 6,00 sendo, portanto, muito pouco solúvel em soluções aquosas.

Para a seleção da solução receptora que solubilizasse totalmente o fármaco na concentração utilizada obedecendo a condição *sink*, foram realizados testes com diversos meios receptores. Na Tabela 8 estão apresentados os dados de concentração

total de permetrina nos tecidos se toda ela fosse solubilizada no volume contido na célula de Franz. Na Tabela 9 estão relacionados os dados de Cs dos meios receptores avaliados. De todos os meios receptores avaliados, apenas 2 obedeciam a condição *sink* ($Ct < 0,1Cs$), o etanol 60% (v/v) e o tween 20 (2%):etanol (60:40, v/v). Como a utilização de soluções hidroalcolica em grau elevado proporciona uma alteração no conteúdo lipídico da pele (BOMMANNAN et al., 1991), o meio receptor escolhido para a realização do teste de permeação cutânea foi tween 20 (2%):etanol (60:40, v/v).

De acordo com o FDA (FDA/CDER, 1997), é permitido o uso de soluções hidroalcolicas como meios receptores para o estudo de liberação *in vitro*, quando o ativo for muito lipossolúvel, como é o caso da permetrina. Além disso, quando o ativo apresenta baixa solubilidade em meio aquoso, pode ser requerido também o uso de tensoativos. Estes compostos têm como função diminuir a tensão interfacial entre o soluto e o solvente em que está contido, já que esses agentes contêm grupos hidrófilos e lipofílicos. O tween 20 é um tensoativo não iônico que apresenta um valor de HLB de 16,7, portanto, com caráter menos hidrofílico (ANSEL et al., 2000). Os tensoativos não-iônicos menos hidrofílicos apresentam um efeito promotor de permeação menos pronunciado do que os com caráter mais hidrofílico (WU et al., 1996). Esse fator é muito importante, pois promotores de permeação podem alterar a composição, as propriedades físico-químicas, a organização lipídica e proteica do estrato córneo, diminuindo assim, a resistência da pele à difusão do fármaco (MARTINS E VEIGA, 2002; CHORILLI, 2007)

Tabela 8. Concentração total de permetrina nos tecidos após total solubilização no volume contido na célula de Franz.

	C. total (µg/mL)
Tecido de Poliéster + NPCa	27,0
Tecido de Algodão + NPCa	35,0
Tecido de Poliéster + Perm.	1,5
Tecido de Algodão + Perm.	4,0

Tabela 9. Estudo da solubilidade da permetrina.

	Cs ($\mu\text{g/mL}$)
Etanol 40%	—
Etanol 60%	2319
PBS 0,2 M pH 7,4	122
PBS 0,2 M pH 7,4:Etanol (50:50) (v/v)	296
Tween 20 (2,5%) + PBS 0,2M pH 7,4 (m/v)	378
Tween 20 (4%)	382
Tween 20 (2%):Etanol (60:40) (v/v)	1046
LSS (0,5%) + PBS 0,2 M pH 7,4 (m/v)	—
LSS (0,5%)	—

Após a escolha do meio receptor, foram conduzidos testes de permeação *in vitro*. Os nanocarreadores escolhidos para realização dos testes de permeação foram apenas os contendo citronela (NPCa). Além das formulações dos nanocarreadores e permetrina livre impregnadas nos 2 tipos de tecidos foram também testadas a suspensão de nanocarreadores e a solução hidroalcoólica de permetrina livre aplicadas diretamente sobre a pele de porco para fins de comparação. Todas as formulações avaliadas não apresentaram quantidades quantificáveis que permeassem através da pele. Os nanocarreadores impregnados no poliéster (P+NPCa) ou aplicados sobre a pele (NPCa) apresentaram valores de concentração abaixo do limite de detecção (LD = 0,30 $\mu\text{g/mL}$) e quantificação (LQ = 0,90 $\mu\text{g/mL}$) após 24 horas de análise. Por sua vez, os nanocarreadores impregnados no algodão (A+NPCa), a permetrina livre impregnada no algodão (A+Perm), poliéster (P+Perm) e aplicada diretamente sobre a pele (Perm) apresentaram valores de concentração abaixo do LQ e acima do LD. As concentrações baixas obtidas estão de acordo com o relatado por Hughes e colaboradores. (2010) que avaliaram a permeação cutânea utilizando pele humana e de rato de uma solução de permetrina em acetona e obtiveram uma absorção dérmica menor que 2 %, detectando a maioria do repelente na pele.

5.4. Avaliação da permanência da permetrina nos tecidos após lavagens

As lavagens para avaliar o tempo de permanência da permetrina foram conduzidas conforme WHO (2005). Os testes foram realizados com os dois nanocarreadores desenvolvidos (NPCa e NPCR), utilizando a permetrina livre como controle, impregnados nos dois tipos de tecidos (algodão e poliéster). Além disso, também foram realizadas as lavagens do tecido obtido pela tecelagem do fio de algodão previamente impregnado com NPCa.

Na Figura 15 e Tabela 10 encontram-se os resultados da comparação do perfil de liberação dos nanocarreadores e permetrina livre impregnadas no algodão (A) e poliéster (P). Através dos resultados do perfil de liberação verificou-se que a suspensão de nanocarreadores lipídicos sem revestimento (NPCa) tanto incorporadas no algodão (Figura 15a e Tabela 10) quanto no poliéster (Figura 15b e Tabela 10) apresentam melhor perfil de liberação após 20 lavagens em relação as outras formulações. Em relação aos perfis de liberação dos nanocarreadores lipídicos revestidos (NPCR) e permetrina livre (Perm), esses apresentaram uma liberação mais rápida da permetrina, mas sustentada por 20 lavagens, e perfis de liberação semelhantes após 5 lavagens quando incorporadas no algodão (Figura 15a e Tabela 10) e perfis de liberação rápido e diferentes quando incorporados no poliéster (Figura 15b e Tabela 10). Quando comparamos o perfil de liberação de ambos os tecidos, verificamos que o algodão apresentou melhor perfil de liberação para todas as formulações, indicando uma melhor adesão das formulações nesse tecido.

Tabela 10. Concentração de permetrina após várias lavagens nos nanocarreadores e permetrina livre incorporadas no algodão e poliéster.

	A+Perm (mg/m²)	A+NPCa (mg/m²)	A+NPCR (mg/m²)	P+Perm (mg/m²)	P+NPCa (mg/m²)	P+NPCR (mg/m²)
0 lavagem	191±18	116±12	63±3	132±4	91±1	37±4
1 lavagem	112±18	75±5	45±4	65±9	54±3	23±1
5 lavagens	36±2	69±8	31±3	4±1	52±4	—
10 lavagens	22±4	51±3	18±1	—	32±3	—
15 lavagens	15±2	36±4	10±1	—	27±7	—
20 lavagens	12±2	34±3	5±1	—	7±2	—

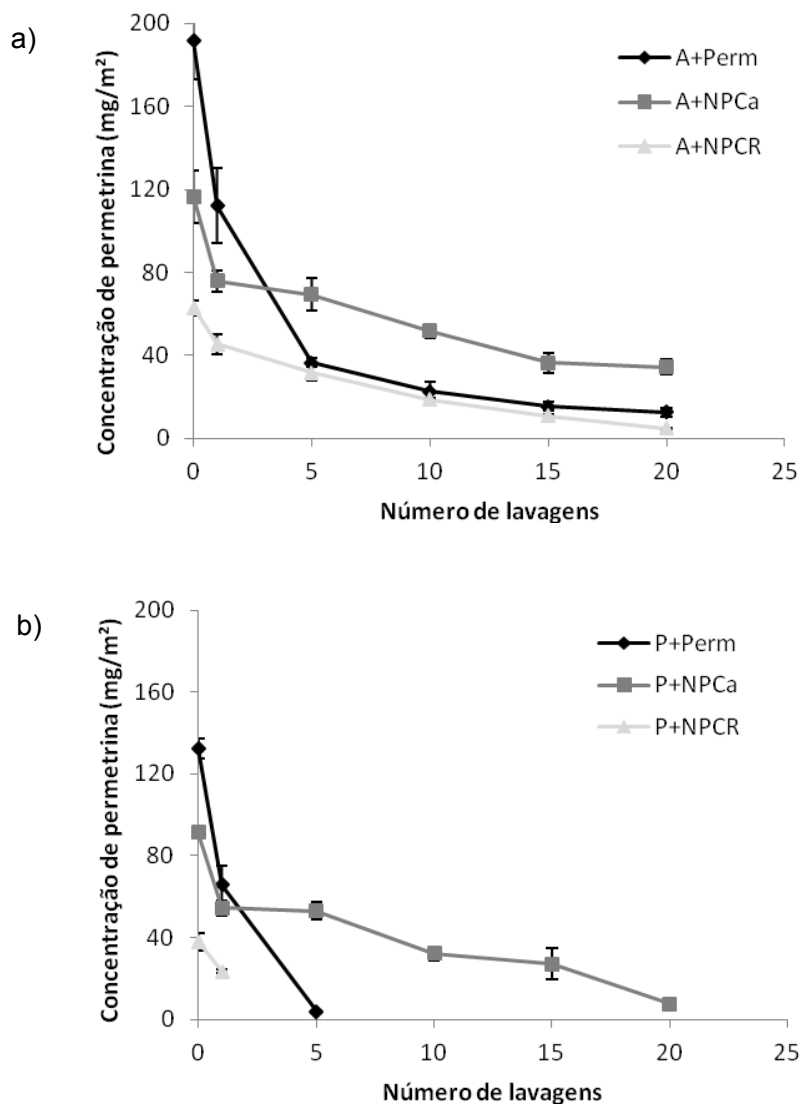


Figura 15. Perfis de liberação de permetrina nos nanocarreadores e permetrina livre incorporados no algodão (a) e poliéster (b).

Foram também efetuadas as comparações das lavagens do tecido de algodão impregnado com NPCa (A+NPCa) e do tecido confeccionado a partir do fio de algodão também impregnado com NPCa (AT+NPCa) (Figura 16 e 17). O tecido confeccionado a partir do fio de algodão apresentou um perfil de liberação mais lento quando comparado com o algodão comercial (Figura 16) (0 lavagem: 231 ± 21 mg/m², 1 lavagem: 168 ± 1 mg/m², 5 lavagens: 130 ± 3 mg/m², 10 lavagens: 119 ± 6 mg/m², 15 lavagens: 101 ± 6 e 20

lavagens: $82 \pm 8 \text{ mg/m}^2$), indicando que é mais vantajoso impregnar primeiramente no fio as formulações de nanocarreadores do que no tecido comercial. Isso ocorre porque o fio fica mais “livre” para interação da formulação com a fibra do tecido o que não ocorre com o tecido comercial devidos as suas tramas firmes. Apesar do tecido confeccionado a partir do fio impregnado (1 lavagem: $73 \pm 7\%$, 5 lavagens: $56 \pm 4\%$, 10 lavagens: $51 \pm 3\%$, 15 lavagens: $44 \pm 6\%$ e 20 lavagens: $36 \pm 1\%$) apresentar um perfil de liberação mais lento e conseqüentemente uma maior quantidade de permetrina do que o tecido comercial (1 lavagem: $66 \pm 10\%$, 5 lavagens: $60 \pm 12\%$, 10 lavagens: $45 \pm 6\%$, 15 lavagens: $31 \pm 7\%$ e 20 lavagens: $29 \pm 6\%$) após as 20 lavagens, o comportamento do perfil quando expresso em porcentagem é igual (Figura 18), não apresentando diferença significativa na porcentagem de permetrina após as 20 lavagens. Demonstrando que não há diferença no perfil de liberação quando é considerado a porcentagem de repelente liberado após as lavagens.

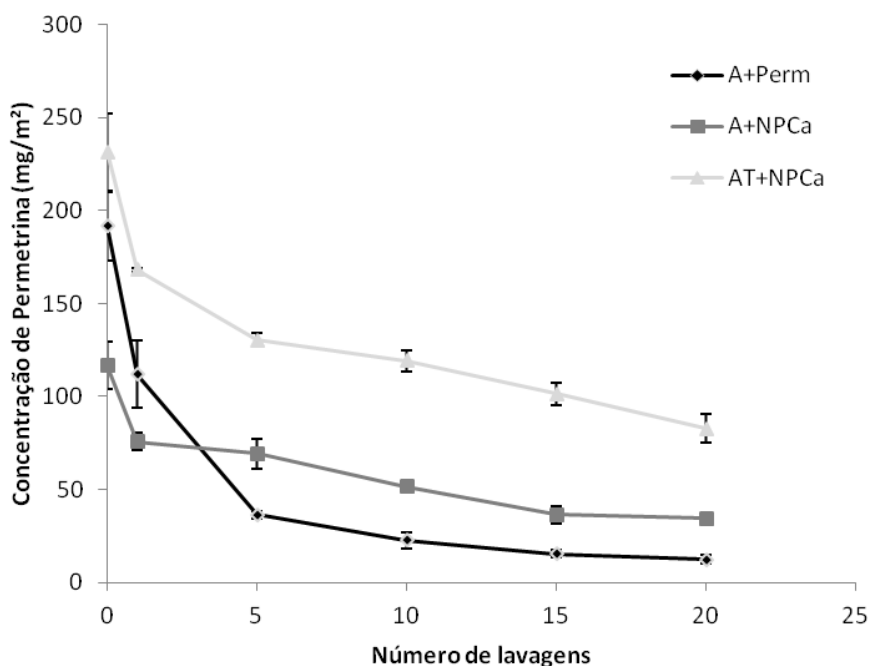


Figura 16. Perfil de liberação de permetrina no tecido contendo os nanocarreadores e no tecido confeccionada a partir do fio impregnado.

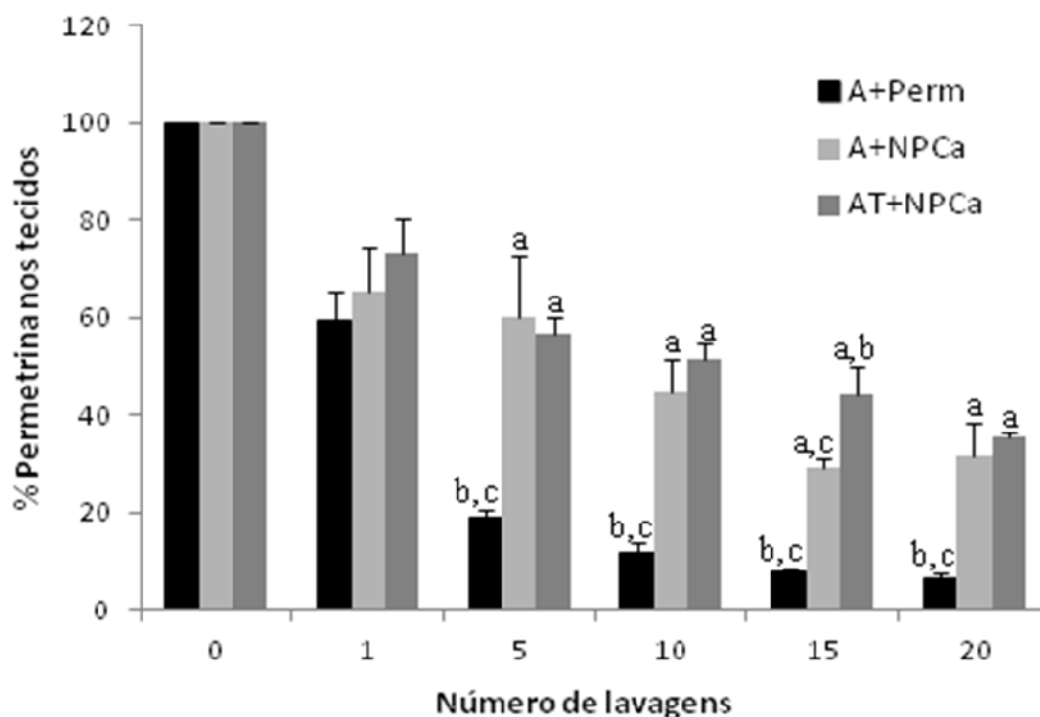


Figura 17. Comparação da permanência de permetrina no tecido contendo os nanocarreadores e no tecido confeccionada a partir do fio impregnado. Os resultados representam a média \pm DP da porcentagem de permetrina. a) A+Perm; b) A+NPCa; c) AT+NPCa.

Os melhores resultados obtidos para os nanocarreadores (NPCa e NPCR) do que para a permetrina livre em relação a permanência após as lavagens nos tecidos, estão de acordo com os trabalhos na literatura no que diz respeito ao tratamento realizado nos tecidos com materiais que proporcionem uma maior adesão no tecido. Faulde e colaboradores (2003 e 2006a,b), comparando a permetrina livre impregnada em tecido e o tecido tratado através do recobrimento com polímero obteve como resultados que o tecido tratado com polímero apresentava um maior porcentagem de permetrina após as lavagens do que o tecido não tratado (permetrina livre). Outro autor utilizando ciclodextrina para fixação da permetrina no tecido também obteve resultado similar, pois a permetrina incorporada na ciclodextrina permaneceu por mais lavagens no tecido do que a permetrina livre (ABDEL-MOHDY et al., 2008).

Todos os resultados demonstram que os nanocarreadores lipídicos contendo citronela sem revestimento catiônico (NPCa) apresentam uma maior adesão para os dois tecidos avaliados. Adicionalmente, a comparação entre os dois tecidos indica que o algodão é mais promissor como suporte para impregnação de nanocarreadores lipídicos contendo repelente de inseto permetrina.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Empregando a técnica de homogeneização a alta pressão foi possível obter formulações nanoestruturadas (NPCa, NPCr) contendo permetrina e um óleo com ação repelente, sendo posteriormente possível o revestimento desses nanocarreadores com polímero (NPCR), obtendo partículas com diâmetros nanométricos, distribuição monomodal e boa estabilidade física após 30 dias da preparação.

Dos testes realizados para escolha do óleo com ação repelente, o óleo de citronela foi o que se apresentou mais adequado para a incorporação nos nanocarreadores.

As formulações foram impregnadas com sucesso em tecidos de algodão ou poliéster, apresentando variação na quantidade de permetrina impregnada nos diferentes tecidos utilizados. O tecido que apresentou maior quantidade de permetrina impregnada foi o algodão. Adicionalmente, a impregnação das nanopartículas (NPCa) no tecido de algodão foi também comparada com a impregnação prévia da nanopartículas (NPCa) em fio de algodão posteriormente tecido. Em relação a essa comparação, o tecido confeccionado a partir do fio impregnado apresentou um perfil de liberação de permetrina semelhante ao tecido de algodão já impregnado. Desta forma, os nanocarreadores lipídicos contendo permetrina sem revestimento (NPCa) demonstraram possuir uma maior adesão às fibras de algodão, tanto para algodão comercial quanto para o fio de algodão tecido, proporcionando uma maior permanência desses nos dois tipos de impregnação testadas para o algodão.

Os nanocarreadores impregnados nos tecidos não apresentaram absorção através da pele, demonstrando serem seguros quando em contato com a pele.

Em resumo, foi possível desenvolver e impregnar com sucesso nanocarreadores lipídicos contendo repelente de insetos, que apresentaram uma excelente resistência às lavagens, demonstrando possuir potencial como uma nova estratégia para ação de repelente de insetos. Desta forma, esses resultados promissores abrem várias

possibilidades de trabalhos posteriores, como por exemplo, desenvolvimento de nanopartículas poliméricas e avaliação biológicas desses nanocarreadores utilizando insetos vetores.

7. REFERÊNCIAS

ABDEL-MOHDY, F.A.; FOU DA, M.M.G.; REHAN, M.F.; ALY, A.S. Repellency of controlled-release treated cotton fabrics based on cypermethrin and prallethrin. **Carbohydrate Polymers**, v.73, p.92–97, 2008.

ABDEL-MOHDY, F.A.; FOU DA, M.M.G.; REHAN, M.F.; ALY, A.S. Repellency of controlled-release treated-cotton fabrics based on permethrin and bioallethrin against mosquitoes. **Journal of the Textile Institute**, v.100, n.8, 2009.

AHSAN, F.; RIVAS, I.P.; KHAN, M.A.; TORRES SUAREZ, A.I. Targeting to macrophages: role of physicochemical properties of particulate carriers - liposomes and microspheres - on the phagocytosis by macrophages. **Journal. Controlled Release**, v.79, p.29-40, 2002.

ALCÂNTARA, M.R., DAL TIN, D. A química do processamento têxtil. **Química Nova**, v.19, n.3, 1996.

AMALRAJ, D. D.; KALYANASUNDARAM, M.; VISWANATHAN, S.; DAS, P. K. Insecticide impregnated cotton fabrics of different hydrophobicity against *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae). **Southeast Asian journal of tropical medicine and public health**, v.27, n.3, p.617-621, 1996.

AMER, A.; MEHLHORN, H. Repellency effect of forty-one essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* mosquitoes. **Parasitology Research**, v.99, p.478-490, 2006.

ANDEGA, S.; KANIKKANNAN, N.; SINGH, M. Comparison of the fatty alcohols on the permeation of melatonin between porcine and human skin. **Journal of Controlled Release**, v.77, n. 1, p.17-25, 2001.

ANJALI, C.H.; KHAN, S.S.; MARGULIS-GOSHEN, K.; MAGDASSI, S.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Formulation of water-dispersible nanopermethrin for larvicidal applications. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.73, p.1932–1936, 2010.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. A. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 6. ed. São Paulo: Ed. Premier, p. 244-245; 398-400, 2000.

APPEL, K.E.; GUNDERT-REMY, U.; FISCHER, H.; FAULDE, M.; MROSS, K.G.; LETZEL, S.; ROSSBACH, B. Risk assessment of Bundeswehr (German Federal Armed Forces) permethrin-impregnated battle dress uniforms (BDU). **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v.211, p.88–104, 2008.

ASILLIAN, A.; SADEGHNIA, A.; SHARIATI, F.; IMAN JOME, M.; GHODDUSI, A. Efficacy of Permethrin-Impregnated Uniforms in the Prevention of Cutaneous

Leishmaniasis in Iranian Soldiers. **Iranian Journal of Medical Sciences**, v.27, n.4, p.172-175, 2002.

ASNAWI, S.; AZIZ, A.A.; AZIZ, R.A. Effect of Variable Solvents on Particle Size of Geranium Oil-Loaded Solid Lipid Nanoparticle (Ge-SLN) For Mosquito Repellent Applications. **Nanoscience and nanotechnology**, v.1136, p.6-10, 2009.

ASSUMPTÃO, R.T.M.D.; MACHADO, C.A.S.F. Uso dermatológico da fosfatidilcolina. **Arquivos Médicos do ABC**, v.31, n.1, p.41-45, 2005.

BARNARD DR, XUE RD: Laboratory evaluation of mosquito repellents against *Aedes albopictus*, *Culex nigripalpus*, and *Ochierotatus triseriatus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v.41, p.726-730, 2004.

BEYOND, Pesticides. Permethrin - chemicalWATCH Factsheet, 2004. Disponível em: <http://www.beyondpesticides.org/pesticides/factsheets/permethrin.pdf>. Acesso em: Janeiro de 2012.

BOMMANNAN, D.; POTTS, R.O.; GUY, R.H. Examination of the effect of ethanol on human stratum corneum in vivo using infrared spectroscopy. **Journal Controlled Released**, v.16, p. 299-304, 1991.

BROWN, M.; HEBERT, A. Insect repellents: an overview. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 36, p.243-9, 1997.

BUENO, V.S.1; ANDRADE, C.F.S. Avaliação preliminar de óleos essenciais de plantas como repelentes para *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n.2, p.215-219, 2010.

BUNJES, H., STEINIGER, F. AND RICHTER, W. Visualizing the structure of triglyceride nanoparticles in different crystal modifications. **Langmuir**, v.23, p.4005–4011, 2007.

BURFIELD, T.; REEKIE, S.L. Mosquitoes, malaria and essential oils. **The International Journal of Aromatherapy**, v.15, p.30–41, 2005.

CANTALAMESSA, F. Acute toxicity of two pyrethroids, permethrin, and cypermethrin in neonatal and adult rats. **Archives of toxicology**, v.67, n.7, p.510-513, 1993.

CATMAT (Committee to Advise on Tropical Medicine and Travel). Statement on personal protective measures to prevent arthropod bites. **Canada Communicable Disease Report**, v.31, p.1-18, 2005.

CHEN, J.; DAVIS, S. S. The release of butyrate hydroxyvalerate microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v. 19 n. 2, p. 191-201, 2002.

CHIO, E.H.; YANG, E. A bioassay for natural insect repellents. **Journal of Assia Pacific Entomology**, v.11, p.225-227, 2008.

CHORILLI M, BRIZANTE AC, RODRIGUES CA, SALGADO HRN. Aspectos gerais em sistemas transdérmicos de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 88, n.1, p.7-13, 2007.

COLLINS, F.H.; PASKEWITZ, S.M. Malaria: Current and Future Prospects for Control. **Annual Review of Entomology**, v.40, p.195-219, 1995.

COLOME, L. M. ; RAFFIN, R. P.; ASSUMPCAO, E. R. ;POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Theospheres Based on Theobroma Grandiflorum Seed Butter: Development of Innovative Nanoparticles for Skin Application. **Soft Materials**, v. 8, p. 72-88, 2010.

COMMITTEE to Advise on Tropical Medicine and Travel (CATMAT). Statement on personal protective measures to prevent arthropod bites. **Canada communicable disease report**, v.31, p.1-18; 2005.

COSTA, P.R.N.; Rossi, L.F.S.; ZAGONEL, G.F.; RAMOS, L.P. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. **Química nova**, v. 23, n. 4, p. 531-537, 2000.

DALTIMORE QUÍMICA. DC[®] C2-0563. Disponível em: <http://www.daltomare.com.br/index.php?menu=11&id=436>. Acesso em: Maio de 2010.

DE PAULA, J.P.; GOMES-CAREIRO, M.R.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Chemical composition, toxicity and mosquito repellency of Ocimum selloi oil. **Journal of Ethnopharmacology**. v.88, p.253–60, 2003.

DEDAVID, B.A.; GOMES, C.I.; MACHADO, G. Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras. Porto Alegre, **EdiPUCRS**, 2007.

DOGAN, E.B.; AYRES, J.W.; ROSSIGNOL, P.A. Behavioral mode of action of DEET: inhibition of lactic acid attraction. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 13, p. 97-100, 1999.

EDWARDS, D.P.; FORD, M.G. Separation and analysis of the diastereomers and enantiomers of cypermethrin and related compounds. **Journal of Cromatography**, v.777, p.363-369, 1997.

FAO. Flavours and Fragrances of Plant Origin, 1995. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/V5350E/V5350E00.htm>. Acesso em: 5 janeiro 2012.

FAULDE, M.K.; UEDELHOVEN, W.M. A new clothing impregnation method for personal protection against ticks and biting insects. **Journal of Medical Microbiology**, v.296, p.225–229, 2006a.

FAULDE, M.K.; UEDELHOVEN, W.M.; ROBBINS, R.G. Contact toxicity and residual activity of different permethrin-based fabric impregnation methods for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae), and *Lepisma saccharina* (Thysanura: Lepismatidae). **Journal of Medical Entomology**, v.40, p.935-941, 2003.

FAULDE, M.K.; ALBIEZ, G.; NEHRING, O. Insectidal, acaricidal and repellent effects of DDET and IR3535 impregnated bed nets using a novel long-lasting polymer-coating technique. **Parasitology Research**, v.106, p.957-965, 2010.

FAULDE, M.K.; UEDELHOVEN, W.M.; MALERIUSL, M.; ROBBINS,R.G. Factory-Based Permethrin Impregnation of Uniforms: Residual Activity against *Aedes aegypti* and *Ixodes ricinus* in Battle Dress Uniforms Worn under field Conditions, and Cross-Contamination during :he Laundering and Storage Process. **Military medicine**, v.171, n.6, p472-77, 2006b.

FDA/CDER Department of health and human Services. Food and drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for industry: nonsterile semisolid dosage forms: scale-up and post approval changes: chemistry, manufacturing, and controls; *in vitro* release testing and *in vivo* bioequivalence documentation. 1997.

FRADIN, M. S. Mosquitoes and mosquito repellents: a clinician`s guide. **Annals of. Internal. Medicine**, v.128, p. 931-940, 1998.

FRADIN, M.S.; DAY, J.F. Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites. **New England Journal of Medicine**, v. 347, n.1, p.13-8, 2002.

FRANCES, S.P. Effectiveness of DEET and permethrn alone, and in a soap formulation as skin and clothing protectants against mosquitoes in Australia. **Journal of the American Mosquito Control**, v.9, n.4, p.474-76, 1987.

FRANZ, T.J.; LEHMAN, P.A.; FRANZ, S.F.; GUIN, J.D. Comparative percutaneous absorption of lindane and permethrin. **Archives Dermatology**, v.132, p.901-905, 1996.

FRONZA, T.; CAMPOS, A.; TEIXEIRA, H. Nanoemulsões como sistemas de liberação para fármacos oftálmicos. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 23, n. 4, p. 558-66, 2004.

GARCÍA, E.; GARCÍA, A.; BARBAS, C. Validated HPLC method for quantifying permethrin in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 999–1004, 2001.

GUESSAN, R.N.; KNOLS, B.G.J.; PENNETIER, C.; ROWLAND, M. DEET microencapsulation: a slow-release formulation enhancing the residual efficacy of bed nets against malaria vectors. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.102, p.259 - 262, 2008.

GUPTA, R.K.; RUTLEDGE, L.C.; REIFERANTH, W.R.; GUTIERREZ, G.A.; KORTE, D.W. JR. Resistance of permethrin to weathering in fabrics treated for protection against mosquitoes (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v.27, n.4, p.494-500, 1990.

GUPTA, R.K.; RUTLEDGE, L.C.; REIFERANTH, W.R.; GUTIERREZ, G.A.; KORTE, D.W. JR. Effects of weathering on fabrics treated with permethrin for protection against mosquitoes. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.5, n.2, p.176-9, 1989.

HEAL, J.D.; SURGEONER, G.A.; LINDSAY, L.R. Permethrin as a tent treatment for protection against field populations of Aedes mosquitoes. **American Mosquito Control Association**, v.11, n.1, p.99-102, 1995.

HEBEISH, A.; FOUUDA, M.M.G.; HAMDY, I.A.; EL-SAWY, S.M.; ABDEL-MOHDY, F.A. Preparation of durable insect repellent cotton fabric: Limonene as insecticide. **Carbohydrate Polymers**, v.74, p.268–273, 2008.

HEBEISH, A.; HAMDY, I.A.; EL-SAWY, S.M.; ABDEL-MOHDY, F.A. Preparation of durable insect repellent cotton fabric through treatment with a finishing formulation containing cypermethrin. **Journal of the Textile Institute**, v.101, n.7, 2010.

HUGHES, M.F.; EDWARDS, B.C. In vitro dermal absorption of pyrethroid pesticides in human and rat skin. **Toxicology and applied pharmacology**, v.246, p.29-37, 2010.

IBRAHIM, M.A.; KAINULINEM, P.; AFLATUNI, A.; TIILIKKALA, K.; HOLOPAINEN, J.K. Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils with special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. **Agricultural and foods science in Finland**, v.10, p.243-59, 2001.

IBRAHIM, M.A.; KAINULINEM, P.; AFLATUNI, A.; TIILIKKALA, K.; HOLOPAINEN, J.K. Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: with special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. **Agricultural and Foods Science in Finland**, v.10, p.243-59, 2001.

ISCAN, Y.; HEKIMOGLU, S.; SARGON, M.F.; HINCAL, A.A. DEET-loaded solid lipid particles for skin delivery: In vitro release and skin permeation characteristics in different vehicles. **Journal of microencapsulation**, v. 23, n. 3, p. 315-327, 2006.

JÄGER, E.; VENTURINI, C.G.; POLETTO, F.S.; COLOMÉ, L.M.; POHLMANN, J.P.U.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A.M.O.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Sustained Release from Lipid-Core Nanocapsules by Varying the Core Viscosity and the Particle Surface Area. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, p.130–140, 2009.

KASTING, G.B.; BHATT, V.D.; SPEAKER, T.J. Microencapsulation decreases the skin absorption of N,N-diethyl-m-toluamide (DEET). **Toxicology in Vitro**, v. 22, p.548–552, 2008.

KATZ, T.M.; MILLER, J.H.; HEBERT, A.A. Insect repellents: Historical perspectives and new developments. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.58, n.5, p.865-71, 2008.

KIM, J.; KANG, C.; LEE, J.; KIM, Y. HAN, H.; YUN, H. Evaluation of Repellency Effect of Two Natural Aroma Mosquito Repellent Compounds, Citronella and Citronellal. **Entomological research**, v.35, n. 2, p.117-120, 2005.

KIMANI, E.W.; VULULE, J.M.; KURIA, I.W.; MUGISH, F. Use of insecticide-treated clothes for personal protection against malaria: a community trial. **Malaria Journal**, v.5, n.63, p.1-9, 2006.

LASIC, D.D. Novel application of liposomes. **Trends Biotechnology**, v.16, p.307-321, 1998.

LEE, W.; HOE-SUN LEE, Y.A.; DONG-KYU LEE. Laboratory Evaluation of Controlled-release Repellent Treated Pulp Fabric on Human Volunteers against Mosquito vectors. **Entomological research**, v.34, n.1, p.37-42, 2004.

LENGELER, C.; SMITH, T.A. Focus on the effect of bednets on malaria morbidity and mortality. **Parasitology today**, v.13, n.3, p.123-124, 1997.

MAGDASSI, S.; BACH, U.; MUMCUOGLU, K.Y. Formation of positively charged microcapsules based on chitosan-lecithin interactions. **Journal of Microencapsulation**, v.14, n.2, p.189-195, 1997.

MAIA, C.S.; PARENTE, W.C. Citronela, aliada natural para repelir pernilongos. **Norte Científico**, v.3, n.1, 2008.

MAJI, T.K.; BARUAH, I.; DUBE, S.; HUSSAIN, M.R. Microencapsulation of *Zanthoxylum limonella* oil (ZLO) in glutaraldehyde crosslinked gelatin for mosquito repellent application. **Bioresource Technology**, v. 98, p.840–844, 2007.

MARKARIAN, H.; PRATT JR, J.J.; DEMARCO, C.G.; GOUCK, H.K. The compatibility of arthropod repellents with certain functional finishes of cotton: uniform fabric. **Journal of Economic Entomology**, v.61, n.2, p.464-67, 1968.

MARSHALONIS, D.; KNOWLTON, R.E.;MERCHANT, H. Acute Toxicity of Permethrin to Four Populations of Ovigerous Grass Shrimp, *Palaemonetes pugio* Holthuis. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v.77, n.4, p.543-550, 2006.

MARTINS, M.R.F.M; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. Portugal, v. 38, n. 1, p. 33-54, 2002.

MEHNERT, W.; MÄDER, K.; Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, n. 47, p. 165-196, 2001.

MIOT, H.A., FERREIRA, D.P., MENDES, F.G., FLÁVIA ROBERTA HERNANDES CARRENHO, F.H., AMUI, I.O., CARNEIRO, C.S., MADEIRA, N.G. Efficacy of topical permethrin as repellent against *Aedes aegyptis* bites. **Dermatology Online Journal**, v. 14, n.7, 2008.

MIRÓ SPECOS, M.M.; GARCÍA, J.J.; TORNESELLO, J.; MARINO, P.; DELLA VECCHIA, M.; DEFAIN TESORIERO, M.V.; HERMIDA, L.G. Microencapsulated citronella oil for mosquito repellent finishing of cotton textiles. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** , v.104, p. 653–658, 2010.

MOREIRA, M.D.; PICANÇO, M.C.; SILVA, E.M.; MORENO, S.C.; MARTINS, J.C. Uso de inseticidas botânicos no controle de pragas. Disponível em: <http://xa.yimg.com/kq/groups/25029988/865598723/name/Capitulo+livro+Controle+Alternativo%5B1%5D.pdf>. Acesso em: Fevereiro de 2012.

MÜLLER, R. H.; PETERSEN, R. D.; HOMMOSS, A.; PARDEIKE, J. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 6, p. 522-530, 2007.

MÜLLER, R. H.; Solid lipid nanoparticle (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, n. 50, p. 161-177, 2000.

MULLER, R.H. AND DINGLER, A. The next generation after the liposomes: solid lipid nanoparticles (SLN, Lipopearls_) as dermal carrier in cosmetics. **Eurocosmetics**, v.8, p.18–26, 1998.

MÜLLER, R.H.; RADTKE, M; WISSING, S.A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and Nanostructured lipid carriers (NLC). **Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 10, p. 43-56, 2004.

MÜLLER, R.H.; RADTKE, M; WISSING, S.A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 1, p. 131–155, 2002.

MÜLLER-GOYMAN, C.C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles topical administration. **European Journal of Pharmaceuticals Biopharmaceuticals**, v. 58, p. 343-346, 2004.

MUSTAPHA, D.; STEPHEN, P.F.; STRICKMAN, D. Insect repellent: Principles, Methods, and use, New York, **Taylor & Francis Group**, 2008.

NOKHODCHI, A.; SHOKRI, J.; DASHBOLAGHI, A.; HASSAN-ZADEH, D.; GHAFOURIAN, T.; BARZEGAR-JALALI, M. The enhancement effect of surfactants on the penetration of lorazepam through rat skin. **International Journal of Pharmaceutics**. Iran, v. 250, n 2, p. 359-369, 2003.

NUCHUCHUA, O.; SAKULKU, U.; UAWONGYART, N.; PUTTIPIPATKAHACHORN, S.; SOOTTITANTAWAT, A.; RUKTANONCHAI, U. In vitro characterization and mosquito (*Aedes aegypti*) repellent activity of essential-oils-loaded nanoemulsions. **AAPS PharmSciTech**, v.10, n.4, p.1234-42, 2009.

OECD-ENVIRONMENT DIRECTORATE, JOINT MEETING OF THE CHEMICALS COMMITTEE AND THE WORKING PARTY ON CHEMICALS, PESTICIDES AND BIOTECHNOLOGY. Guidance for the conduct of skin absorption studies, OECD series on testing and assessment. n. 28, 2004.

OLIVEIRA, B.R. Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões com óleos de *Carapa guianensis* e *Copaifera sp.* e estudo de ação repelente frente a *Aedes aegypti*. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2008.

PHASOMKUSOLSIS, S.; SOONWERA, M. Insect repellent activity of medical plant oils against *Aedes aegypti* (linn.), *Anopheles minimus* (theobald) and *Culex quinquefasciatus* say based on protection time and biting rate. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health**, v.41, n.4, 2010.

PILLAI, O.; PANCHAGNULA, R. Polymers in drug delivery. **Chemical Biology**, v.5, p.448, 2000.

RAHULA, O. B. et al. Varietal compositions in the constituents of citronella oil. **Phytochemistry**, v. 12, n. 11, p. 2697-2704, 1973. citado em: AGNOLIN, C.A. ÓLEO DE CITRONELA NO CONTROLE DE ECTOPARASITAS DE BOVINOS. **Dissertação** (mestrado em Zootecnia)- Programa de Pós-graduação em Zootecnia, UFSM, 2009.

RAJAKUMAR, G.; RAHUMAN, A.A. Larvicidal activity of synthesized silver Nanoparticles using *Eclipta prostrata* leaf extract against filariasis and malaria vectors. **Acta Tropica**, v.118, p.196–203, 2011.

REYBURN, H.; ASHFORD, R.; MOHSEN, M.; HEWITT, S.; ROWLAND, M. A randomized controlled trial of insecticide-treated bednets and chaddars or top sheets, and residual spraying of interior rooms for the prevention of cutaneous leishmaniasis in Kabul, Afghanistan. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, v. 94, p.361-366, 2000.

RICHARDS, F.O.; FLORES, R.Z.; SEXTON, J.D.; BEACH, R.F.; MOUNT, D.L.; CORDON-ROSALES, C.; GATICA, M.; KLEIN, R.E. Efectos de los mosquiteros impregnados con permetrina sobre los vectores de la malaria en el norte de Guatemala. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v.117, n.1, p.1-11, 1994.

ROGEZ, H.; BUXANT, R.; MIGNOLET, E.; SOUZA, J.N.S.; SILVA, E.M.; LARONDELLE, Y. Chemical composition of pulp of three typical Amazonian fruits: araçá-boi (*Eugenia stipitata*), bacuri (*Platonia insignis*) and cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). **European Food Research and Technology**, v. 218, n. 4, p. 380-384, 2004.

ROMI, R.; NOSTRO, P.L.; BOCCI, E.; RIDI, F.; BAGLIONI, P. Bioengineering of a Cellulosic Fabric for Insecticide Delivery via Grafted Cyclodextrin. **Biotechnology Progress**, v.21, n.6, p.1724-1730, 2005.

ROSSBACH, B.; APPEL, K.E.; MROSS, K.G.; LETZEL, S. Uptake of permethrin from impregnated clothing. **Toxicology letters**, v.192,p.50–55, 2010.

ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. Identification and Quantification of Carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 5062-5072, 2007.

SAKULKU, U.; NUCHUCHUA, O.; UAWONGYART, N.; PUTTIPIPATHKACHORN, S.; SOOTTITANTAWAT, A.; RUKTANONCHAI, U. Characterization and mosquito repellent activity of citronella oil nanoemulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 372, p.105–111, 2009.

SALAMANCA-BUENTELLO, F.; PERSAD, D.L.; COURT, E.B.; MARTIN, D.K.; DAAR, A.S.; SINGER, P.A. Nanotechnology and the developing world. **PLoS Medicine**, v.2, n.5, 2005.

SANTOS, J.B.; SANTOS, F.; MARSDEN, P.; TOSTA, C.E.; ANDRADE, A.L.S.S.; MACÊDO, V. Ação de mosquiteiros impregnados com deltametrina sobre a morbidade da malária em uma área da Amazônia Brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.31, n.1, p.1-9, 1998.

SCHÄFER-KORTING, M.; MEHNERT, W.; KORTING, H. C.; Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs or skin diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 6, p. 427-433, 2007.

SCHAFFAZICK, S.R.; FREITAS, L.L.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHRECK, C.E.; HAILE, D.G.; KLINE, D.L. The effectiveness of permethrin and DEET, alone or in combination, for protection against *Aedes taeniorhynchus*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 33, p.725-30, 1984.

SCHRECK, C.E.; LEONHARDT, B.A. Efficacy assessment of Quwenling, a mosquito repellent from China. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 7, n.3, p.433-6, 1991.

SCHAFFER, C. Nanomedicine transforms drug delivery. **Drug Discovery Today**, v.10, n.23-24, p.1581-1582, 2005.

SHAH, V.P.; ELKINS, J.S.; WILLIAMS, R.L. Evaluation of the test system used for *in vitro* release of drugs from topical dermatological drug products. **Pharmaceutical development and technology**, p.377-85, 1994.

SHARMA, V.P.; ANSARI, M.A.; RAZDAN, R.K. Mosquito repellent action of neem (*Azadirachta indica*) oil. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.9, p.359-360, 1993.

SILVA, G.A. Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. **Surgical Neurology**, v.61, p.216-220, 2004.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/ Florianópolis: ed. UFRGS/ ed. UFSC, 1999.

SINKO, P.J.M. Físico-Farmácia e ciências farmacêuticas. 5 ed, Porto Alegre, **Artmed**, 2008.

SIS (Sistema de Inteligência setorial), 2012. NANOTECNOLOGIA ABRE NOVAS PORTAS PARA O VESTUÁRIO. Disponível em: http://textileindustry.ning.com/forum/topics/apostila-nanotecnologia-abre-novas-portas-para-o-vestuario?xg_source=activity. Acesso em: janeiro de 2012.

SMITH, C. N. Personal protection from blood-sucking arthropods. **Journal of the American Medical Association**, v. 196, p. 236-39, 1966.

SODERLUND, D.M.; CLARK, J.M.; SHEETS, L.P.; MULLIN, L.S.; PICCIRILLO, V.J.; SARGENT, D.; STEVENS, J.T.; WEINER, M.L. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. **Toxicology**, v.171, p.3–59, 2002.

SOLOMON, B.; SAHLE, F.F.; GEBRE-MARIAM, T.; ASRES, K.; NEUBERT, R.H.H. Microencapsulation of citronella oil for mosquito-repellent application: Formulation and in vitro permeation studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.80, p.61–66, 2012.

SORGE, F.; IMBERT, P.; LAURENT, C.; MINODIER, P.; BANERJEE, A.; KHELFAOUI, F. et al. Children arthropod bites protective measures: insecticides and repellents. **Archives of Pediatrics**, v.14, p.1442-50, 2007.

SOUTO, E.B., WISSING, S.A., BARBOSA, C.M. AND MULLER, R.H. Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p.71–77, 2004.

SOUTO, E.B.; ALMEIDA, A.J.; MÜLLER, R.H. Lipid nanoparticles (SLN[®], NLC[®]) for cutaneous drug delivery: Structure, protection and skin effects. **Journal Biomedical nanotechnology**, v. 3, p. 1-15, 2007.

STECOVÁ, J.; MEHNERT, W.; BLASCHKE, T.; KLEUSER, B.; SIVARAMAKRISHAN, R.; ZOUBOULIS, C.; SELTMANN, H.; KORTING, H. C.; KRAMER, K. D.; SCHÄFER-KORTING, M. Cyproterone acetate loading to lipid nanoparticle for topical acne treatment: Particle characterisation and skin uptake. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 5, p.991-10000, 2007.

STEFANI, G.P.; PASTORINO, A.C.; CASTRO, A.B.M.; FOMIN, A.B.F.; JACOB, C.M.A. Repelentes de insetos: recomendações para uso em crianças. **Revista Paulista de Pediatria**, v.27, n.1, p.81-9, 2009.

SUKUMAR, K.; PERICH, M. & BOOBAR, L. L. Botanical Derivatives in Mosquito Control: A Review. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 7, p 210-237, 1991.

TAWATSIN, A.; WRATTEN, S.D.; SCOTT, R.R., THAVARA, U.; TECHADAMRONGSIN, Y. Repellency of volatile oils from plants against three mosquito vectors. **Journal of Vector Ecology**, v. 26, n.1, p.76-82, 2001.

THAVARA, U.; TAWATSIN, A.; CHOMPOOSRI, J.; SUWONKERD, W.; CHASANG, U.R.; ASAVADACHANUKORN, P. Laboratory and field evaluations of the insect repellent 3535 (ethyl butylacetylaminopropionate) and DEET against mosquito vectors in Thailand. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.17, n.3, p.190-195, 2001.

TRABOULSI, A.F.; EL-HAJ, S.; TUENI, M.; TAOUBI, K.; NADER, N.A.; MRAD, A. Repellency and toxicity of aromatic plant extracts against the mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae). **Pest Management Science**, v.61, p.597-604, 2005.

TRONGTOKIT Y, RONGSRIYAM Y, KOMALAMISRA N, APIWATHNASORN C. Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. **Phytotherapy Research**, v. 19, p.303-309, 2005.

ÜNER, M. Preparation, characterization and physico-chemical properties of Solid lipid nanoparticles (SLN) and Nanostructured lipid carriers (NLC): Their benefits as colloidal drug carrier systems. **Pharmazie**, v. 61, n. 5, p. 375-386, 2006.

VERMA, R.K.; GARG, S. Current status of drug delivery technologies and future directions. **Pharmaceutical Technology**, v.25, n.2, p.1-4, 2001.

WHO (World Health Organization), 2005. Guidelines for laboratory and field testing of long lasting insecticidal mosquito nets. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/hq/2005/WHO_CDs_WHOPEs_GCDPP_2005.11.pdf. Acesso em: Janeiro de 2011.

WHO (World Health Organization). **Fact sheets**, 2011a. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/index.html>. Acesso em: 15 dez. de 2011.

WHO (World Health Organization). International travel and health 2011, 2011b. Disponível em : <http://www.who.int/ith/en/>. Acesso em: 15 dez. de 2011.

WHO, 2001a. Vectors of diseases: hazards and risks for travellers – Part I. **WER 25**, p.189–194.

WHO, 2001b. Vectors of diseases: hazards and risks for travellers – Part II. **WER 26**, p.201–203.

WISSING, S. A.; MÜLLER, R. H. Cosmetic application for solid lipid nanoparticles (SLN[®]). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 254, p.65-68, 2003.

WISSING, S. A.; MÜLLER, R. H.; MANTHEI, L.; MAYER, C. Structural characterization of Q10-loaded solid lipid nanoparticles by NMR spectroscopy. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 3, p. 400-405, 2004.

WISSING, S.; LIPPACHER, A.; MULLER, R. Investigations on the occlusive properties of solid lipid nanoparticles (SLN). **Journal of Cosmetics Science**, v.52, p.313-324, 2001.

WRIGHT, D.W., HARDIN, B.D., GOAD, P.W., CHRISLIP, D.W. Reproductive and developmental toxicity of N, N-diethyl-n-toluamide in rats. **Fundamental and Applied Toxicology**. v. 19, p.33–42. 1992.

WU, P. C.; HUANG, Y. B.; LIN, H. H.; TSAI, Y. H. In vitro percutaneous absorption of captopril through excised rabbit skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 1, n. 143, p. 119-123, 1996.

YANG, P.; MA Y.; ZHENG, S. Adulticidal Activity of Five Essential Oils against *Culex pipiens quinquefasciatus*. **Journal of Pesticide Science**, v.30, n.2, p.84–89, 2005.

ZIELINSKI-GUTIERREZ, E.; WIRTZ, R.A.; NASCI, R.S.; BROGDON. W.G. Protection against Mosquitoes, ticks, others insects and arthropods, 2011. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2012/chapter-2-the-pre-travel-consultation/protection-against-mosquitoes-ticks-and-other-insects-and-arthropods.htm>. Acesso em: Dezembro 2011.

ZUR MÜHLEN, A.; SCHWARZ, C.; MEHNERT, W. Solid lipid nanoparticles for controlled drug delivery – Drug release and release mechanism. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, n. 45, p.149-155, 1998.