

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 01/03/2020.



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO em

Ciências Ambientais

VANESSA REGINA MIRANDA

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA CONTENDO
REPELENTES VISANDO CONTROLE DO MOSQUITO *Aedes Aegypti***

Sorocaba

2019

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO em

*ciências
ambientais*



unesp
Sorocaba

VANESSA REGINA MIRANDA

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA CONTENDO
REPELENTES VISANDO CONTROLE DO MOSQUITO *Aedes Aegypti***

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” na Área de Concentração Diagnóstico, Tratamento e Recuperação Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto

Sorocaba

2019

M672d	Miranda, Vanessa Regina Desenvolvimento de nanopartículas de zeína contendo repelentes visando controle do mosquito <i>Aedes Aegypti</i> / Vanessa Regina Miranda. -- Sorocaba, 2019 94 f. : il., tabs. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, Sorocaba Orientador: Leonardo Fernandes Fraceto 1. Nanotecnologia. 2. Nanopartículas - zeína. 3. <i>Aedes aegypti</i>. 4. Repelentes - Liberação lenta. 5. Icaridina; Geraniol. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Ciência e Tecnologia, Sorocaba. Dados fornecidos pelo autor(a).



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Sorocaba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Desenvolvimento de Nanopartículas de zeína contendo repelentes visando controle do mosquito Aedes Aegypti

AUTORA: VANESSA REGINA MIRANDA

ORIENTADOR: LEONARDO FERNANDES FRACETO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS AMBIENTAIS, área: Diagnóstico, Tratamento e Recuperação Ambiental pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. LEONARDO FERNANDES FRACETO
Engenharia Ambiental / UNESP - ICT Sorocaba

Prof. Dr. GERSON ARAÚJO DE MEDEIROS
Departamento de Engenharia Ambiental / Unesp - ICT Sorocaba

Prof.ª. Dr.ª. ESTEFÂNIA VANGELIE RAMOS CAMPOS
Universidade Federal do ABC

Sorocaba, 01 de março de 2019

BANCA EXAMINADORA

Prof Dr Leonardo Fernandes Fraceto (Orientador)

Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais

UNESP – Universidade Estadual Paulista - Sorocaba

Prof Dr Gerson Araújo de Medeiros (Titular)

Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais

UNESP – Universidade Estadual Paulista – Sorocaba

Dra Estefânia V. Ramos Campos (Titular)

UFABC – Universidade Federal do ABC

Profa Dra Nathalie S. F. Melo (Suplente)

Faculdade São Leopoldo Mandic

Dr Anderson E. S. Pereira (Suplente)

UNESP – Universidade Estadual Paulista – Sorocaba

DEDICATÓRIA

A **Deus** pela tão grande oportunidade.

Especialmente, a minha mãe **Marlene Rocha de Souza Miranda** e ao meu pai **José Donizete Miranda**, que proporcionaram todos os meios, com muito amor e dedicação, para eu chegar até aqui.

Ao meu Orientador **Prof. Dr. Leonardo**, por acreditar em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por me dar esta oportunidade, além de me conceder Seu auxílio em todos os detalhes, ao decorrer de cada fase.

A minha mãe, Prof^a. Marlene, que sempre me apoiou e me incentivou com todo seu amor e empenho a iniciar e continuar nesta caminhada, que durante os primeiros passos, ela foi chamada a estar junto de Deus.

Ao meu pai, Miranda, pelo seu cuidado e amor, que me sustentaram em todos os momentos.

Aos meus irmãos Rafael e Renato pela compreensão e auxílio nesta caminhada.

Ao Prof. Dr. Leonardo, por toda atenção com que me apoiou e me orientou. Orientações estas, que vão além da ciência, cujas serão levadas por toda a vida.

Ao Jhones, que me ajudou e me ensinou a realizar as atividades do laboratório.

A Patrícia, que me auxiliou em inúmeras dúvidas, além do acolhimento.

Ao Lucas que me auxiliou na realização dos experimentos.

Aos amigos de laboratório Estefânia, Anderson, Angélica, Nathalie, Monica, Cintia, Renata e Carol pela companhia e pela ajuda.

Ao programa de “Pós-Graduação em Ciências Ambientais” da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP, pela oportunidade de um excelente ensino.

Aos recursos financeiros obtidos para o desenvolvimento do projeto junto à chamada MCTIC/FNDCT-CNPq/MEC-CAPES/MS-Decit/No. 14/2016 - Prevenção e Combate ao vírus Zika.

A toda minha família, além de todos que participaram deste período de forma direta ou indireta.

**“Preferi a ciência ao fino ouro, pois a Sabedoria vale mais que as pérolas e jóia alguma a
pode igualar”**

(Provérbios, 8: 10-11)

RESUMO

Considerando os danos causados pelas arboviroses disseminadas pelo vetor *Aedes aegypti*, o Brasil vem sofrendo, porém buscando estratégias de combate a tal realidade, uma vez que teve um custo total de R\$ 2,3 bilhões, apenas no ano de 2016, distribuídos no combate ao vetor, em inseticidas e larvicidas e nos custos diretos e indiretos. Valor esse, correspondente a cerca de 2 % do montante investido na Saúde no mesmo ano. Esse quadro ressalta a necessidade de novas ações e táticas na procura de minimizar a situação, como a elaboração de repelentes que possuam um sistema mais efetivo no combate do vetor responsável pela disseminação do vírus Zika, da Dengue, do Chikungunya e da Febre Amarela. Hoje, sabe-se que um dos ativos repelentes mais eficientes é a icaridina, porém, ela pode causar intoxicação nos organismos não alvos. Também, tem-se o geraniol, que é um ativo de origem botânica, bastante eficaz em sua atuação repelente. E, na busca de aprimorar a ação dos ativos, existe a opção da utilização de sistemas de liberação lenta, o que resulta no aumento da faixa de efeito biológico do ativo de interesse, devido ao prolongamento da liberação do mesmo. No entanto, nota-se a existência de intensa preocupação e responsabilidade na elaboração de sistemas que, além de se mostrarem mais eficientes, sejam, também, focados na diminuição de possíveis mecanismos de resistência que o vetor possa desenvolver. Dessa forma, o presente estudo teve por objetivo o desenvolvimento de sistemas de liberação sustentada com o emprego de nanopartículas de zeína em uma mistura que contém a icaridina e o geraniol, encapsulados individualmente. Ressaltando que se realizou o estabelecimento de concentrações que fossem mais eficazes e, possivelmente, menos tóxicas em organismos não alvos. Para tanto, foram acompanhadas durante o período de tempo de sessenta dias as características físico-químicas das formulações, como, potencial zeta, polidispersão, eficiência de encapsulação, diâmetro, além da cinética de liberação, acompanhada por 40 horas. Assim, se obteve uma eficiência de encapsulação individual de cada ativo, de 98 e 80 % para formulações que continham geraniol e icaridina, respectivamente. Salienta-se, que o tamanho médio inicial foi de 206 ± 4 nm, e o potencial zeta positivo para todas as formulações, com índice de polidispersão em torno de 0,2 a 0,4. Os resultados da cinética de liberação mostraram que as formulações possuem uma intensa liberação inicial, com uma liberação sustentada com o decorrer das horas, fazendo-se adequada à finalidade de um repelente nanoencapsulado, garantindo eficiência imediata e ao longo do tempo de ação. Assim, observa-se que as nanoformulações com os dois ativos se mantiveram estabilizadas no tempo de acompanhamento de 60 dias, o que indica que a zeína é uma efetiva opção no carregamento dos ativos combinados.

Palavras-chave: icaridina, geraniol, liberação lenta, nanopartículas, zeína, *Aedes aegypti*.

ABSTRACT

Considering the damage caused by arboviruses disseminated by the vector *Aedes aegypti*, Brazil has been suffering, but seeking strategies to combat this reality, since it had a total cost of R\$ 2.3 billion, only in the year 2016, distributed in combat to the vector, in insecticides and larvicides and in direct and indirect costs. This amount corresponds to approximately 2 % of the amount invested in Health in the same year. This scenario highlights the need for new actions and tactics in order to minimize the situation, such as the elaboration of repellents that have a more effective system in the fight against the vector responsible for the spread of the Zika virus, Dengue, Chikungunya and Yellow Fever. It is now known that one of the most effective repellent actives is icaridin, but it can cause intoxication in non-target organisms. Also, one has the geraniol, that is an active of botanical origin, quite effective in its action repellent. And, in the search to improve the action of the assets, there is the option of using slow release systems, which results in the increase of the biological effect range of the asset of interest, due to the prolongation of the release of the same. However, we note the existence of intense concern and responsibility in the elaboration of systems that, in addition to being more efficient, are also focused on the reduction of possible mechanisms of resistance that the vector can develop. Thus, the present study aimed at the development of sustained release systems with the use of zein nanoparticles in a mixture containing icaridin and geraniol, individually encapsulated. Noting that concentrations were established that were more effective and possibly less toxic in non-target organisms. The physical-chemical characteristics of the formulations, such as zeta potential, polydispersity, encapsulation efficiency, diameter, and release kinetics were monitored during the 60-day period. Thus, an individual encapsulation efficiency of each active was obtained, of 98 and 80% for formulations containing geraniol and icaridin, respectively. It should be noted that the initial mean size was 206 ± 4 nm and the zeta potential positive for all formulations, with a polydispersity index of about 0.2 to 0.4. The results of the release kinetics showed that the formulations have an intense initial release, with sustained release over the hours, making it suitable for the purpose of a nanoencapsulated repellent, guaranteeing immediate efficiency and over time of action. Thus, it is observed that the nanoformulations with the two actives remained stable at the 60-day follow-up time, which indicates that zein is an effective option in the combined assets.

Key words: icaridin, geraniol, slow release, nanoparticles, zein, *Aedes aegypti*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fórmula estrutural do geraniol.....	29
Figura 2: Fórmula estrutural da icaridina.....	30
Figura 3: Curvas analíticas obtidas para os ativos botânicos junto dos parâmetros da regressão linear. A) Geraniol B) Icaridina. Os valores apresentam a média de três experimentos - realizados em triplicata, n=9.....	45
Figura 4: Diâmetro médio (nm) para as nanopartículas de zeína contendo geraniol e icaridina avaliados em função do tempo: A) Nanopartículas contendo 2 % de geraniol (NP_GRL 2 %); B) Nanopartículas contendo 3 % de geraniol (NP_GRL 3 %); C) Nanopartículas contendo 4 % de icaridina (NP_ICA 4 %); D) Nanopartículas contendo 5 % de icaridina (NP_ICA 5 %); E) Nanopartículas contendo 2,5 % de icaridina e 1,5 % de geraniol (NP_ICA 2,5 % + GRL 1,5 %). Estes valores representam a média referentes a três determinações. Significância considerada de $p < 0,05$ (Two-way ANOVA) considerando as diferenças estatísticas ressaltadas entre os grupos de mesmo composto, em que a* representa variações significativas de cada tempo de estabilidade em relação ao tempo inicial; b* representa variações significativas de cada tempo de estabilidade em relação ao tempo 15 dias; c* representa variações significativas de cada tempo de estabilidade em relação ao tempo 30 dias.....	48
Figura 5: Curvas de distribuição de tamanho das nanopartículas de zeína possuindo os ativos geraniol e icaridina acompanhada em diferentes tempos de estabilidade, sendo 0, 15, 30 e 60 dias: A) Nanopartículas contendo 2 % de geraniol (NP_GRL 2 %); B) Nanopartículas contendo 3 % de geraniol (NP_GRL 3 %); C) Nanopartículas contendo 4 % de icaridina (NP_ICA 4 %); D) Nanopartículas contendo 5 % de icaridina (NP_ICA 5 %) e E) Nanopartículas contendo 2,5 % de icaridina e 1,5 % de geraniol (NP_ICA 2,5 % + GRL 1,5 %). Em temperatura ambiente e com determinação em triplicata (n=3).....	49
Figura 6: Índice de polidispersão para as nanopartículas de zeína contendo geraniol e icaridina avaliados em função do tempo: A) Nanopartículas contendo 2 % de geraniol (NP_GRL 2 %); B) Nanopartículas contendo 3 % de geraniol (NP_GRL 3 %); C) Nanopartículas contendo 4 % de icaridina (NP_ICA 4 %); D) Nanopartículas contendo 5 % de icaridina (NP_ICA 5 %); E) Nanopartículas contendo 2,5 % de icaridina e 1,5 % de geraniol (NP_ICA 2,5 % + GRL 1,5 %). Estes valores representam a média referentes a três determinações. Significância considerada de $p < 0,05$ (Two-way ANOVA) considerando as diferenças estatísticas ressaltadas entre os grupos de mesmo composto, em que a* representa variações significativas de cada tempo de estabilidade em relação ao tempo inicial; b* representa variações significativas de cada tempo de estabilidade em relação ao tempo 15 dias; c* representa variações significativas de cada tempo de estabilidade em relação ao tempo 30 dias	51
Figura 7: Distribuição de tamanho médio das nanopartículas de zeína possuindo os ativos geraniol e icaridina acompanhada em diferentes tempos de estabilidade, sendo 0, 15, 30 e 60 dias: A) Nanopartículas contendo 2 % de geraniol (NP_GRL 2 %); B) Nanopartículas contendo 3 % de geraniol (NP_GRL 3 %); C) Nanopartículas contendo 4 % de icaridina (NP_ICA 4 %); D) Nanopartículas contendo 5 % de icaridina (NP_ICA 5 %); E) Nanopartículas contendo 2,5 % de icaridina e 1,5 % de geraniol (NP_ICA 2,5 % + GRL 1,5 %). Com temperatura ambiente e com determinação em triplicata (n=3).....	53
Figura 8: Concentração das nanopartículas de zeína contendo os ativos geraniol e icaridina (10^{12} partículas/mL) acompanhada em diferentes tempos de estabilidade, sendo 0, 15, 30 e 60	

dias: A) Nanopartículas contendo 2 % de geraniol (NP_GRL 2 %); B) Nanopartículas contendo 3 % de geraniol (NP_GRL 3 %); C) Nanopartículas contendo 4 % de icaridina (NP_ICA 4 %); D) Nanopartículas contendo 5 % de icaridina (NP_ICA 5 %); E) Nanopartículas contendo 2,5 % de icaridina e 1,5 % de geraniol (NP_ICA 2,5 % + GRL 1,5 %). Com temperatura ambiente e com determinação em triplicata (n=3).....54

Figura 9: Potencial Zeta para as nanopartículas de zeína contendo geraniol e icaridina avaliados em função do tempo: A) Nanopartículas contendo 2 % de geraniol (NP_GRL 2 %); B) Nanopartículas contendo 3 % de geraniol (NP_GRL 3 %); C) Nanopartículas contendo 4 % de icaridina (NP_ICA 4 %); D) Nanopartículas contendo 5 % de icaridina (NP_ICA 5 %); E) Nanopartículas contendo 2,5 % de icaridina e 1,5 % de geraniol (NP_ICA 2,5 % + GRL 1,5 %). Estes valores representam a média referentes a três determinações. Significância considerada de $p < 0,05$ (Two-way ANOVA) considerando as diferenças estatísticas ressaltadas entre os grupos de mesmo composto, em que a* representa variações significativas de cada tempo de estabilidade em relação ao tempo inicial; b* representa variações significativas de cada tempo de estabilidade em relação ao tempo 15 dias; c* representa variações significativas de cada tempo de estabilidade em relação ao tempo 30 dias.....55

Figura 10: Eficiência de encapsulação (%) para as nanopartículas de zeína contendo geraniol e icaridina avaliados em função do tempo: A) Nanopartículas contendo 2 % de geraniol (NP_GRL 2 %); B) Nanopartículas contendo 3 % de geraniol (NP_GRL 3 %); C) Nanopartículas contendo 4 % de icaridina (NP_ICA 4 %); D) Nanopartículas contendo 5 % de icaridina (NP_ICA 5 %); E) Nanopartículas contendo 2,5 % de icaridina e 1,5 % de geraniol (NP_ICA 2,5 % + GRL 1,5 %). Estes valores representam a média referentes a três determinações. Significância considerada de $p < 0,05$ (Two-way ANOVA) considerando as diferenças estatísticas ressaltadas entre os grupos de mesmo composto, em que a* representa variações significativas de cada tempo de estabilidade em relação ao tempo inicial; b* representa variações significativas de cada tempo de estabilidade em relação ao tempo 15 dias; c* representa variações significativas de cada tempo de estabilidade em relação ao tempo 30 dias.....57

Figura 11: Micrografias referente as nanopartículas de zeína e nanopartículas de goma/quitosana contendo os ativos geraniol e icaridina. A) Nanopartículas contendo 2 % de geraniol (NP_GRL 2 %); B) Nanopartículas contendo 3 % de geraniol (NP_GRL 3 %); C) Nanopartículas contendo 4 % de icaridina (NP_ICA 4 %); D) Nanopartículas contendo 5 % de icaridina (NP_ICA 5 %); E) Nanopartículas contendo 2,5 % de icaridina e 1,5 % de geraniol (NP_ICA 2,5 % + GRL 1,5 %)......59

Figura 12: Espectros de infravermelho, sendo: A) Zeína pura; B) Pluronic F-68 (PLU); C) Geraniol (GRL); D) Icaridina (ICA); E) Nanopartículas contendo 2 % de geraniol (NP_GRL 2 %); F) Nanopartículas contendo 3 % de geraniol (NP_GRL 3 %); G) Nanopartículas contendo 4 % de icaridina (NP_ICA 4 %); H) Nanopartículas contendo 5 % de icaridina (NP_ICA 5 %); I) Nanopartículas contendo 2,5 % de icaridina e 1,5 % de geraniol (NP_ICA 2,5 % + GRL 1,5 %). Os espectros foram adquiridos fazendo uso de acessório de reflectância total atenuada (ATR), sendo um total de 64 acumulações (faixa de frequência: $4000-400\text{ cm}^{-1}$). As setas em vermelho indicam em cada espectro as principais bandas de absorção características.....60

Figura 13: Perfil de cinética de liberação *in vitro* para os ativos icaridina e geraniol encapsulados individualmente em nanopartículas de zeína (formulações separadas), Em que: A) GRL_1,5 %, refere-se a formulação de nanopartículas de zeína contendo geraniol na concentração de 1,5 %; B) ICA_2,5 %, refere-se a formulação de nanopartículas de zeína

contendo icaridina na concentração de 2,5 %. Temperatura de 25 °C, com determinação em triplicata, n=365

Figura 14: Perfil de cinética de liberação *in vitro* para os ativos icaridina (2,5 %) e geraniol (1,5 %) encapsulados individualmente em nanopartículas de zeína e misturados em seguida (formulação mista). Temperatura de 25 °C, com determinação em triplicata, n=366

Figura 15: Perfil de cinética de liberação *in vitro*: A) Para ativos icaridina (2,5 %) e geraniol (1,5 %) encapsulados individualmente em nanopartículas de zeína e misturados em seguida (formulação mista) (GRL_junto e ICA_junto); B) Para os ativos icaridina (2,5 %) e geraniol (1,5 %) encapsulados individualmente em nanopartículas de zeína e analisados individualmente (GRL_separado e ICA_separado). Temperatura de 25 °C, com determinação em triplicata, n=367

Figura 16: Valores resultantes do modelo matemático “Lei de Potência” (Korsmeyer-Peppas). A) GRL_separado, refere-se a formulação de nanopartículas de zeína contendo geraniol na concentração de 1,5 %; B) ICA_separado, refere-se a formulação de nanopartículas de zeína contendo icaridina na concentração de 2,5 %; C) GRL_junto e D) ICA_junto, referem-se a formulação de nanopartículas de zeína contendo geraniol encapsulados individualmente na concentração de 1,5 % e formulação de nanopartículas de zeína contendo icaridina encapsulada individualmente na concentração de 2,5 %, e posteriormente misturados70

Figura 17: Diâmetro médio (nm) para as nanopartículas de zeína contendo geraniol e icaridina e dopadas com icaridina, avaliados em função do tempo: A) Nanopartículas contendo 2,5 % de icaridina e 1,5 % de geraniol, dopada com 2,5 % de icaridina (NP_MISTA_DP_5 %_ICA); B) Nanopartículas contendo 2,5 % de icaridina e 1,5 % de geraniol, dopada com 5,0 % de icaridina (NP_MISTA_DP_7,5 %_ICA); C) Nanopartículas contendo 2,5 % de icaridina e 1,5 % de geraniol, dopada com 7,5 % de icaridina (NP_MISTA_DP_10 %_ICA 3 % PL). Estes valores representam a média referentes a três determinações. Significância considerada de $p < 0,05$ (Two-way ANOVA) considerando as diferenças estatísticas ressaltadas entre os grupos de mesmo composto, em que a* representa variações significativas de cada tempo de estabilidade em relação ao tempo inicial; b* representa variações significativas de cada tempo de estabilidade em relação ao tempo 15 dias; c* representa variações significativas de cada tempo de estabilidade em relação ao tempo 30 dias; d* representa variações significativas de cada tempo de estabilidade em relação ao tempo 45 dias74

Figura 18: Curvas de distribuição de tamanho das nanopartículas de zeína contendo geraniol e icaridina e dopadas com icaridina, acompanhada em diferentes tempos de estabilidade, sendo 0, 15, 30, 45 e 60 dias: A) Nanopartículas contendo 2,5 % de icaridina e 1,5 % de geraniol, dopada com 2,5 % de icaridina (NP_MISTA_DP_5 %_ICA); B) Nanopartículas contendo 2,5 % de icaridina e 1,5 % de geraniol, dopada com 5,0 % de icaridina (NP_MISTA_DP_7,5 %_ICA); C) Nanopartículas contendo 2,5 % de icaridina e 1,5 % de geraniol, dopada com 7,5 % de icaridina (NP_MISTA_DP_10 %_ICA 3 % PL). Em temperatura ambiente e com determinação em triplicata (n=3)75

Figura 19: Índice de polidispersão para as nanopartículas de zeína contendo geraniol e icaridina e dopadas com icaridina, avaliados em função do tempo: A) Nanopartículas contendo 2,5 % de icaridina e 1,5 % de geraniol, dopada com 2,5 % de icaridina (NP_MISTA_DP_5 %_ICA); B) Nanopartículas contendo 2,5 % de icaridina e 1,5 % de geraniol, dopada com 5,0 % de icaridina (NP_MISTA_DP_7,5 %_ICA); C) Nanopartículas contendo 2,5 % de icaridina e 1,5 % de geraniol, dopada com 7,5 % de icaridina (NP_MISTA_DP_10 %_ICA 3 % PL). Estes valores representam a média referentes a três

determinações. Significância considerada de $p < 0,05$ (Two-way ANOVA) considerando as diferenças estatísticas ressaltadas entre os grupos de mesmo composto, em que a* representa variações significativas de cada tempo de estabilidade em relação ao tempo inicial; b* representa variações significativas de cada tempo de estabilidade em relação ao tempo 15 dias; c* representa variações significativas de cada tempo de estabilidade em relação ao tempo 30 dias; d* representa variações significativas de cada tempo de estabilidade em relação ao tempo 45 dias77

Figura 20: Potencial Zeta para as nanopartículas de zeína contendo geraniol e icaridina e dopadas com icaridina, avaliados em função do tempo: A) Nanopartículas contendo 2,5 % de icaridina e 1,5 % de geraniol, dopada com 2,5 % de icaridina (NP_MISTA_DP_5 %_ICA); B) Nanopartículas contendo 2,5 % de icaridina e 1,5 % de geraniol, dopada com 5,0 % de icaridina (NP_MISTA_DP_7,5 %_ICA); C) Nanopartículas contendo 2,5 % de icaridina e 1,5 % de geraniol, dopada com 7,5 % de icaridina (NP_MISTA_DP_10 %_ICA 3 % PL). Estes valores representam a média referentes a três determinações. Significância considerada de $p < 0,05$ (Two-way ANOVA) considerando as diferenças estatísticas ressaltadas entre os grupos de mesmo composto, em que a* representa variações significativas de cada tempo de estabilidade em relação ao tempo inicial; b* representa variações significativas de cada tempo de estabilidade em relação ao tempo 15 dias; c* representa variações significativas de cada tempo de estabilidade em relação ao tempo 30 dias; d* representa variações significativas de cada tempo de estabilidade em relação ao tempo 45 dias78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Alguns repelentes disponíveis no mercado contendo os ativos Icaridina, IR3535 e DEET, e com misturas de diferentes ativos.....	27
Tabela 2: Alguns repelentes disponíveis no mercado com o ativo icaridina, baseados em sistemas de liberação sustentada.....	28
Tabela 3: Condições cromatográficas utilizadas para a metodologia analítica, junto com a quantificação dos compostos analisados. A) geraniol, B) icaridina.....	37
Tabela 4: Diferentes concentrações de dopagens da Formulação Mista que já possui 2,5 % de Icaridina e 1,5 % de Geraniol encapsulados individualmente em nanopartículas de zeína.....	43
Tabela 5: Coeficiente de correlação (r) referente as curvas de calibração analíticas dos repelentes, obtido para curva final.....	46
Tabela 6: Valores de limite de detecção e limite de quantificação referentes aos métodos analíticos para cada repelente estudado.....	46
Tabela 7: Coeficiente de correlação (r^2) para os distintos modelos matemáticos empregados para a cinética de liberação dos ativos geraniol e icaridina encapsulados individualmente nas nanopartículas de zeína	69

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ANVISA:	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE:	Cromatografia líquida de alta eficiência
DLS:	Dynamic Light Scattering
EE:	Eficiência de Encapsulação
FTIR:	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
GRL:	Geraniol
ICA:	Icaridina
INMETRO:	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LD:	Limite de Detecção
LQ:	Limite de Quantificação
MFA:	Microscopia de força atmica
NTA:	Nanoparticle tracking analysis ou Rastreamento de Nanopartículas
NM:	Nanomateriais;
NP:	Nanopartículas de zeína
PLU:	Pluronic F-68
PDI:	ndice de polidisperso;
pH:	Potencial hidrogênionico;
ZP:	Potencial zeta.

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 O vetor <i>Aedes aegypti</i>	18
1.1.1 Doenças endêmicas causadas pelo vetor <i>Aedes aegypti</i>	19
1.1.1.1 Arboviroses.....	19
1.1.1.1.1 Febre Amarela.....	19
1.1.1.1.2 Dengue.....	20
1.1.1.1.3 Chikungunya.....	21
1.1.1.1.4 Zika.....	21
1.1.1.1.4.1 Cenário brasileiro e o Zika vírus	23
1.2 Formas de combate e proteção.....	24
1.2.1 Alternativas de repelentes disponíveis no mercado.....	26
1.2.1.1 Geraniol	29
1.2.1.2 Icaridina	30
1.2.2 Nanotecnologia em benefício às formulações de repelentes	31
1.2.2.1 Nanopartículas de Zeína	32
2 OBJETIVOS	34
2.1.Objetivo Geral	34
2.2.Objetivos Específicos	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 Materiais	35
3.2 Métodos	36
3.2.1 Metodologia Analítica de quantificação dos repelentes por CLAE	36
3.2.1.1 Construção da curva analítica.....	36
3.2.2 Otimização das condições experimentais	37
3.2.2.1 Sistemas nanocarreadores.....	37
3.2.2.1.1 Sistemas carreadores baseados em nanopartículas de zeína	37
3.2.3 Medidas de Caracterização e Estabilidade das Formulações	39
3.2.3.1 Diâmetro médio e polidispersão	39
3.2.3.2 Rastreamento de Nanopartículas	39
3.2.3.3 Potencial Zeta	40
3.2.4 Análise morfológica das formulações por microscopia.....	40
3.2.4.1 Microscopia de Força Atômica	40
3.2.5 Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)	41
3.2.6 Eficiência de Encapsulação	41
3.2.7 Cinética de Liberação da Icaridina e do Geraniol das nanopartículas de Zeína	42
3.2.8 Modelagem Matemática para avaliação do mecanismo da cinética de liberação	42
3.2.9 Dopagem das formulações	43
3.2.9.1 Medidas de Caracterização e Estabilidade das formulações dopadas - DLS	44
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1 Desenvolvimento da metodologia analítica para quantificação dos repelentes	44
4.1.1 Curvas de calibração e adequação de metodologia analítica.....	44
4.2 Estudo e caracterização da estabilidade físico-química das nanopartículas	47
4.2.1 Diâmetro hidrodinâmico e índice polidispersão	47
4.2.2 Rastreamento de Nanopartículas.....	52
4.2.3 Potencial zeta.....	55
4.3 Eficiência de encapsulação	56
4.4 Análise morfológica das formulações por microscopia	58

4.4.1 Microscopia de Força Atômica (AFM)	58
4.5 Espectroscopia na Região do Infravermelho	60
4.6 Cinética de liberação dos repelentes das nanopartículas de Zeína	63
4.7 Modelagem Matemática para avaliação do mecanismo da cinética de liberação	69
4.8 Dopagem das formulações	72
4.8.1 Estudo e caracterização da estabilidade físico-química das nanopartículas - formulações dopadas (Análises DLS)	73
4.8.1.1 Diâmetro médio e índice polidispersão das formulações dopadas	73
4.8.1.2 Potencial Zeta das formulações dopadas	78
5.CONCLUSÃO.....	79
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

1 INTRODUÇÃO

Artrópodes são vetores capazes de transmitir uma série de patógenos e parasitas, contribuindo para disseminação de doenças endêmicas em todo o mundo. Em especial, os mosquitos (Diptera: Culicidae) têm um papel chave na disseminação de doenças em humanos e animais, que incluem a Malária e importantes arboviroses como Dengue, Febre Amarela, Chikungunya, Zika (BENELLI, 2015; BENELLI; MEHLHORN, 2016).

Assim, tais doenças, as arborivoses Febre Amarela, Dengue, Chikungunya e Zika, cujo o mosquito *Aedes aegypti* é o principal vetor, ao longo dos anos vêm trazendo preocupações em todo o mundo. E, isso se dá devido aos dados contabilizados. Sendo que, essas arboviroses juntas causaram milhares de centenas de infecções, sendo, por exemplo, registrado em 2015, mais de 50000 mortes anuais (KISTLER *et al.*, 2015).

A Febre Amarela, que teve seu primeiro registro no México em 1648 e, posteriormente, diversos outros surtos pelo mundo, como na Europa, em 1730, continuou a fazer suas vítimas nos séculos posteriores (GARDNER; RYMAN, 2010; VASCONCELOS, 2010). Ressaltando que, entre dezembro de 2016 e setembro de 2017, aconteceu novo surto da doença no Brasil, tendo, além do elevado e assustador número de eventos em humanos, um acentuado episódio de mortes e adoecimentos de macacos (BRASIL, 2017).

A Dengue que, em 2008 ressurgiu globalmente, também registrou um aumento de vítimas em muitos locais, como evidenciado na Flórida, nos Estados Unidos (RICHARDS *et al.*, 2012). Os primeiros apontamentos de febre resultante da Dengue se deram nos anos 992, enquanto os primeiros casos de Dengue hemorrágica ocorreram no final do século XX nas Filipinas e Tailândia (GUBLER, 2006).

A Chikungunya apresenta sintomas semelhantes aos da Dengue, porém, com fortes dores articulares (GARCÍA *et al.*, 2011). O primeiro quadro de epidemia dessa doença ocorreu na África, nos anos cinquenta do século passado. Posteriormente, provocou muitas incidências, espalhando-se com velocidade considerável em inúmeros países, principalmente devido a falta de imunidade da população a esse arbovírus (STAPLES; FISCHER, 2014; WEAVER, 2014).

Por fim, a arbovirose Zika teve sua primeira identificação em 1947, em Uganda, na África Oriental, nos conhecidos macacos *Rhesus*. Ela permaneceu em território africano e

asiático até o ano de 2007, praticamente sem registro em humanos, quando se disseminou nas Ilhas do Pacífico, em Yap, causando um grande surto (CHANG *et al.*, 2016; MUSSO *et al.*, 2014; WONG *et al.*, 2013; BENELLI; MEHLHORN, 2016). Já em 2015, houve a confirmação da contaminação desse vírus nas Américas e em território brasileiro, ocorrendo posterior alastramento, e causando o assustador surto da microcefalia (PETERSEN *et al.*, 2016; BOGOCH *et al.* 2016) e da síndrome de Guillain-Barré (CAO-LORMEAU *et al.*, 2016)

1.1 O vetor *Aedes aegypti*

O vetor *Aedes aegypti* faz parte da família dos culicídeos (pernilongos e mosquitos), os quais constituem o primeiro maior grupo relacionado a transmissão de diversas doenças aos humanos (FONSECA, 2009). Assim, o *Aedes aegypti*, como já citado, é considerado um importante vetor das arboviroses Febre Amarela, Dengue, Chikunguya e Zika e, por isso, tem despertado intensa preocupação em combatê-lo, porém, ainda, sem resultados muito eficazes.

Este vetor originou-se no Egito e se espalhou para diversos países a partir da África, por meio de navios de transporte de escravos (GLORIA-SORIA *et al.*, 2014). Ele se caracteriza pela maior incidência em regiões subtropicais e tropicais, clima este, que, propicia o aumento da sua população e das consequentes arboviroses (BOGOCH *et al.*, 2016; BRADY *et al.*, 2014; WONGKOON, 2011).

O *Aedes aegypti*, também se adequa em zonas urbanas, pois se reproduz facilmente com os multi criadouros adaptados, oferecidos por esses locais (TAVARES *et al.*, 2018). Não apresentando preferência por tipos de materiais que compõem os recipientes, porém, coloca seus ovos, preferencialmente, em locais com água limpa e, favorecidos com sombra. Tudo isso para a eficácia do período necessário para que os ovos adquiram resistência ao ressecamento e, também, para garantir a eficiência da eclosão e do desenvolvimento da fase larval (LOPES. 1993)

Lembrando que o calor e a umidade favorecem o desenvolvimento dos ovos e das larvas, ou seja, beneficiando o ciclo de vida e a disseminação rápida. Isso tudo associado ao aquecimento global resultou no aumento de locais com características de clima quente e úmido, resultando em maior disseminação do *Aedes aegypti* e, consequentemente, das arboviroses transmitidas por ele (TAVARES *et al.*, 2018).

As fêmeas desse vetor, que são as responsáveis pela disseminação dos arbovírus, depositam um total de até mil e quinhentos ovos durante toda a fase adulta. Tais ovos possuem forma alongada e com coloração escura, além de possuírem brilho. E, caso a fêmea esteja contaminada com alguma das arboviroses, seus ovos podem apresentá-las neles. Ressalta-se que eles conseguem resistir até quatrocentos e cinquenta dias sem o contato com a água, o que aumenta a resistência desse mosquito. Sendo que após quinze horas de postura dos ovos, estes já adquirem tal resistência ao ressecamento devida sua exposição ao ambiente, resistindo ao período especificado, em ambientes secos. Podendo ser transportados, desde que não haja o contato com a água (KISTLER *et al.*, 2015).

Toda essa resistência apresentada, somada a alta capacidade como vetor, aliada a dificuldade de controle de sua população e ausência de terapêutica específica, resulta no atual quadro de preocupação com o *Aedes aegypti* (BENELLI; MEHLHORN, 2016).

1.1.1 Doenças endêmicas causadas pelo vetor *Aedes aegypti*

1.1.1.1 Arboviroses

As arboviroses disseminadas pelo vetor *Aedes aegypti* causam inúmeros problemas na saúde das pessoas. Também, algumas dessas arboviroses apresentam sintomas parecidos que acabam sendo confundidos, e outras, porém, sintomas mais específicos, se tornando mais fácil discriminar com qual arbovírus a pessoa foi infectada. Assim, atualmente, busca-se a ampliação de novas estratégias e ferramentas de combate a tais arboviroses, em parceria com a tecnologia desenvolvida e ofertada no mercado.

1.1.1.1.1 Febre Amarela

A Febre Amarela, transmitida principalmente pelo mosquito *Aedes aegypti*, já alarmou muito, principalmente, devido a falta de conhecimento, pois, valorizou-se por longos períodos de tempo o conhecimento popular equivocado que afirmava que tal transmissão acontecia de pessoa para pessoa, sendo que a real ocorrência apenas se dá por meio do mosquito (MONATH, 2008).

Ela é uma arbovirose muito incidente na África e América do Sul, causando alguns sintomas próximos aos da Chikungunya e Dengue, como febre, dor de cabeça, dentre outros.

Todavia, a principal evidência é a icterícia, que é a mudança na coloração dos olhos e peles para tons mais amarelados, além de hemorragias nas gengivas, nariz e em partes do sistema digestivo. Lembrando que os sintomas variam de acordo com o nível da incidência da Febre Amarela (MONATH, 2008; BRASIL, 2016).

Quanto ao tratamento, como ainda não é muito específico, recomenda-se o repouso e a reposição de líquidos e nos casos em que se exige a internação hospitalar, também se pode utilizar da reposição sanguínea. Em casos mais graves, recomenda-se o tratamento em unidades de terapias intensivas, pois em caso contrário, pode-se registrar a morte do doente (GARDNER & RYMAN, 2010).

A principal forma de prevenção é a utilização da vacina (PULENDRAN *et al.*, 2008), podendo as crianças, a partir de nove meses de vida, utilizarem seguramente da vacina. Porém, não é recomendada o uso em gestantes, ou mulheres que estão amamentando, pessoas que fazem uso da quimioterapia ou radioterapia, ou com o sistema imunológico deprimido, também as que fazem tratamento de doenças graves e idosos. Ainda, pessoas com alergia a eritromicina, à gelatina e ao ovo, não podem receber a vacina, pois, nesse último caso, pode haver quantidades residuais de proteína ovoalbumina. Em todos esses casos não se indica o uso da vacina para evitar riscos de complicações na saúde dessas pessoas (BRASIL, 2016).

1.1.1.1.2 Dengue

A busca da eliminação de casos de Dengue vem da sua grande incidência em períodos climáticos sazonais, quando se registravam surtos dessa doença. Pois, após períodos que se conseguia controlar, ainda que parcialmente, os focos de Dengue, posteriormente, com a mudança das estações este arbovírus retornava de forma intensa, aumentando veementemente os números de casos registrados (BOGOCH *et al.*, 2016; BRADY *et al.*, 2014; WONGKOON, 2011).

A preocupação é evidenciada devido aos problemas de saúde que a infecção de tal arbovírus causa, sendo a principal reclamação a febre alta e repentina, além do cansaço extremo. Esta doença apresenta como sintomas clássicos as dores na região posterior dos olhos, dor de cabeça, tonturas, redução e até perda de apetite, náuseas e vômitos, dores nas articulações e nos ossos, dentre outros. A busca pelo tratamento médico é de extrema importância, ainda mais porque se esse arbovírus for reincidente em uma pessoa, ele pode se

desenvolver na forma de Dengue hemorrágica, podendo levar a morte (CHANG *et al.*, 2009; BRASIL, 2016; GARCÍA *et al.*, 2011).

1.1.1.1.3 Chikungunya

A Chikungunya é muito confundida com a Dengue devido a grande dificuldade por parte dos pacientes e profissionais de saúde em distinguir seus sintomas e, assim como a Dengue, tem deixado suas marcas quanto aos problemas de saúde da população (BEDOYA-ARIAS *et al.*, 2015).

Esta arbovirose que também causa febre, dores de cabeça, coceira leve, dentre outros sintomas, possui a diferença de registrar dores nas articulações, que ocorrem de forma muito mais intensa do que na própria Dengue (STAPLES & FISCHER, 2014).

Assim como no caso da Dengue, a maior complicação é a falta de medicamentos específicos para o tratamento da Chikungunya (BENELLI & MEHLHORN, 2016), tendo que se utilizar de meios paliativos, como antitérmicos e antiinflamatórios, para o alívio dos sintomas. Acrescente-se o agravante da restrição do leque de medicamentos antitérmicos, sendo permitido unicamente o paracetamol. A utilização do medicamento errado pode levar ao aparecimento de um perigoso sintoma, que é a ocorrência do quadro de hemorragia, observado quando da utilização de ácido acetil salicílico (BRASIL, 2016).

Os sintomas da Chikungunya podem persistir por meses, porém se mostra como um evento único, pois, quando um indivíduo adquire tal doença, passa a ser imune pelo resto de sua vida, ao contrário da Dengue. Ressaltando que cerca de 30 % dos casos de pessoas infectadas pela Chikungunya não apresentam qualquer sintoma, assim como nos registros mais leves de Dengue (STAPLES & FISCHER, 2014; BRASIL, 2016).

1.1.1.1.4 Zika

O vírus Zika é um arbovírus da família *Flaviviridae*, ou seja, é um vírus de RNA que é transmitido por artrópodes (BENELLI & MEHLHORN, 2016; MUSSO *et al.*, 2014), o qual tem sido um dos que mais tem se destacado dentre as pesquisas em doenças endêmicas transmitidas pelo vetor *Aedes aegypti*. Tal destaque se dá pelas consequências trazidas às pessoas que são picadas pelo vetor contaminado (IOOS *et al.*, 2014), principalmente às gestantes (PETERSEN *et al.*, 2016; BRASIL, P. *et al.* 2016). Esse fato é devido à má formação do encéfalo dos bebês que ocorre no período gestacional, causando a temida

microcefalia (BOGOCH *et al.*, 2016). Situação essa que reflete o tropismo demonstrado por parte do Zika vírus pelas células neurais (ENFISSI *et al.*, 2016).

Em fevereiro de 2014, registrou-se episódios de Zika vírus no Chile. Em maio de 2015, o Brasil apontou seus primeiros casos. Sendo que, seis meses depois, em novembro, uma das primeiras mortes registradas no Brasil por Zika vírus foi o caso de um bebê recém-nascido, cujo possuía microcefalia. Após análises de sangue e de tecidos dessa criança, encontrou-se o genoma do Zika vírus (ATTAR, 2016).

Ressalta-se que os sintomas decorrentes da infecção dessa arbovirose são praticamente imperceptíveis, ocorrendo apenas estado febril em cerca de 20 % dos casos (CAO-LORMEAU *et al.*, 2016). Não registrando casos com internação hospitalar. Dessa forma, torna-se muito difícil realizar um diagnóstico clínico e, conseqüente dificuldade na realização de um tratamento adequado para tal infecção (GINIER *et al.*, 2016; FAUCI, MORENS, 2016; CHANG *et al.*, 2016). Atualmente, o método mais utilizado para detectar o Zika vírus em amostras biológicas é a reação em cadeia da polimerase, pela transcriptase reversa. Porém, esse método é custoso e exige tempo para ser realizado, além de pessoas capacitadas em realizá-lo, fazendo com que muitas unidades de saúde não façam a análise, principalmente em locais que possam ter as maiores ocorrências, pois, resulta em altos custos. Lembrando que as regiões endêmicas estão localizadas em locais caracterizados pela baixa renda (MELO *et al.*, 2018).

Melo (2018) e seus colaboradores desenvolveram uma alternativa menos custosa e bem mais ágil de detecção do Zika vírus em amostras biológicas. Essa análise envolve a utilização de espectrometria de massa aliada ao uso de algoritmos de tomada de decisões, resultando em diagnósticos. Tal análise faz a distinção entre pacientes realmente infectados e os que apresentam sintomas semelhantes, ou também, casos que se enquadrem após período agudo de infecção dessa doença.

Embora o Zika vírus apresente os diferentes danos, Lima e seus colaboradores (2017) observaram todos esses pontos, e se utilizaram do fato de o Zika vírus (o vírus que é recorrente no território brasileiro) ter certo direcionamento a causar alterações no ciclo celular em células cerebrais, induzindo, muitas vezes, a apoptose celular. Assim, testaram se a mesma situação também ocorreria no caso de células neurais de câncer. E, concluíram que essa relação é verdadeira, considerando que a síntese de digoxina induzida pelo Zika vírus pode

futuramente ser uma nova opção no tratamento neural de células tumorais, alternativa às químico e radioterapias.

1.1.1.1.4.1. Cenário brasileiro e o Zika vírus

A preocupação dos brasileiros quanto a disseminação do vírus da Zika e suas consequências são bem fundamentadas. Principalmente, considerando o número de prováveis infectados no Brasil em 2017, que foi de 17.594, porém, somente no ano imediatamente anterior (2016) já haviam sido de 216.207 casos (notificados) da doença, sem considerar dados de Dengue e Chikungunya, demonstrando a grande dimensão do problema epidemiológico enfrentado pelo país (BRASIL, 2018a).

Ainda, de acordo com o Centro de Operações de emergências em saúde pública a respeito de microcefalias, entre novembro de 2015 e dezembro de 2017, houveram 15.150 ocorrências registradas de suspeitas nesse período, de acordo com o fixado no Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde em janeiro de 2018. Dentre esses, 3.037 casos foram confirmados (20,1 %), 2.903 das ocorrências continuam sob averiguação (19,2 %) e 6.718 foram classificadas como sem relação com o vírus Zika (44,3 %), ou seja, descartadas. Já as ocorrências que ainda permanecem em estudo, resultam em pouco mais de 500 casos, considerando em tal período casos para microcefalia e/ou alteração do sistema nervoso central. (BRASIL, 2018b).

Concomitantemente a apreensão em relação ao número de casos, tem-se, também, uma crescente preocupação relacionada ao acompanhamento quanto as alterações no crescimento e desenvolvimento dos bebês referentes aos episódios confirmados. E, oferece, dessa forma, para esses casos, as diferentes ações, como atendimento em puericultura, para 1.639 casos, cuidados em estimulação precoce, para 975 casos, além de serviço de atenção especializada, para 1.679 dos casos (BRASIL, 2018b).

Também, existem os casos de óbitos em monitoramento, ou seja, em acompanhamento das evidências para saber se tem ou não relação com o vírus. Sendo que 26 % dos municípios do Brasil registram ao menos um caso de óbito em monitoramento. E, a maior concentração de casos em monitoramento se encontra no Nordeste, com quase 40 %, e, se considerar o número de casos somados aos óbitos em monitoramento, este resulta em um percentual de quase 50 % dos municípios dessa região (BRASIL, 2018b).

1.2 Formas de combate e proteção

As formas de combate ao mosquito e às arboviroses por ele disseminadas têm se dividido entre os controles biológicos, físicos, químicos e por insetos transgênicos, além do desenvolvimento de vacinas. O controle biológico se dá por meio do uso de bactérias, fungos, peixes e crustáceos. Já o controle químico ocorre por meio de larvicidas, inseticidas e repelentes. Os físicos resumem-se na dificuldade mecânica do mosquito se procriar, sendo por meio da proteção, além da destruição e gestão adequada de criadouros potenciais. Já a utilização de insetos transgênicos pode ocorrer, por exemplo, esterilizando o mosquito (RATHER *et al.*, 2017).

Assim, uma das principais formas de controle o *Aedes aegypti* é a estratégia da diminuição de população. Porém, não é uma ação tão eficiente, pois não se consegue restringir com efetividade a incidência dos casos, ainda mais se consideradas as regiões tropicais e subtropicais (TAVARES *et al.*, 2018; WALKER *et al.*, 2011).

Isso tem levado a uma intensa preocupação com as formas de se proteger da picada de tal mosquito. Uma das ações por parte das pessoas se resume na eliminação dos focos e recipientes com águas paradas de suas casas e quintais. Mesmo com essas ações, muitos locais de reprodução podem passar despercebidos. Como também a falta de controle do mosquito de áreas verdes e florestas próximas às regiões urbanas. Associado a isso, tem-se ainda a falta de conscientização de significativa parte da população, favorecendo a proliferação do mosquito (LIMA-CAMARA, 2016).

Também, tem-se um incentivo na utilização de roupas mais largas com mangas compridas, calças, sapatos fechados e com meias. Entretanto, esta não se mostra a melhor maneira, visto que não é tão viável e nem tão eficiente, pois o tecido dificulta, porém não impede a picada. Acrescenta-se a dificuldade de se utilizar tais vestimentas em clima tropical e subtropical, principalmente nas épocas de temperaturas mais elevadas (BOGOCH *et al.*, 2016).

Associada a tal ação, tem-se o incentivo de se fazer uso de barreiras físicas, como colocar telas antimosquito em portas e janelas, ou, também, mosquiteiros ao redor de berços e camas (TAVARES *et al.*, 2018; LIMA-CAMARA, 2016). Mas, para fortalecer a proteção, teve-se o desenvolvimento de vacinas ao combate às arboviroses. A da Dengue se faz em três

dosagens, com intervalos de seis meses cada. Garantindo a proteção para os quatro tipos de Dengue em cerca de 70 % dos casos. Suas restrições se fazem as mesmas citadas para vacina da Febre Amarela, somando-se mais uma proibição, que é o caso de com pessoas que estejam em estado febril. Sendo, essa vacina, permitida no Brasil, para crianças a partir de nove anos de idade e pessoas com até 45 anos de idade (BRASIL, 2017).

Já a vacina contra o Zika vírus está em desenvolvimento, dentre as quais, algumas se encontram em fase de testes em humanos. Em que cerca de 60 instituições ao redor do mundo, tanto particulares quanto públicas, estão buscando produzi-la (BARRETT, 2018; MORABITO, GRAHAM, 2017). Como é o caso da vacina desenvolvida no Brasil, que é uma parceria entre a Faculdade de Medicina da USP (Universidade de São Paulo), UFMG (Universidade Federal de Minas Gerais) e o Centro de Pesquisas de Vacinas do Instituto Nacional de Alergia e Doenças infecciosas dos Estados Unidos, que iniciaram esses testes no final de 2018, e oferecem um acompanhamento de dois anos, período de exigência para que as voluntárias não engravidem. Outras, já estão em finalização dos testes, como a desenvolvida nos Estados Unidos, pelo NIAID, “Laboratório de Doenças Virais”, liderado por Stephen Whitehead, que iniciaram seus testes num grupo de pessoas em meados de 2018, realizando um acompanhamento de seis meses.

Essas duas vacinas apresentam diferenças entre si, sendo que a brasileira utiliza do DNA do Zika vírus, já a outra utiliza o vírus atenuado. Isso reflete principalmente nas restrições da aplicação da vacina. Em ambos os casos não serão recomendadas para as grávidas, nem pessoas acima de 35 anos e crianças, abaixo de 15 anos, no caso da brasileira. Também não será permitida para pessoas abaixo de 18 anos e acima de 50 anos, para a proveniente do laboratório NIAID. Ou seja, a vacina está sendo direcionada, primordialmente, à pessoas em fase reprodutiva (USP, 2018; NIAID, 2018).

Considerando todo esse contexto de cuidados, expectativas e esperas, faz-se, cada vez mais necessária a utilização cuidadosa de repelentes, já que é uma alternativa de ação imediata. Para que unido à outros cuidados, como a utilização das barreiras físicas, possa se atingir uma proteção de efeito sinérgico (PETERSEN *et al.*, 2016; BOGOCH *et al.*, 2016).

Evidencia-se, ainda, a importância de seguir corretamente o uso do repelente, como não deixar de aplicá-lo dentro das residências e em locais abertos, como praias, ruas, áreas verdes, independentemente do horário, principalmente em grávidas, por causa do Zika vírus.

Além de ser importante fazer a reaplicação dentro do tempo informado no rótulo, uma vez que cada repelente tem um tempo de ação, devido aos seus ativos (TAVARES *et al.* 2018).

Ressalta-se que, de início, o mercado não se encontrava preparado para tal demanda, havendo a necessidade de investimentos em pesquisas e desenvolvimento de novas vacinas e fórmulas de repelentes mais eficientes e, ao mesmo tempo, seguras, buscando a eficácia de tal proteção (BENELLI & MEHLHORN, 2016). Esses investimentos visam um controle mais eficiente e a eliminação de novas incidências, através do desenvolvimento de inovações em pesquisas com o foco de acabar com a disseminação descontrolada dessas arboviroses, evitando as picadas.

Como reflexo dessa situação, nota-se uma mudança significativa na comercialização de repelentes. Dados mostram que as vendas de repelentes no Brasil, em volume, se elevaram 49 % em 2016, após terem crescido 32,5 % em 2015, e 6,6 % no ano anterior. Essa tendência elevou o Brasil para a quarta posição referente ao mercado global de repelentes (G1, 2017), sendo que em receita, o setor faturou 217,4 milhões de reais só no ano de 2015 (DCI, 2016).

1.2.1 Alternativas de repelentes disponíveis no mercado

A comercialização atual de repelentes concentra-se nos que possuem os seguintes ativos: DEET (N,N-dietil-m-toluamida), IR3535 (3-N-acetilbutylamino-éster etil propionico) e Icaridina (ácido 1-piperidinepiperidina-2,2-hidroxi-metil-1-metilester) (ABDEL-GHAFFAR *et al.* 2015), os quais tem sua comercialização aprovada pela ANVISA. No entanto, além desses ativos, existem os ativos de origem natural, com o composto geraniol (3,7-dimetil-octa-trans-2,6-dien-1-ol), o qual possui interessante e eficaz ação de repelência, e vem sendo cada vez mais comercializado no mercado de repelentes.

Dessa forma, nota-se que os repelentes se dividem nesses dois grupos: sintéticos e naturais. A apresentação dos repelentes se faz em aerossol, spray, loção, creme e gel, sempre especificando a idade mínima para a aplicação, além de, a maior parte deles informar a concentração, em porcentagem, do ativo que causa a repelência. Nesse âmbito, a Tabela 1 apresenta alguns dos repelentes comercializados que possuem em sua formulação algum dos ativos citados. Ressalta-se, que a escolha dos repelentes para compor a Tabela 1, se baseou

nos quais mais se destacam, de acordo com cada ativo, quando se realiza a pesquisa de busca por repelentes na internet.

Tabela 1: Alguns repelentes disponíveis no mercado contendo os ativos Icaridina, IR3535 e DEET, e com misturas de diferentes ativos.

REPELENTES					
Ativos	Marca comercializada	Concentração	Apresentação	Ação (tempo)	Idade permitida
Icaridina	Exposis Extreme	25 %	Spray	Até 10h	≥ 10 anos
	SBP PRO Advanced	25 %	Spray	Até 12h	≥ 1 ano
	Total Protect Contra Insetos	Icaridina*	Spray	10h	≥ 2 anos
IR3535	Huggies (Infantil)	10 – 15 %	Loção	3h	≥ 6 meses
DEET	OFF	14 %	Spray	Até 6h	≥ 12 anos
	Super Repelex	11 %	Aerossol	4 h	≥ 12 anos
Geraniol: 20 % Óleo de Soja: 5 % Alecrim: 0,8 % Menta: 0,9 % Óleo de Gerânio: 0,1%	Bug Band	26,8% (ativos)	Spray	Até 3h	≥ 6 meses

*Informação sobre a concentração do ativo não informada.

Dentre os repelentes sintéticos, o DEET é o mais antigo e eficiente, porém, dentre todos, ele é o mais tóxico, elevando a idade mínima de aplicação, não indicando seu uso em crianças e bebês. Como alternativa quanto a toxicidade, utiliza-se a icaridina (Picaridin) e o IR3535. Sendo este último o menos tóxico, podendo ser prescrito para crianças a partir dos seis meses e para mulheres grávidas. Já a icaridina tem a ação mais próxima ao DEET. Ela é a que possui maior tempo de ação entre os repelentes, devido a sua volatilidade menos rápida (TAVARES *et al.*, 2018).

Neste contexto, o uso de repelentes vem ganhando mercado, pois, como mencionado, é uma importante forma de redução efetiva dos casos de infecções provocadas pelo vetor *Aedes aegypti*. E, para que os resultados almejados sejam alcançados de forma duradoura e eficaz, torna-se necessário o desenvolvimento de sistemas repelentes que sejam mais eficazes e que tenham uma ação prolongada.

Segundo TAVARES *et al.* (2018), os repelentes de longa duração já começaram a se inserir no mercado. Esses são formulados em sistemas que compreendem as microcápsulas, as nanocápsulas, as micro e nanopartículas lipídicas sólidas, também as micro e nanoemulsões, em lipossomas e niossomas, nos hidrogéis poliméricos e ciclodextrinas nanoestruturadas. Cujos sistemas permitem a liberação mais controlada do ativo de interesse. A Tabela 2 traz dois repelentes que são compostos por icaridina nanoencapsulada.

Tabela 2: Alguns repelentes disponíveis no mercado com o ativo icaridina, baseados em sistemas de liberação sustentada.

REPELENTES – Liberação sustentada					
Ativo	Marca comercializada	Concentração	Apresentação	Ação (tempo)	Idade permitida
ICARIDINA	Cutisanol	5,5 %	Spray	Até 6 horas	≥ 6 meses
	Granado Bebe	25 %	Spray	6 – 8 horas	≥ 6 meses

Segundo a Tabela 2, o “Repelente Granado – longa duração”, com 25 % de icaridina encapsulada, promete de 6 a 8 horas de proteção, sendo 6 horas de proteção contra o *Aedes aegypti* e 8 horas contra o *Anopheles albimanus* e o *Culex quinquefasciatus*. Também, tem-se a disposição no mercado o repelente “Cutisanol”, fabricado pela MRpharma, que promete alta eficácia por meio da liberação prolongada, garantindo 6 horas de proteção contra o *Aedes aegypti*, o *Anopheles albimanus* e o *Culex quinquefasciatus*, com 5,5 % do ativo icaridina encapsulado. Ambos são comercializados na forma de spray e permitem o uso em bebês a partir de 6 meses de idade. Nota-se, ainda, que no caso do Cutisanol, a quantidade do ativo é bem reduzida e o tempo de duração é bastante longo em relação a concentração. Isso fica mais evidente se comparar com os repelentes do mesmo ativo na Tabela 1, cujos não são encapsulados.

Essas inovações mostram que recorrer ao uso da nanotecnologia se faz uma importante opção, uma vez que a encapsulação colabora para minimizar efeitos dos ativos aos organismos não alvos, por reduzir sua toxicidade. Além de garantir a eficácia da ação desse ativo durante o tempo de ação, resultante da liberação sustentada. Isso reflete que o desenvolvimento de produtos de base nanotecnológica pode ser alcançado combinando-se

ciência básica com abordagens tecnológicas, para se considerar interações entre diferentes fenômenos e conseguir chegar a soluções eficientes para os problemas.

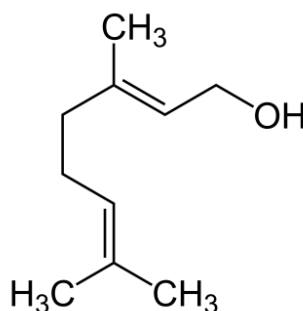
1.2.1.1 Geraniol

Os óleos essenciais são misturas de compostos orgânicos voláteis que se fazem presentes em plantas. Eles são liberados, como forma de defesa, em momentos que as plantas sofrem agressões. E, o geraniol (3,7-dimethilocta-trans-2,6-dien-1-ol) (Figura 1) é um constituinte comum de vários óleos essenciais, como o de citronela, palmarosa, rosas, dentre outros (SHARMA *et al.*, 2013). O geraniol é, portanto, amplamente usado como um produto químico em fragrâncias cosméticas e para uso no lar (RASTOGI *et al.*, 2001).

Além de apresentar baixa toxicidade, suas propriedades efetivas como repelente e inseticida para o controle de pragas, apresentaram boa atividade quimiopreventiva, assim como propriedades antimicrobianas, antioxidantes e anti-inflamatórias. Portanto, as propriedades promotoras do geraniol incentivam estudos a fim de explorar e viabilizar formulações de produtos contendo este composto (GOVINDARAJAN *et al.*, 2016; MISNI *et al.* 2016).

Ressaltando que o geraniol, como produto que provém de óleos essenciais, possui elevada volatilidade, que é ainda mais acelerada com o aumento da temperatura. Por isso, ele possui curto tempo de ação. A nanotecnologia vem a favor tentando melhorar tal fato, aumentando o tempo de ação desse produto, criando nanoemulsões, para que esse óleo consiga ser liberado de forma mais lenta, além de garantir um espalhamento mais eficiente na superfície da pele de uma pessoa (TAVARES *et al.*, 2018).

Figura 1: Fórmula estrutural do geraniol.

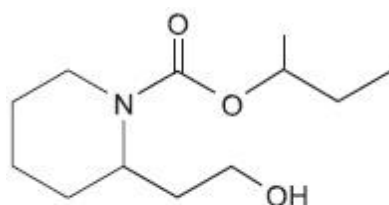


1.2.1.2 Icaridina

O ativo icaridina (1-piperidine-carboxylic acid 2-2 hydroxymethyl-1-methylester), representado na Figura 2, também, é conhecido como Picaridin ou KBR023. Se apresenta na forma de um óleo volátil e, dentre as opções de ativos disponíveis, é o mais indicado para atividade repelente, pois, apresenta um extenso campo de alcance e possui um tempo maior de ação. Sendo destacado nos rótulos dos repelentes atualmente comercializados, que possui ação de até 12 horas. Lembrando que a icaridina é favorecida pela propriedade de que, quando ela entra em contato com a pele, ela evapora mais devagar em relação aos outros repelentes. Evidencia-se, também, que a icaridina é o ativo mais indicado que o DEET para controle de infecções causadas por *Aedes aegypti* em humanos (TAVARES *et al.*, 2018; ABDEL-GHAFFAR *et al.* 2015).

Embora a concentração de icaridina abaixo de 5 % também apresente repelência, as formas clássicas de repelentes com tal ativo não apresentam uma concentração abaixo de 5 % em uma formulação. Sendo a concentração diretamente proporcional ao seu tempo de ação. Portanto, para uma concentração de 5 a 10 % de icaridina, obtém-se de 3 a 5 horas de ação repelente. Se for 20 %, a ação sobe para até 10 horas (TAVARES *et al.*, 2018). Porém, várias formulações com icaridina aparecem em alta concentração na composição final do repelente, podendo chegar em torno de 30 %, e acabar sendo tóxico aos organismos considerados não alvos, neste caso, os próprios seres humanos (ABDEL-GHAFFAR *et al.* 2015). Ressaltando a possibilidade de ela causar irritação na pele de humanos (DIAZ, 2016).

Figura 2: Fórmula estrutural da icaridina.



1.2.2 Nanotecnologia em benefício às formulações de repelentes

A nanotecnologia tem aplicação em diversas áreas, como na agricultura, na saúde, nos cosméticos, dentre outras. Por isso, investimentos nessa área têm crescido bastante, e em diferentes países. Isso, tanto por empresas, quanto por seus governos (SANT'ANNA *et al.*, 2013).

A nanotecnologia vem cada vez mais se destacando, pois surge beneficiando a ação de formulações quanto ao aumento da estabilidade e da eficácia das mesmas nas mais diversas áreas, como, na agricultura, na elaboração de inseticidas botânicos para controle de pragas, o que reduz riscos a saúde, pois se evita o uso excessivo de agrotóxicos, favorecendo o ambiente e os organismos não alvos (GHORMADE *et al.*, 2011).

Nesse contexto, a nanotecnologia vem favorecendo, também, inovações em formulações eficientes de repelentes de uso humano contra insetos. Dentre elas, o desenvolvimento de formulações de repelentes de longa duração por meio de encapsulamento dos ativos de interesse em nanopartículas, permitindo a liberação lenta, aumentando, conseqüentemente, a durabilidade desses repelentes e, reduzindo, ainda, a quantidade de ativos aplicada para a obtenção da proteção de forma eficaz (PUJASTUTI *et al.*, 2017).

A elaboração de formulações de nanopartículas de repelentes engloba um universo extenso de materiais no seu preparo, além das diferentes substâncias, os chamados ativos, nesse caso, os repelentes (KAH *et al.* 2013). E, ao se aplicar as formulações com os repelentes nanoencapsulados sobre a superfície da pele, inicia-se um processo de liberação dos ativos, que vai se volatilizando para o ambiente ao redor da região aplicada. E o ativo passa a se volatilizar a partir das nanopartículas de forma sustentada, mantendo a eficiência ao longo de um período de tempo, de acordo com o ativo escolhido e de sua concentração. Também, a nanoencapsulação permite menor exposição do repelente diretamente na pele e, a conseqüente redução da permeação do ativo nela. Além de, devido ao aumento do tempo de ação, resulta em menos reaplicações da formulação sobre a pele (LI *et al.*, 2014).

No caso do ativo livre em solução, existe a facilidade de ele permear a camada superficial da pele ultrapassando-a, podendo chegar até a derme, que é ricamente irrigada por vasos sanguíneos, levando a uma distribuição do ativo para dentro do corpo da pessoa. Situação que é bastante minimizada quando ocorre o encapsulamento desse ativo. O nanoencapsulamento do composto ativo colabora, também, para promover uma proteção do

repelente, evitando sua volatilização, pois, protege da luz, calor, da oxidação, da umidade do ar, a qual pode resultar da degradação do ativo, ou seja, as nanopartículas acabam protegendo de uma degradação antecipada dos repelentes (TAVARES *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2014).

Embora exista a possibilidade do encapsulamento de ativos diferentes conjuntamente, se faz importante ressaltar a possibilidade de se encapsular mais de um repelente de interesse de forma individualizada. Essas possibilidades permitem uma associação de ativos, com o objetivo de também usufruir das propriedades dos diferentes componentes, que permitirão, por consequência, uma ação mais ampla sobre o indivíduo a ser protegido, aumentando-se, assim, o espectro de ação, ou seja, a eficácia concomitante, dos ativos encapsulados.

Dessa forma, repelentes desenvolvidos por meio da nanotecnologia, permitem maior eficiência de proteção contra insetos, reduzindo a disseminação de arboviroses, como o Zika vírus, pois, evita de forma eficaz por mais tempo a picada do mosquito, reduzindo intensas reaplicações de repelentes, se tornando ideal para organismos não alvos. Além de apresentar bastante interesse no âmbito ecológico, o sistema de liberação controlada de ativos se faz muito importante no âmbito econômico também, pois embora seja mais custoso que uma formulação clássica, apresenta ação de prevenção imediata e prolongada, o que reduz gastos e ações mais intensas no tratamento de pessoas infectadas com alguma das arboviroses, decorrentes da não prevenção (PUJIASTUTI *et al.*, 2017).

1.2.2.1 Nanopartículas de Zeína

A proteína zeína compõe pouco mais da metade de todas as proteínas presentes no milho. A zeína provém do endosperma, o qual confere a dureza que este grão possui, sendo denominada proteína de reserva (SHUKLA; CHERYAN, 2001). Segundo Paliwal e Palakurthi (2014), ela faz parte da classe das prolaminas, ocorridas somente nos cereais. O que a caracteriza como material de baixo custo.

A zeína é considerada uma das proteínas mais hidrofóbicas encontradas em cereais, tendo sua hidrofobicidade em cerca de $1,365 \text{ J.mol}^{-1}$. O que é resultante da sequência de aminoácidos que a compõe, que possuem resíduos apolares. Estando presente em cerca de 70 % na molécula, sendo eles: a alanina, a glutamina, a leucina e a prolina (HOLDING e LARKINS, 2009). Tal característica faz com que esta proteína não se solubilize nem em água

e nem em álcool puros, sendo necessário o preparo de uma solução que permita sua solubilidade. Geralmente, utiliza-se uma solução hidroetanólica a 85 % sob agitação de várias horas (podendo ser necessária agitação *over night*), ou pode-se promover esta solubilização com outras soluções, como com a acetona (SOUSA *et al.*, 2013).

O método de precipitação anti solvente é bastante utilizado, em que causa a formação das partículas coloidais. Isso acontece modificando a capacidade de solubilização referente ao solvente primário, por meio da diluição em um não solvente (PATEL; VELIKOV, 2014).

Essa característica hidrofóbica da zeína permite que ela se comporte feito um filme que não permite a passagem de água, porém, que possui as particularidades de ser biodegradável, com flexibilidade, bastante resistente, biocompatível, além de ser antimicrobiano e possuir baixa toxicidade. Essas características permitem empregá-la como estrutura de revestimento (PALIWAL; PALAKURTHI, 2014; SHUKLA; CHERYAN, 2001). Tal proteína, devido ao seu núcleo apolar, também, se faz interessante na elaboração de sistemas na entrega de fármacos ou nutrientes (KIM; XU, 2008). Acrescente-se, a facilidade em se fabricar, a partir da zeína, as nanopartículas (LUO; WANG, 2014).

Oliveira e seus colaboradores (2018) obtiveram resultados satisfatórios utilizando as nanopartículas de zeína. Inicialmente, prepararam nanopartículas de zeína com o intuito de utilizá-la como sistemas de transporte ecologicamente correto dos repelentes botânicos, o geraniol e o R-citronealal. Tudo isso com a finalidade de se reduzir a degradabilidade precoce desses ativos. Realizaram o teste para saber se com a liberação sustentada, seriam necessárias menores quantidades dos repelentes, o que reduziria danos aos organismos não alvos e ao meio ambiente. Realizaram, também, os testes de fitotoxicidade e citotoxicidade. Seus resultados mostraram que a encapsulação pelas nanopartículas de zeína foram bastante elevadas para os dois repelentes, sendo acima de 90 %, além da boa estabilidade físico-química. A proteção contra a degradação por UV, resultante do nanoencapsulamento, foi garantida. Além do encapsulamento por nanopartículas de zeína terem reduzido efetivamente a toxicidade dos repelentes botânicos, garantindo um ótimo efeito no controle de pragas.

Já no caso da utilização das nanopartículas de zeína direcionadas na liberação sustentada de repelente de insetos, ela se faz uma alternativa interessante, principalmente, por possuírem baixa toxicidade e serem biocompatíveis. Isso se dá devido ao seu emprego no interesse de encapsular individualmente os compostos de ação repelente de uso tópico. Sendo,

Também, para acompanhar a associação dos repelentes às nanopartículas de zeína, realizou-se a análise de espectros na região do infravermelho. Ressalta-se que todas as formulações das nanopartículas apresentaram morfologia esférica, de acordo com a análise de microscopia, e as formulações com geraniol nas concentrações de 2 e 3 %, resultaram num diâmetro médio de 248 ± 5 nm e 343 ± 7 nm, já as nanopartículas contendo 4 e 5 % de icaridina resultaram em 158 ± 5 nm e 155 ± 6 nm, respectivamente. Já a formulação mista, apresentou 206 ± 4 nm de diâmetro médio. Assim, notou-se que houve intensa variação na distribuição do tamanho das partículas, corroborando com a análise do índice de polidispersão, de 0,2 a 0,4 para essas partículas. Para o diâmetro hidrodinâmico, nota-se que as formulações com geraniol (NP_GRL 2 %: 250 ± 1 nm; NP_GRL 3 %: 329 ± 5 nm), ao longo do tempo, sofreu um aumento, ao contrário das formulações com icaridina (NP_ICA 4 % e NP_ICA 5 %: aproximadamente 150 nm) que teve seu diâmetro médio estável, em função do tempo. A formulação mista (NP_ICA 2,5 % + GRL 1,5 %: cerca de 200 nm) teve um aumento no diâmetro médio ao decorrer 15 dias, porém, com o passar do tempo de análise, retornou ao tamanho inicial, mantendo, então, a estabilidade. Também, apresentou o potencial zeta positivo em função do tempo para todas as formulações. Sendo que todas as formulações analisadas se mantiveram, praticamente, estáveis ao longo do tempo.

Afirma-se, assim, que mesmo com alterações significativas referentes ao tamanho e a polidispersão, durante o período de estabilidade acompanhado, não houve aparecimento de nova população de partículas, mas sim certo rearranjo de tamanho com o decorrer do tempo, podendo decorrer do fenômeno de Ostwald Ripening, conforme, também, se evidencia nas análises de rastreamento de nanopartículas. Dessa forma, tal estabilidade também observada na formulação mista, indica que a zeína é uma excelente opção de nanopartícula no carreamento dos ativos combinados.

Somada à essas análises, acompanhou-se, também, o perfil da cinética de liberação, o qual apresentou-se com uma liberação mais rápida do ativo icaridina, cujo apresentou uma liberação de 50 % em duas horas e o geraniol necessitou de 36 horas para liberar a mesma quantidade de ativo. O perfil de liberação se delineou bifásico em todas as análises, tendo uma liberação inicial intensa, seguida por uma liberação sustentada ao longo do tempo, atendendo ao destino da formulação, que é a ação imediata do repelente, porém, sustentada de forma eficaz ao longo do tempo, garantindo a repelência. Sendo, nesse caso, essa liberação sustentada mais incisivamente pelo geraniol residual nas horas finais do repelente.

O mecanismo de liberação melhor ajustado foi pelo modelo matemático Korsmeyer-Peppas, cujo coeficiente de correlação (r^2) foi o mais próximo a 1, em relação aos outros modelos. Observando-se que no caso da formulação mista, a liberação da icaridina se deu por difusão, e a do geraniol ocorreu por transporte anômalo

Salienta-se, também, que, após as dopagens das formulações mistas com concentrações diferentes de icaridina livre, ocorreram algumas variações nas análises de tamanho médio, PDI e do potencial zeta, porém, não descaracterizaram as formulações de nanopartículas.

Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram alcançados com a realização do desenvolvimento e caracterização de sistemas carreadores fazendo uso de nanopartículas de zeína, contendo os repelentes icaridina e geraniol encapsulados individualmente. Obteve-se, assim, um sistema mais eficiente e prolongado, que usufrui dos efeitos sinérgicos dos dois ativos, focados na repelência do *Aedes aegypti*, evitando-se, mais eficazmente, as arboviroses por ele propagadas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. *et al.* Integrated strategies for the control and prevention of Dengue vectors with particular reference to *Aedes aegypti*. *Pakistan Veterinary Journal*. v. 34. p.1-10. 2014.
- ABDEL-GHAFFAR F., AL-QURASHY S., MEHLHORN H. Length of tick repellency depends on formulation of the repellente compound (icaridin=Saltidin): tests on *Ixodes persulcatus* and *Ixodes ricinus* placed on hands and clothes. *Parasitol Res*. v.114. p.3041-3045. 2015.
- ABDELLATIF A.A.H. *et al.* Hydrogel containing PEG-Coated fluconazole nanoparticles with enhanced solubility and antifungal activity. *Pharm Innov*. 2018.
- ABREU, F.O.M.S. *et al.* Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation. *Carbohydrate Polymers*. v. 89. p. 1277–1282. 2012.

- ANDERSON, W. *et al.* A comparative study of submicron particle sizing platforms: Accuracy, precision and resolution analysis of polydisperse particle size distributions. *Journal of Colloid and Interface Science*. v.405. p.322–330. 2013.
- ANVISA. Manual de protocolos para testes de eficácia em produtos desinfestantes (2007). Disponível em <<http://www.crq4.org.br/downloads/desinfestantes.pdf>> Acessado em 22 abr. 2017.
- ANVISA, RDC N° 59, de 17 de Dezembro de 2010.
- ANVISA. Resolução - Resolução nº 899. Brasília. 2003
- ATKINS, P. W.; JONES, LORETTA. Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente. 5.ed. *Bookman*. 2012.
- ATTAR, N. Zika virus circulates in new regions. *Nature Reviews Microbiology*. v.14. p.62. 2016.
- AVADI, M.R. *et al.* Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. v.6. p.58–63. 2010.
- BARRETT, A.D.T. Current status of Zika vaccine development: Zika vaccines advance into clinical evaluation. *NPJ Vaccines*. v.3. p.1-4. 2018.
- BAZO, A. *et al.* Nanoparticles for the encapsulation of compounds, preparation there of and use of same. Patent Application Publication. Pub. No.: US 2013/0209530 A1. 2013.
- BEDOYA-ARIAS J.E. *et al.*; Healthcare students and workers' knowledge about epidemiology and symptoms of Chikungunya fever in two cities of Colombia. *J Infect Dev Ctries*. v.9. p.330-332. 2015.
- BENELLI, G. Research in mosquito control: Current challenges for a brighter future. *Parasitology Research*. v. 114. p.2801–2805. 2015.
- BENELLI, G. Spread of Zika vírus: the key role of mosquito vector control. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. v.6.p.468-471. 2016.

- BENELLI, G.; MEHLHORN, H. Declining Malaria, rising of Dengue and Zika virus: insights for mosquito vector control. *Parasitology Research*. v.115. p.1747-1754. 2016.
- BOGOCH, I.I. *et al.* Anticipating the international spread of Zika virus from Brazil. *The Lancet*. v.387. p.335–336. 2016.
- BOYD, R. D.; PICHAIMUTHU, S. K.; CUENAT, A. New approach to inter-technique comparisons for nanoparticle size measurements; using atomic force microscopy, nanoparticle tracking analysis and dynamic light scattering. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. v.387. p.35–42. 2011.
- BRADY, O.J. *et al.* Global temperature constraints on *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* persistence and competence for Dengue virus transmission. *Parasites & Vectors*. v.7. p.338. 2014
- BRASIL (a); Monitoramento dos casos de Dengue, febre de Chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 7. *Boletim Epidemiológico: Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde*. v.49. n.9. 2018. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/marco/06/2018-008-Publicacao.pdf>> Acessado em 18 jun. 2018.
- BRASIL (b); Monitoramento integrado de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionadas à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, até a Semana Epidemiológica 48 de 2017. *Boletim Epidemiológico: Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde*. v.49. n.3. 2018. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/30/2018-002.pdf>> Acessado em 02 jun. 2018.
- BRASIL. Saúde divulga primeiro caso de Zika no país. 2016. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/23384-saude-divulga-primeiro-balanco-com-casos-de-zika-no-pais>> Acessado em 12 fev. 2017.
- BRASIL. Brasil está livre do surto de Febre Amarela. 2017. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2017/09/brasil-esta-livre-do-surto-de-febre-amarela>> Acessado em 18 dez.2017.

- BRASIL. Vacina da Dengue - Perguntas e respostas. *Secretaria da Saúde: Paraná*. 2017. Disponível em: <<http://www.saude.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=3128>> Acessado em 12 jan 2018.
- BRASIL. 2016. <<http://combateaedes.saude.gov.br>> Acessado em 22 nov. 2017.
- BRASIL, P. *et al.* Zika virus infection in pregnant women in Rio de Janeiro. *The New England Journal of Medicine*. v.375. p.2321-2334. 2016.
- CAMPOS, E.V. *et al.* Polymeric and solid lipid nanoparticles for sustained release of Carbendazim and Tebuconazole in agricultural applications. *Scientific Reports*. v.5. p.13809-13823. 2015.
- CAO-LORMEAU, V. M. *et al.* Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *J. The Lancet*. v.387. p.1531-1539. 2016.
- CHANG, A.Y. *et al.* Combining google earth and GIS mapping technologies in a Dengue surveillance system for developing countries. *International Journal of Health Geographics*. v.8. p.1-11. 2009.
- CHANG, C. *et al.* The Zika outbreak of the 21st century. *Journal of Autoimmunity*. v.68. p.1-13. 2016.
- CHANG, Y., MCLANDSBOROUGH, L., MCCLEMENTS, D.J. Physicochemical properties and antimicrobial efficacy of carvacrol nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. *J. Agric. Food Chem*. v.61. p.8906–8913. 2013.
- CHEN, H.; ZHONG, Q. A novel method of preparing stable zein nanoparticle dispersions for encapsulation of peppermint oil. *Food Hydrocolloids*. v. 43. p.593–602. 2015.
- CHEN, J. *et al.* Tangeretin-loaded protein nanoparticles fabricated from zein/ β -lactoglobulin: preparation, characterization, and functional performance. *Food Chemistry*. v.158. p.466–472. 2014.
- CHUACHAROEN, T.; SABLIOV, C.M. Stability and controlled release of lutein loaded in zein nanoparticles with and without lecithin and pluronic F127 surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. v.503. p.11–18. 2016.

- COES, Centro de Operações de Emergências em Saúde Pública sobre Microcefalias. <<http://combateaedes.saude.gov.br/pt/situacao-epidemiologica>> Acessado em 07 mar. 2017.
- COSTA, C.; LOBO, J.M.S. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. v.13. p.123–133. 2001.
- DA ROSA, C.G. *et al.* Characterization and evaluation of physicochemical and antimicrobial properties of zein nanoparticles loaded with phenolics monoterpenes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. v.481. p.337–344. 2015.
- DAVIDOV-PARDO, G. *et al.* Effect of Maillard Conjugates on the physical stability of zein nanoparticles prepared by liquid antisolvent coprecipitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v.63. p.8510–8518. 2015.
- DCI. Demanda por repelente salta no Brasil por medo do Zika vírus e fabricante eleva produção. 2016. Disponível em <<http://www.dci.com.br/industria/demanda-por-repelente-salta-no-brasil-por-medo-do-zika-virus-e-fabricante-eleva-producao-id525753.html>> Acessado em 30 jan. 2017.
- DE MELO, N.F.S. *et al.* Poly(lactide-co-glycolide) nanocapsules containing benzocaine: influence of the composition of the oily nucleus on physico-chemical properties and anesthetic activity. *Pharm. Res.* v.28. p.1984–1994. 2011.
- DE OLIVEIRA, J.L. *et al.* Zein nanoparticles as eco-friendly carrier systems for botanical repellents aiming sustainable agriculture. *J. Agric. Food Chem.* v.66. p.1330–1340. 2018.
- DE OLIVEIRA, J.L. *et al.* Solid lipid nanoparticles co-loaded with simazine and atrazine: preparation, characterization, and evaluation of herbicidal Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v.63. p.422–432. 2015.
- DE OLIVEIRA, J.L. *et al.* Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: prospects and promises. *Biotechnology Advances*. v.32. p.1550–1561. 2014.

- DIAZ, J.H. Chemical and plant-based insect repellents: efficacy, safety, and toxicity. *Wilderness & Environmental Medicine*. v.27. p.1-11. 2016.
- ENFISSI, A. *et al.* Zika virus genome from the Americas. *The Lancet*. v.387. p.227–228. 2016.
- FAUCI, A.S.; MORENS, D. M. Zika virus in the Americas - Yet another arbovirus threat. *The New England Journal of Medicine*. v.374. p.601-604. 2016.
- FILIPE, V.; HAWES, A.; JISKOOT, W. Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharmaceutical Research*. v.27. p.796–810. 2010.
- FONSECA, Z.A.; FERREIRA, C.G.; AHID, S.M.M. Ectoparasitas de ruminantes na região semi-árida do Rio Grande do Norte, Brasil. *Acta Veterinaria Brasilica*. v.3. p.141–145. 2009.
- GARCÍA, G. *et al.* Long-term persistence of clinical symptoms in Dengue-infected persons and its association with immunological disorders. *International Journal of Infectious Diseases*. v.15. p.38-43. 2011.
- GARDNER, C.L.; RYMAN, K.D. Yellow Fever: A reemerging threat. *Clinics in Laboratory Medicine*. v.30. p.237-260. 2010.
- GHORMADE, V. *et al.* Perspectives for nano-biotechnology enabled protection and nutrition of plants. *Biotechnology Advances*. v.29. p.792–803. 2011.
- GINIER, M. *et al.* Zika without symptoms in returning travellers, what are the implications. *Travel Medicine and Infectious Disease*. v.14. p. 16-20. 2016.
- GIRIJA ASWATHY, R. *et al.* Biocompatible fluorescent zein nanoparticles for simultaneous bioimaging and drug delivery application. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*. v.3. p.1-7. 2012.
- GLORIA-SORIA, A. *et al.* Origin of the Dengue FEVER MOSQUITO, *Aedes aegypti*, in California. *PLoS Negl Trop Dis*. v.8. p.1-6. 2014.

- GOVINDARAJAN, M. *et al.* Larvicidal and repellent potential of *Zingiber nimmonii* (J. Graham) Dalzell (Zingiberaceae) essential oil: an eco-friendly tool against Malaria, Dengue, and lymphatic filariasis mosquito vectors? *Parasitology Research*. v.115. p.1807-1816. 2016.
- GRILLO, R. *et al.* Chitosan/tripolyphosphate nanoparticles loaded with paraquat herbicide: an environmentally safer alternative for weed control. *Journal of Hazardous Materials*. v.278. p.163–171. 2014.
- GRILLO, R. *et al.* Poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules as carriers systems for herbicides: Physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. *J. Hazard. Mater.* v.231. p.1-9. 2012.
- GRILLO, R. *et al.* Validation of an HPLC method for quantitative determination of benzocaine in PHBV-microparticles and PLA-nanoparticles. *Lat. Am. J. Pharm.* v.28 p.393–399. 2009.
- GUBLER, D.J. Dengue/Dengue Haemorrhagic Fever: History and current status. *New Treatment Strategies for Dengue and other Flaviviral Diseases: Novartis Foundation Symposium*. v.277. p.3-21. 2008.
- G1. Medo do *Aedes* faz venda de repelente disparar e impulsiona novos negócios. 2017. Disponível em <<http://g1.globo.com/economia/noticia/medo-do-aedes-faz-venda-de-repelente-disparar-e-impulsiona-novos-negocios.ghtml>> Acessado em: 29 abr. 2017.
- HOLDING, D.R.; LARKINS, B.A. Zein storage proteins. *Molecular Genetic Approaches to Maize Improvement*. Springer. v.63. p. 269-286. 2009.
- HU, K.; MCCLEMENTS, D. J. Fabrication of surfactant-stabilized zein nanoparticles: A pH modulated antisolvent precipitation method. *Food Research International*. v.64. p.329–335. 2014.
- INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos - DOC CGRE-008, Brasília, 2011. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf> Acessado em: 29 abr. 2017.

- IOSS, S. *et al.* Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Médecine et Maladies Infectieuses*. v.44 .p.302-307. 2014.
- IOVINELLA, I.; PELOSI, P., CONTI, B. A rationale to design longer lasting mosquito repellents. *Parasitology Research*. v.113. p.1813-1820. 2014.
- KAH, M. *et al.* Nanopesticides: State of knowledge, environmental fate, and exposure modeling. *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.* v.43. p.1823–1867. 2013.
- KORSMEYER, R.W. *et al.* Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int. J. Pharm.* v. 15. p.25-35. 1983.
- KIM, S.; XU, J. Aggregate formation of zein and its structural inversion in aqueous ethanol. *Journal of Cereal Science*. v. 47. p.1–5. 2008.
- KIMNA, C. *et al.* Novel zein-based multilayer wound dressing membranes with controlled release of gentamicin. *Journal of Biomedical Materials Research part b: Applied Biomaterials*. p.1-14. 2018.
- KISTLER, K.E. *et al.* Genome engineering with CRISPR-Cas9 in the mosquito *Aedes aegypti*. *Cell Reports*. v. 11. p.51-60. 2015.
- KROEBER, T.; BOURQUIN, M.; GUERIN, P. M. A standardised *in vivo* and *in vitro* test method for evaluating tick repellents. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. v.107. p.160-168. 2013.
- LANDRY, K.S. *et al.* Effectiveness of a novel spontaneous carvacrol nanoemulsion against *Salmonella enterica* Enteritidis and *Escherichia coli* O157:H7 on contaminated mung bean and alfalfa seeds. *International Journal of Food Microbiology*. v.187. p.15–21. 2014.
- LI, Y. *et al.* Optimization of controlled release nanoparticle formulation of verapamil hydrochloride using artificial neural networks with genetic algorithm and response surface methodology. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. v.94. p.170–179. 2015.
- LI, Y. *et al.* Heat-resistant sustained-release fragrance microcapsules. *J. Appl. Polym.* v.131. p.1-7. 2014.

- LI, Y. *et al.* PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats. *J. Controlled Release*. v.71. 203-211. 2001.
- LIMA-CAMARA, T.N. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. *Rev. Saude Publ.* v.50. p.1-7. 2016.
- LIMA, E.O. *et al.* MALDI imaging detects endogenous digoxin in glioblastoma cells infected by Zika virus—Would it be the oncolytic key? *Journal of Mass Spectrometry*. v.53. p.257-263. 2018.
- LOPES, J. *et al.* An ecological study of the mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* L. and associated culicifauna in an urban area of southern Brazil. *Rev. Saúde Pública*. v.27. p.326-333. 1993.
- LUO, Y.; WANG, Q. Zein-based micro- and nano-particles for drug and nutrient delivery: A review. *Journal of Applied Polymer Science*. v.131. p.1-12. 2014.
- LUPI, E.; HATZ, C.; SCHLAGENHAUF, P. The efficacy of repellents against *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* and *Ixodes* spp. - A literature review. *Travel Medicine and Infectious Disease*. v.6. p.374-411. 2013.
- MARIA, D.N. *et al.* Water-soluble complex of curcumin with cyclodextrins: Enhanced physical properties for ocular drug delivery. *Current Drug Delivery*. v.14. p.875-886. 2017.
- MCCLEMENTS, D.J. Advances in fabrication of emulsions with enhanced functionality using structural design principles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. v.17. p.235-245. 2012.
- MELO, C.F.O.R. *et al.* A machine learning application based in random forest for integrating mass spectrometry-based metabolomic data: A simple screening method for patients with Zika virus. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. v.6. p.1-11. 2018.
- MISNI, N., NOR, Z. M., AHMAD, R. New candidates for plant-based repellents against *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*. v.32. p.117-123. 2016.
- MONATH, T.P. Treatment of yellow fever. *Antiviral Research*. v.78. p.116-124. 2008.

- MORAES, C.M. *et al.* Screening of formulation variables for the preparation of poly (epsilon-caprolactone) nanocapsules containing the local anesthetic benzocaine. *J. Nanosci. Nanotechnol.* v.11. p.2450–2457. 2011.
- MUSSO, D. *et al.* Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *CMI: Clinical Microbiology and Infection.* v.20. p.O595–O596. 2014.
- NIAID. NIH Begins clinical trial of live, attenuated Zika vaccine. 2018. Disponível em: <<https://www.niaid.nih.gov/news-events/nih-begins-clinical-trial-live-attenuated-zika-vaccine>> Acessado em: 27 set 2018.
- PALIWAL, R.; PALAKURTHI, S. Zein in controlled drug delivery and tissue engineering. *Journal of Controlled Release.* v. 89. p.108–122. 2014.
- PATEL, A.R.; VELIKOV, K.P. Zein as a source of functional colloidal nano-and microstructures. *Current Opinion in Colloid & Interface Science.* v.19. p.450–458. 2014.
- PATEL, A.R. *et al.* Synthesis and characterisation of zein–curcumin colloidal particles. *Soft Matter.* v.6. p.6192–6199. 2010.
- PATEL, A.R.; BOUWENS, E.C.M.; VELIKOV, K.P. Sodium caseinate stabilized zein colloidal particles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* v.58. p.12497–12503. 2010.
- PEREIRA, A.E.S. *et al.* Application of poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles containing atrazine herbicide as an alternative technique to control weeds and reduce damage to the environment. *Journal of Hazardous Materials.* v.268. p.207–215. 2014.
- PETERSEN *et al.* Zika virus. *The New England Journal of Medicine.* v.374. p.1552-1563. 2016.
- PODARALLA, S.; PERUMAL, O. Influence of formulation factors on the preparation of zein nanoparticles. *AAPS PharmSciTech*, v. 13, n. 3, p. 919–927, 2012.
- Portal da Câmara dos Deputados. Proposta de Carletto obriga o SUS a fornecer repelente a grávidas e lactantes. 2016. Disponível em: <<http://www2.camara.leg.br/camaranoticias/noticias/SAUDE/508415-PROPOSTA->

DE-CARLETTTO-OBRIGA-O-SUS-A-FORNECER-REPELENTE-A-GRAVIDAS-ELACTANTES.html> Acessado em 17 out. 2017.

- PUJASTUTI, A. *et al.* Encapsulation of Citronellal from Citronella Oil using β -Cyclodextrin and its application as mosquito (*Aedes aegypti*) Repellent. *Journal of Physics: Série de Conferências*. v. 824. p.1-6. 2017.
- PULENDRAN, B. *et al.* Case of Yellow Fever vaccine-associated viscerotropic disease with prolonged viremia, robust adaptive immune responses, and Polymorphisms in CCR5 and RANTES Genes. *The Journal of Infectious Diseases*. v.198. p.500–507. 2008
- RAGEL, C.V.; VALLET-REGÍ, M. In vitro bioactivity and gentamicin release from glass–polymer–antibiotic composites. *J Biomed Mater Res A*. v.51. p.424–429. 2000.
- RAMOS, I.M.F.C. Nanopartículas poliméricas funcionalizadas para liberação de fármaco no sistema nervoso central. *COPPE UFRJ*. 2018.
- RASTOGI, S.C. *et al.* Fragrance chemicals in domestic and occupational products. *Contact Dermatitis*. v.45. p.221–225. 2001
- RATHER, I.A. *et al.* Prevention and control strategies to counter Dengue virus infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. v.7. p.1-8. 2017
- RICHARDS, S.L. *et al.* Vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) for Dengue virus in the Florida Keys. *Journal of Medical Entomology*. v.49. p.942-946. 2012.
- SANT’ANNA, L.D.S. *et al.* Patenteamento em Nanotecnologia no Brasil: Desenvolvimento, potencialidades e reflexões para o meio ambiente e a saúde humana. *Quím. Nova*. v.36. p.348-353. 2013.
- SCHAFFAZICK, S.R. *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim. Nova*. v.26. p.726-737. 2003.
- SHARMA, P.K. *et al.* Biochemical characteristics of a novel vegetative tissue geraniol acetyltransferase from a monoterpene oil grass (Palmarosa, *Cymbopogon martinii* var.

- Motia) leaf. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*. v.203. p.63–73. 2013.
- SHUKLA, R.; CHERYAN, M. Zein: the industrial protein from corn. *Industrial Crops and Products*. v.13. p.171–192. 2001.
- SIEPMANN, J.; PEPPAS, N.A. Modelling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced Drug Delivery Reviews*. v.48. p.139-157. 2001.
- SILVA, M.S. *et al.* Nanopartículas de alginato como sistema de liberação para o herbicida clomazone. *Química Nova*. vol.33. p.1868-1873. 2010.
- SIRC, J. *et al.* Controlled gentamicin release from multi-layered electrospun nanofibrous structures of various thicknesses. *International Journal of Nanomedicine*. v.7. p.5315-5325. 2012.
- SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. *Princípios de Análise Instrumental*. 6^a ed. Bookman. 2009.
- SOLOMONS, T.W.G. *et al.* Química Orgânica, 12^a ed. LTC. 2018.
- SOUSA, F.F.O. *et al.* Use of ¹H NMR STD, WaterLOGSY, and Langmuir monolayer techniques for characterization of drug–zein protein complexes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. v.85. p.790–798. 2013.
- SOUTO, E.B.; MÜLLER, R.H. Cosmetic features and applications of lipid nanoparticles (SLN® , NLC®). *International Journal of Cosmetic Science*. v.30. p.157–165. 2008.
- STAPLES, J.E.; FISCHER, M. Chikungunya virus in the Americas — What a Vectorborne pathogen can do. *N Engl J Med*. v.371. p.887-889. 2014.
- TAVARES, M. *et al.* Trends in insect repellent formulations: A review. *International Journal of Pharmaceutics*. v.539. p.190–209. 2018.
- TEICH, V.; ARINELLI, R.; FRAHHAM, L. *Aedes aegypti* e sociedade: o impacto econômico das arbovirose no Brasil. *J Bras Econ Saúde*. v.9. p.267-276. 2017.

- USP. Testes com vacina contra o vírus Zika dependem de voluntários. 2018. Disponível em: <<https://jornal.usp.br/universidade/testes-com-vacina-contr-o-virus-zika-dependem-de-voluntarios/>> Acessado em: 23 out 2018.
- VASCONCELOS, P.F.C. Yellow fever in Brazil: thoughts and hypotheses on the emergence in previously free areas. *Rev Saúde Pública*. v.44. p.1144-1149 .2010.
- WALKER, T *et al*. The wMel *Wolbachia* strain blocks Dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature: Nature Research*. v.476. p.450–453. 2011.
- WEAVER, S.C. Arrival of Chikungunya virus in the new World: Prospects for spread and impact on public health. *PLoS Negl Trop Dis*. v.8. p.1-4. 2014
- WONGKOON, S. *et al*. Climatic variability and Dengue virus transmission in Chiang Rai, Thailand. *Biomedica*. v.27. p.5–13. 2011.
- WONG, P.S.J. *et al*. *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse): A potential vector of Zika virus in Singapore. *PLOS Neglected Tropical Disease*. v.7. p.1-5. 2013
- WU, Y.; LUO, Y.; WANG, Q. Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid–liquid dispersion method. *LWT - Food Science and Technology*. v.48. p.283–290. 2012.
- XU, R. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. *Particuology*. v.6. p.112-115. 2008.
- ZHANG, Y. *et al*. Fabrication, characterization and antimicrobial activities of thymol-loaded zein nanoparticles stabilized by sodium caseinate–chitosan hydrochloride double layers. *Food Chemistry*. v.142. p.269–275. 2014.
- ZHANG, B.; LUO, Y.; WANG, Q. Development of Silver–Zein Composites as a Promising Antimicrobial Agent. *Biomacromolecules*. v.11. p.2366–2375. 2010.
- ZHANG, B.; LUO, Y.; WANG, Q. Effect of acid and base treatments on structural, rheological, and antioxidant properties of α -zein. *Food Chemistry*. v.124. p.210–220. 2011.