

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara

Camila Del Nero Pacheco

**Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados bioadesivos
com óleo de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) e estudo da ação repelente
frente a *Aedes aegypti***

Araraquara

2013

Camila Del Nero Pacheco

**Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados bioadesivos
com óleo de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) e estudo da ação repelente
frente a *Aedes aegypti***

Monografia

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica, da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara,
da Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”- UNESP para obtenção do grau de
Farmacêutica-Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Araraquara

2013

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Charles e Maria Madalena, que ajudaram na minha formação profissional, com todo amor e apoio.

E aos meus avós, Milton e Dorit, pela atenção, carinho e conselhos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares por todo amor, todos os ensinamentos, apoio durante estes anos de graduação, incentivo e por estarem ao meu lado sempre. Fizeram os meus sonhos se tornarem realidade!

Ao Prof. Dr. Marlus Chorilli pela oportunidade, atenção, ajuda e por toda sabedoria compartilhada. Sou muito grata por me proporcionar a realização deste trabalho!

À Profa. Dra. Mara Pinto Cristina Pinto pela colaboração, dedicação e ajuda em todos os momentos, inclusive quando achei que não fosse conseguir.

À Giovana Calixto pela amizade, paciência e dedicação. Esteve comigo desde o início deste trabalho até o final. Seu apoio foi essencial para o desenvolvimento do meu projeto!

Aos meus amigos que estiveram comigo nestes cinco anos, proporcionando momentos inesquecíveis e me dando força nos momentos bons e ruins.

Às minhas companheiras de república pela amizade verdadeira, companheirismo e carinho. Fizeram da minha graduação os melhores anos da minha vida!

Ao Matheus por estar sempre ao meu lado quando pensei em desistir.

À todos os professores e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas por todo conhecimento e auxílios.

Ao CNPq pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho, na forma de bolsa de iniciação científica.

Ao Prof. Dr. João Aristeu da Rosa, à Profa. Dra. Mara Cristina Pinto e à Liliane Neves Pedreiro por aceitarem o convite para participar da banca da minha defesa.

RESUMO

Doenças como dengue, malária, febre amarela e outras que são transmitidas por culicídeos determinam altas taxas de morbidade e mortalidade principalmente nos países tropicais. Uma alternativa para evitar picadas é o uso de repelentes. O mais utilizado é o repelente de DEET (N, N-dietil-3-m-toluamida), mas há relatos que descrevem casos de toxicidade com o uso de forma incorreta ou uso a longo prazo. Devido a essas desvantagens muitas pessoas preferem usar produtos naturais como repelentes. Estudos têm demonstrado que diferentes óleos essenciais têm atividade repelente, mas a investigação deve ser conduzida de forma a obter formulações que são eficazes na fixação de compostos aromáticos na pele, e aumentar a duração da repelência. Sistemas nanoestruturados para a liberação do princípio ativo, tais como sistemas líquido-cristalinos (SLC), têm vantagens na liberação controlada, uma vez que aumentam a estabilidade e a eficácia. Foram preparados sistemas constituídos por água, óleo de rícino hidrogenado PEG-40 (Eumulgin[®] HRE 40) como tensoativo e óleo essencial de melaleuca como fase oleosa. Esses sistemas foram analisados por de microscopia de luz polarizada, determinação do comportamento reológico e avaliação de bioadesão. A atividade repelente *in vivo* das formulações frente ao mosquito *Aedes aegypti* foi determinada empregando ensaio com humanos, para tanto utilizou-se uma caixa que evitava que os voluntários sofressem picadas. Foi verificada a ação repelente nos tempos 0, 30, 60 e 90 minutos ou até o momento em que não houvesse repelência. Realizou-se um estudo comparativo com um repelente comercial a base de DEET. Os resultados obtidos mostraram a presença de regiões de mesofases líquido-cristalinas do tipo cúbica (F18, F19 e F20) e microemulsão (F17) fixando-se a concentração do tensoativo em 30% e variando-se as concentrações de água e óleo. Os ensaios de reologia evidenciaram que os fluídos são não newtonianos pseudoplásticos e as formulações apresentam características elásticas. Já os ensaios de bioadesão mostraram que as formulações de mesofase cúbica são mais bioadesivas em relação à microemulsão. De acordo com os ensaios, as formulações apresentaram repelência, sendo que a formulação com maior bioadesão (F19) foi a que apresentou melhor repelência. Os resultados evidenciam a atividade repelente de sistemas nanoestruturados à base de óleo essencial de melaleuca e traz

perspectivas para o desenvolvimento de formulações repelentes em substituição ao DEET.

ABSTRACT

Diseases like dengue, malaria, yellow fever and others that are transmitted by mosquitoes determine high rates of morbidity and mortality especially in tropical countries. An alternative is to avoid stinging insect repellents. The most used is the repellent DEET (N, N-diethyl-3-m-toluamide) but no reports describing toxicities using incorrectly or long-term use. Due to these disadvantages many people prefer to use natural products as repellents. Studies have shown that different essential oils have insect repellent activity, but research must be conducted in order to obtain formulations that are effective in fixing aromatics in the skin and increase the duration of repellency. Nanostructured systems for the release of active systems such as liquid crystalline (SLC) have advantages in the controlled release, since they increase the stability and effectiveness. Systems were prepared consisting of water, oil, PEG-40 hydrogenated castor oil (Eumulgin® HRE 40) as surfactant and essential oil such as tea tree oil phase. These systems were analyzed by polarized light microscopy, rheological characterization and evaluation of bioadhesion. The repellent activity in vivo formulations against *Aedes aegypti* was determined using assay with human, therefore we used a box that prevented the volunteers suffered bites. Repellent action was checked at 0, 30, 60 and 90 minutes or until the time when there were no repellency. We conducted a comparative study with a commercial repellent DEET. The results obtained showed the presence of regions of the liquid crystalline mesophases cubic type (F18, F19, and F20) and microemulsion (F17) by fixing the surfactant concentration of 30% and varying concentrations of oil and water. The tests showed that the rheology fluids are non-Newtonian pseudoplastic and formulations have elastic characteristics. As for the bioadhesion assays showed that the cubic mesophase formulations are more bioadhesive compared to the microemulsion. According to tests, the formulations showed repellency, and the formulation with higher bioadhesion (F19) showed the best repellency. The results show the repellent activity of nanostructured systems based essential oil and tea tree brings prospects for the development of formulations to replace DEET repellents.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do DEET.....	12
Figura 2 - Caixa utilizada para a determinação da atividade repelente.....	20
Figura 3 - Análise do Diagrama de Fases Ternário.....	23
Figura 4 - Diagrama de fases ternário das amostras analisadas.....	24
Figura 5 - Diagrama de fases ternário do resultado da análise de MLP e as formulações selecionadas.....	26
Figura 6 - Reograma das formulações.....	29
Figura 7 – Análise reológica oscilatória das formulações.....	30
Figura 8 – Porcentagem de repelência das formulações após 0, 30, 60 e 90 minutos de aplicação.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição das formulações escolhidas.....	277
Tabela 2 – Propriedades mecânicas das amostras obtidas a partir de TPA.....	31
Tabela 3 - Resultados do estudo da bioadesão.....	32
Tabela 4 – Número de tentativas de picadas após período de tempo de aplicação da formulação comercial de DEET.....	333
Tabela 5 – Número de tentativas de picadas após período de tempo de aplicação da formulação F17.	344
Tabela 6 – Número de tentativas de picadas após período de tempo de aplicação da formulação F18.	344
Tabela 7 – Número de tentativas de picadas após período de tempo de aplicação da formulação F19.	344
Tabela 8 – Número de tentativas de picadas após período de tempo de aplicação da formulação F20.	355
Tabela 9 – Porcentagem de repelência da formulações após 0, 30, 60 e 90 minutos.	355

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

SLC – Sistemas Líquido-Cristalinos

T - Tensoativo

O - Óleo

A - Água

LO - Líquidas opacas

LT - Líquidas transparente

LTr - Líquidas translúcidas

VO - viscosas opacas

VT - viscosas transparentes

VTr - viscosas translúcidas

SF - Separação de fase

MLP - Microscopia de luz polarizada

TPA - Análise de textura

SLT - Sistema líquido transparente

SLTR - Sistema líquido translúcido

SLO - Sistema líquido opaco

SVT - Sistema viscoso transparente

SVTR - Sistema viscoso translúcido

SVO - Sistema viscoso opaco

ME - Microemulsão

CL - Cristal líquido

CE - Campo escuro

R - Repelência

TC - Tentativas de picadas controle

TA - Tentativas de picadas amostra

SAXS – Espalhamento de raio-X de baixo ângulo

® Marca Registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivos específicos	15
3	MATERIAL & MÉTODOS	16
3.1	Materiais e reagentes	16
3.2	Equipamentos	16
3.3	Métodos	16
3.3.1	Preparação das formulações	16
3.3.2	Análise estrutural das formulações	17
3.3.2.1	Microscopia de luz polarizada (MLP)	17
3.3.2.2	Determinação do comportamento reológico	17
3.3.2.3	Análise do perfil de textura (TPA)	17
3.3.2.4	Análise de bioadesão <i>in vitro</i>	18
3.3.3	Determinação da atividade repelente	19
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1	Diagrama de fases ternário e caracterização visual dos sistemas	22
4.5	Microscopia de Luz Polarizada (MLP)	24
4.3	Determinação do comportamento reológico	27
4.4	Análise do perfil de textura (TPA)	30
4.5	Análise de bioadesão <i>in vitro</i>	32
4.6	Determinação da atividade repelente	33
5	CONCLUSÃO	38
6	REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

Muitas patologias humanas, como dengue, malária, febre amarela, dentre outras, são adquiridas por meio de picadas de insetos que são atraídos por odores humanos. Além disso, picadas também podem causar desconforto localizado, alergia, irritação e inchaço (OLIVEIRA, 2008).

Doenças transmitidas por culicídeos são uma das maiores causas de morbidade e mortalidade no mundo todo e principalmente nos países tropicais. A dengue é uma doença transmitida pela picada das fêmeas dos mosquitos *Aedes aegypti* ou *Aedes albopictus*. Atualmente é a arbovirose mais importante do mundo. Cerca de 2,5 bilhões de pessoas estão sob risco de contaminação, principalmente nos países tropicais, já que a umidade e temperatura dessas regiões favorecem a proliferação do mosquito. Entre as doenças re-emergentes é a que constitui mais grave problema de saúde pública (OLIVEIRA, 2008).

Uma forma de evitar as doenças transmitidas por mosquitos e desconfortos causados por elas é o uso de repelentes. Comercialmente os produtos repelentes disponíveis são divididos em duas categorias: produtos químicos sintéticos e derivados de óleos essenciais (GREIVE *et al.*, 2010).

Um dos produtos químicos sintéticos mais efetivos e que vem sendo utilizado em larga escala é o composto orgânico N,N-dietil-3- m-toluamida (DEET), cuja estrutura química é mostrada na Figura 1. Esse composto é comercializado na forma de loções, sprays, aerossol, cremes e líquidos. O Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos estima que 30% dos americanos utilizam produtos com DEET contra picadas de mosquitos (KOREN *et al.*, 2003). Apesar do mecanismo de ação do DEET ser desconhecido, acredita-se que ele interfere na função de receptores localizados nas antenas dos mosquitos, alterando a capacidade de localizar seres humanos. A eficácia do DEET é atingida quando se usa o produto topicamente e está diretamente relacionada com a concentração que é aplicada. Após seis horas, 9 a 56% da dose aplicada é encontrada no sangue e seus efeitos sistêmicos estão relacionados com a quantidade que é absorvida (KOREN *et al.*, 2003).

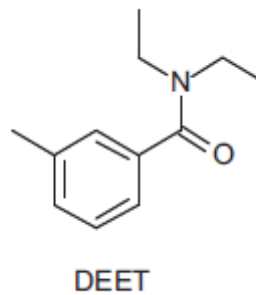


Figura 1 – Estrutura química do DEET (WILLE, *et al.*, 2011).

Embora o DEET tenha apresentado um perfil de segurança satisfatório, existem relatórios que descrevem casos de toxicidade na pele, sistema nervoso e sistema imunológico, que geralmente ocorrem quando o produto é utilizado de forma incorreta ou por longo período. Além disso, existem incômodos com a utilização do produto devido ao odor desagradável, sensação oleosa e pegajosa, e ao fato de que ele pode dissolver plásticos e borrachas sintéticas. Devido a essas desvantagens, muitos consumidores preferem utilizar produtos de origem natural como repelentes (CHOOCHOTE *et al.*, 2007).

Assim, muitas plantas e seus produtos derivados, como os óleos essenciais, têm sido estudados e descritos como potenciais substâncias repelentes (CHOOCHOTE *et al.*, 2007). A lista de óleos essenciais extraídos de plantas que têm algum grau de repelência está crescendo e em alguns casos a eficiência desses óleos contra as picadas de mosquitos têm sido mais satisfatória do que produtos químicos sintéticos (GLEISER *et al.*, 2010).

Estudos realizados por Maguranyi e colaboradores (2009) avaliaram o potencial de repelência de *Melaleuca alternifolia* (*tea tree oil*) contra *Culex quinquefasciatus*, *Culex annulirostris* e *Aedes aegypti* e os resultados indicam que óleo de melaleuca foi o segundo óleo essencial com maior índice de proteção contra *Aedes aegypti* e o terceiro em média geral relativa de índice de proteção, considerando-se as três espécies.

Estudos realizados por Gleiser e colaboradores (2010) também demonstraram que os óleos essenciais são promissoras fontes naturais repelentes. Todavia, essas substâncias apresentam compostos aromáticos com baixa fixação na pele, o que indica a necessidade de uma formulação eficiente, que promova o aumento da duração da repelência.

Novos sistemas de liberação de fármacos têm sido pesquisados nos últimos anos com o objetivo de obter sistemas com propriedades que aumentem a eficácia terapêutica, diminuam os efeitos colaterais, aumentem a solubilidade e estabilidade e promovam liberação controlada do fármaco ou ativo. Dentre tais sistemas, os cristais líquidos apresentam vantagens para aplicação tópica, pois apresentam propriedades de liberação controlada da substância ativa, evitam a termo e fotodegradação de substâncias sensíveis e promovem o aumento da retenção de água no estrato córneo, aumentando a hidratação (CHORILLI *et al.*, 2009).

Os cristais líquidos combinam propriedades dos estados sólido e líquido e por isso são também chamados mesofases. Essa mesofase apresenta como característica dos líquidos a capacidade de fluir e como característica dos sólidos uma estrutura ordenada e cristalina. A mesofase é atingida por aumento da temperatura ou adição de um solvente. Materiais que pela adição de solventes formam cristais líquidos são chamados liotrópicos e os que têm a estabilidade dependente da temperatura são chamados termotrópicos. Os liotrópicos são misturas de um componente orgânico e um solvente, que é, em geral, a água. As mesofases liotrópicas mais importantes são a lamelar, hexagonal e cúbica (MÜLLER, 2004).

A fase lamelar é formada por camadas paralelas e planas de bicamadas de tensoativo, separada por camadas de solvente formando rede uni ou bidirecional. Na fase hexagonal, os agregados são formados por arranjos de cilindros longos, originando estruturas bi ou tridimensionais. As fases cúbicas apresentam estruturas mais complicadas e visualizadas com maior dificuldade que as outras. Podem ser detectadas fases romboédricas e tetragonais em alguns sistemas (CHORILLI *et al.*, 2009).

Como componentes de formulação dos Sistemas Líquido-Cristalinos (SLC) podem ser utilizados óleos, água e tensoativos (FORMARIZ *et al.*, 2005). Como fase oleosa a incorporação do óleo essencial de melaleuca demonstra interesse devido à sua atividade repelente.

Prolongar o tempo de contato entre o fármaco e a barreira biológica melhora a atuação de diversos fármacos. A capacidade de manter um sistema de liberação controlada em um determinado local por um longo período de tempo é uma vantagem para o tratamento local, bem como para biodisponibilidade sistêmica do fármaco (LEE *et al.*, 2000).

Os sistemas bioadesivos consistem na incorporação de moléculas adesivas à formulação farmacêutica aumentando o tempo de contato entre a barreira biológica e o fármaco ou princípio ativo (CALIXTO, 2013).

A bioadesão pode ser definida como o estado em que dois materiais, sendo pelo menos um deles de natureza biológica, sejam mantidos unidos por um tempo prolongado através de forças interfaciais. Esse processo ocorre em duas etapas, na primeira há um contato íntimo entre o material bioadesivo e membrana biológica e na segunda há a consolidação da junção adesiva pelas interações físico-químicas (CALIXTO, 2013).

Acredita-se, portanto, que os sistemas líquido-cristalinos contendo óleo de melaleuca sejam capazes de prolongar a duração da repelência proporcionada pelo ativo, diminuindo, assim, a frequência da aplicação e aumentando a adesão ao uso do produto.

2 OBJETIVOS

Desenvolver e caracterizar de sistemas nanoestruturados bioadesivos com óleo de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) e estudar a ação repelente frente ao mosquito *Aedes aegypti*.

2.1 Objetivos específicos

- Analisar as formulações pela microscopia de luz polarizada (MLP);
- Determinar do comportamento reológico das formulações;
- Analisar o perfil de textura (TPA);
- Analisar a bioadesão *in vitro*;
- Determinar a atividade repelente.

3 MATERIAL & MÉTODOS

3.1 Materiais e reagentes

- Óleo de rícino hidrogenado PEG-40 (Eumulgin[®] HRE 40);
- Óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil – Sigma);
- Água deionizada em sistema Milli Q com condutividade $18,2\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$;
- Álcool isopropílico PA (Synth[®]);
- Extran MA 02 Neutro - Merck[®];
- Repelente OFF[®] (constituído por dietil toluamida 7,125%);
- Hexano PA (Synth[®]);
- BG-Cages - caixa para testes com mosquitos de 27.000 cm^3 .

3.2 Equipamentos

- Balança Analítica (GEHAKA[®]);
- Microscópio de luz polarizada Olympus BX41 com câmara acoplada QColor3 Olympus America INC;
- Reômetro (Intruments Rheometers AR 2000 TA, modelo AR 2000);
- Analisador de textura TA-XTplus - Stable Micro Systems[®];

3.3 Métodos

3.3.1 Preparação das formulações

Em um frasco transparente foram transferidas quantidades adequadas do tensoativo Eumulgin[®] HRE 40 (óleo de rícino hidrogenado PEG-40) (T) e óleo essencial de melaleuca (O) e titulou-se com água (A). Os diagramas de fases foram obtidos usando as relações de T/O na faixa de 1:9 até 9:1. Detectou-se visualmente contra fundo escuro se as formulações eram líquidas opacas (LO), líquidas transparentes (LT), líquidas translúcidas (LTr), viscosas opacas (VO), viscosas transparentes (VT), viscosas translúcidas (VTr) ou se houve separação de fase (SF).

3.3.2 Análise estrutural das formulações

3.3.2.1 Microscopia de luz polarizada (MLP)

As análises foram realizadas colocando-se uma pequena quantidade da formulação preparada sobre uma lâmina de vidro, coberta com lamínula, que posteriormente foi analisada com um microscópio de luz polarizada Jenamed, Carl Zeiss. Avaliou-se a presença de área de anisotropia, que é um indicativo da presença de cristais-líquidos das regiões definidas em 3.3.1.

3.3.2.2 Determinação do comportamento reológico

Para a caracterização reológica das formulações, empregou-se análise reológica contínua e análise reológica oscilatória utilizando o reômetro *Instruments Rheometers* AR 2000 TA, com geometria placa cone com 40 mm de diâmetro, 2 graus de ângulo, gap de 52 μm e à temperatura de 32 °C.

Para o estudo reológico contínuo, uma pequena amostra dos sistemas foi colocada, cuidadosamente, na placa inferior do reômetro, e esperou-se o tempo de repouso de 3 minutos para o início da análise. A taxa de cisalhamento utilizada foi de 0 a 100 s^{-1} para a curva ascendente e de 100 a 0 s^{-1} para a curva descendente, durante 120 segundos cada curva. O teste foi realizado em triplicata.

Para a realização do estudo oscilatório, primeiramente, colocou-se o reômetro no modo *amplitude sweep* para a realização do teste de varredura de tensão para determinação da tensão da região viscoelástica. Para esse teste foi utilizada uma faixa de tensão de cisalhamento de 0 a 50 Pa e frequência de 1 Hz. Após a determinação da tensão de 1 Pa da região viscoelástica, colocou-se o reômetro no modo *frequency sweep* para realização do teste de varredura de frequência para determinação do módulo elástico (G') e módulo viscoso (G''). Para esse teste foi utilizada a faixa de frequência de 0 a 10 Hz, à tensão de 1 Pa. Os testes foram realizados em triplicata.

3.3.2.3 Análise do perfil de textura (TPA)

O perfil de textura dos sistemas foi analisado utilizando o analisador de textura TA-XT plus (Stable Micro Systems, Inglaterra), a partir do qual é possível extrair propriedades mecânicas, tais como a dureza, compressibilidade, adesividade e coesão.

Para a realização do teste, 15g das formulações foram colocados em tubos de centrífuga cônicos de 50 mL (Falcon, BD[®], Franklin Lakes, EUA) e centrifugados a 4000 rotações por minuto, durante 3 minutos, para eliminar as bolhas de ar e tornar a sua superfície lisa. Em seguida, esses tubos foram colocados sob a sonda analítica (10 mm de diâmetro) do analisador de textura, que foi programada para comprimir a amostra numa velocidade de 0,5 mm/s até a profundidade pré-definida (10 mm) e retornar para a superfície da amostra na mesma velocidade. Após cinco segundos de repouso, uma segunda compressão iniciou-se, nas mesmas condições. Todas as análises foram realizadas em triplicata, à temperatura de 25°C.

3.3.2.4 Análise de bioadesão *in vitro*

A força necessária para remover os sistemas selecionados da superfície da pele foi avaliada *in vitro*, utilizando o analisador de textura TA-XT plus (Stable Micro Systems, Surrey Inglaterra), no modo *Adhesion Test*.

Para a realização desse estudo foram obtidas peles de orelhas de porcos oriundos de um abatedouro local. As orelhas foram limpas com água e as que apresentaram injúrias foram descartadas. A pele foi removida da cartilagem utilizando um bisturi, após, uma camada de 400 µm do estrato córneo e da epiderme foi separada do tecido adiposo utilizando um dermatômetro (Nouvag TCM 300, Goldach, USA). Os pelos foram cortados com uma tesoura.

Após ficar 30 minutos imerso em soro fisiológico, um pedaço de pele de 2 cm de diâmetro foi fixada com anel de borracha à extremidade inferior da sonda cilíndrica (10 mm de diâmetro) do equipamento. Na temperatura de 32°C, as formulações foram acondicionadas em recipientes de vidro pequenos sob a sonda. O teste foi iniciado abaixando a sonda a uma velocidade constante (1 mm/s) até que a pele entrasse em contato com a amostra. A pele e a amostra foram mantidas em contato durante 60 segundos e nenhuma força foi aplicada durante este tempo. Em seguida, a sonda subiu a velocidade constante (0,5 mm/s) até ocorrer o destacamento da pele da amostra. A força necessária para destacar a pele da

amostra foi calculada pela curva força *versus* tempo. O teste foi realizado em triplicata.

3.3.3 Determinação da atividade repelente

Esta etapa do projeto foi realizada em colaboração com a Profa. Dra. Mara Cristina Pinto, do Departamento de Ciências Biológicas da FCF-Araraquara. Esses ensaios foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (Protocolo CAAE 02644012.7.0000.5426).

Os voluntários, de ambos os sexos, na faixa etária de 20 a 40 anos, não utilizaram produtos cosméticos na região entre o pulso e o cotovelo nas últimas 24 horas.

Para a determinação da atividade repelente, foi utilizada uma caixa de 27.000 cm³ (41x41x16) feita de acrílico com a parte inferior composta por uma folha de metal e com uma abertura coberta por uma tela, com um espaçador metálico na parte inferior da caixa, apresentada na Figura 2, onde o antebraço do voluntário foi inserido, havendo uma distância de 150 mm da tela, o que impediu que o voluntário sofresse picadas. Os braços dos voluntários foram lavados com Extran 5% (25 mL por braço), posteriormente enxaguados com água corrente e secos. Após a secagem aplicou-se 25 mL em cada braço de álcool isopropílico 50% e esperou-se a secagem de forma natural.



Figura 2. Caixa utilizada para a determinação da atividade repelente (OBERMAYR et al., 2010).

Foram colocadas, na gaiola, 30 fêmeas de *Aedes aegypti* e esperou-se 30 minutos para que as mesmas se ambientassem.

Antes da exposição, avaliou-se a capacidade de alimentação dos insetos. Para tanto, colocou-se o antebraço sem tratamento no espaço, por 10 segundos, ou até que houvesse mosquitos na tela na tentativa de se alimentar.

Os voluntários colocaram o antebraço sem nenhuma formulação no espaçador da caixa, que continha as fêmeas de *A. aegypti*, por um período de dois minutos para que fosse realizado o controle. Após o controle, foi realizado um teste com um produto comercial a base de DEET (OFF®). Em outro dia, e com 30 novas fêmeas na gaiola, as formulações foram aplicadas na pele dos voluntários e após um minuto o teste foi realizado, sendo repetido a cada trinta minutos. Em todos os testes realizou-se o controle com um dos antebraços do voluntário sem a aplicação de nenhuma formulação. Os testes foram conduzidos até que houvesse a tentativa de picada com as formulações repelentes. O tempo entre a aplicação do repelente e as tentativas de picadas foi considerado como o tempo de repelência do produto.

A repelência foi avaliada de acordo com a seguinte equação:

$$\% R = \frac{(TC - TA) \times 100}{TC} \quad (1)$$

em que: R = repelência; TC = Tentativas de picadas controle; TA = Tentativas de picadas amostra.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Diagrama de fases ternário e caracterização visual dos sistemas

O diagrama de fases ternário, constituído por fase aquosa, oleosa e tensoativo, foi representado por um triângulo equilátero, sendo os vértices do triângulo correspondentes a 100% da fase. A leitura foi feita no sentido horário, sendo a base referente à concentração da fase oleosa, o lado direito referente à concentração do tensoativo e o lado esquerdo referente à concentração da fase aquosa. O diagrama de fases foi construído obtendo-se 36 pontos, os quais foram caracterizados visualmente. As formulações foram classificadas conforme a fluidez e cor, da seguinte forma:

Sistema Líquido Transparente (SLT): sistemas transparentes em que se observava fluidez ao verter o frasco.

Sistema Líquido Translúcido (SLTR): formulações em que se observava fluidez ao verter o frasco e apresentavam cor entre a transparente a opaca.

Sistema Líquido Opaco (SLO): formulações opacas em que se observava fluidez ao verter o frasco.

Sistema Viscoso Transparente (SVT): sistemas em que não se observava fluidez ao verter o frasco e eram transparentes.

Sistema Viscoso Translúcido (SVTR): sistemas em que não se observava fluidez ao verter o frasco e tinham cor entre a transparente e a opaca.

Sistema Viscoso Opaco (SVO): para sistemas em que não se observava fluidez ao verter o frasco e eram opacos.

Separação de Fases (SF): sistemas em que as fases não se misturaram, havendo a formação de duas fases.

A Figura 3 ilustra o diagrama de fases ternário obtido, classificado visualmente e constituído por Óleo de rícino hidrogenado PEG-40, óleo de melaleuca e água.

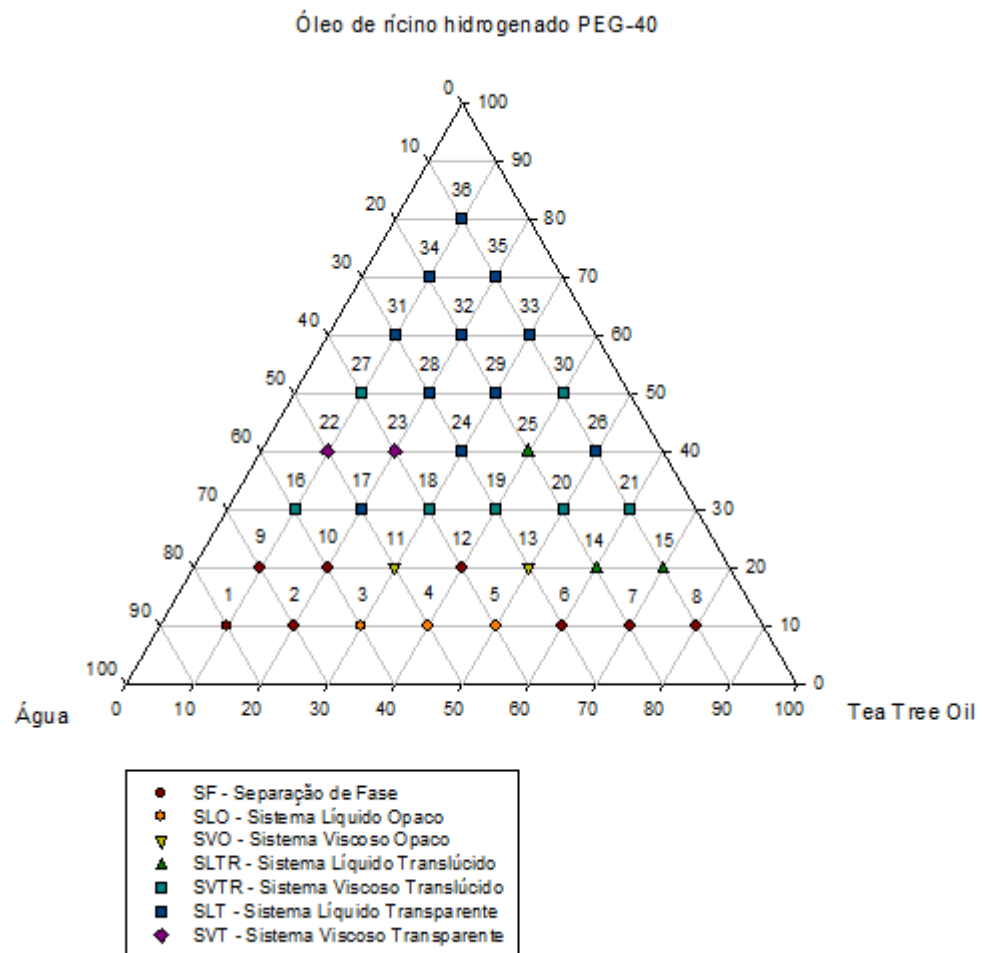


Figura 3 - Análise do Diagrama de Fases Ternário

Através da análise do diagrama de fases ternário, observou-se que com baixas concentrações de tensoativo (até 20%) há separação de fases, pois a concentração de tensoativo não é suficiente para estabilizar termodinamicamente o sistema. A partir da concentração de 30% de tensoativo é possível observar que o sistema passa a ser termodinamicamente estável, pois há formação de sistemas líquidos transparentes e sistemas viscosos translúcidos. Na concentração de 40% de tensoativo os sistemas passam a ser viscosos transparentes e líquidos transparentes e com o aumento da concentração, os sistemas passam a ser, predominantemente, líquidos transparentes. Esta característica das formulações com maior concentração de tensoativo pode ser explicada pela capacidade do tensoativo em diminuir a tensão superficial entre o óleo e a água formando estruturas de tamanhos muito reduzidos que não são capazes de desviar a luz (CHORILLI *et al.*, 2009).

As formulações que apresentaram separação de fases (pontos 1; 2; 6; 7; 8; 9; 10 e 12) e os sistemas opacos líquidos e viscosos (3; 4; 5; 11 e 13) foram descartados, pois não são os sistemas que apresentaram maior estabilidade. Os sistemas translúcidos e transparentes, viscosos e líquidos, foram selecionados para estudo de microscopia de luz polarizada.

4.5 Microscopia de Luz Polarizada (MLP)

As análises de microscopia de luz polarizada foram realizadas após 24 horas de preparo das formulações. Todas as amostras analisadas (Figura 4) apresentaram campo escuro quando avaliadas por MLP.

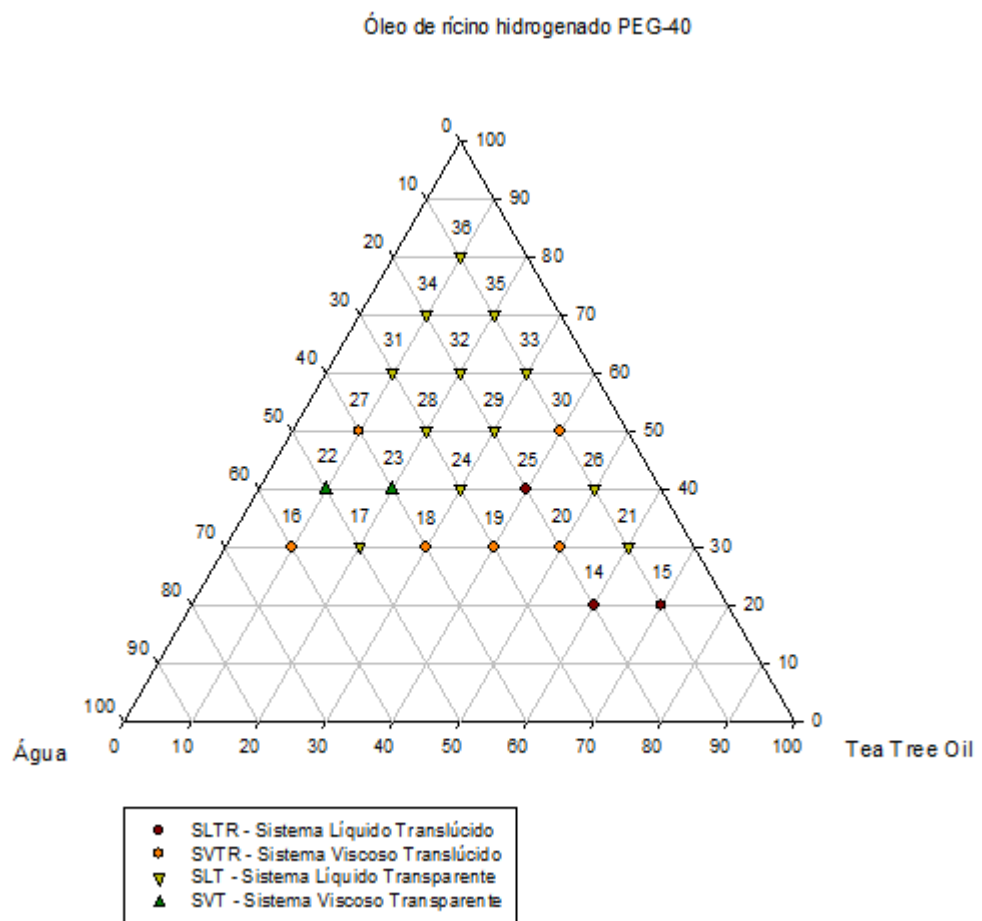


Figura 4 - Diagrama de fases ternário das amostras analisadas.

A microscopia de luz polarizada permite a classificação dos sistemas como isotrópicos ou anisotrópicos. Os sistemas que são capazes de desviar o plano da luz

polarizada são chamados anisotrópicos e os sistemas que não possuem tal propriedade são chamados isotrópicos. Os sistemas isotrópicos são os sistemas líquido cristalinos de fase cúbica e as microemulsões, os quais não conseguem desviar o plano de luz polarizada, gerando um campo escuro.

As mesofases líquido-cristalinas ainda podem ser analisadas de acordo com a viscosidade. A fase lamelar apresenta-se como um líquido viscoso, a fase hexagonal é semelhante a um gel e a fase cúbica apresenta viscosidade extremamente elevada (FORMARIZ *et al.*, 2005). Analisando-se a viscosidade das formulações e a microscopia de luz polarizada das mesmas os sistemas foram classificados como microemulsões ou cristais líquidos de fase cúbica. Os Sistemas Líquidos Transparentes ou Translúcidos foram classificados como microemulsões e os Sistemas Viscosos Transparentes ou Translúcidos foram classificados como cristais líquidos de fase cúbica, conforme o diagrama de fases apresentado na Figura 4. É importante salientar que para confirmar os dados obtidos por MLP, outras técnicas devem ser utilizadas, como o espalhamento de raios-X de baixo ângulo (SAXS).

Foram selecionados os pontos 17, 18, 19 e 20 para os estudos de reologia, TPA, bioadesão e atividade repelente, destacados na Figura 5, que passaram a ser denominados F17, F18, F19 e F20.

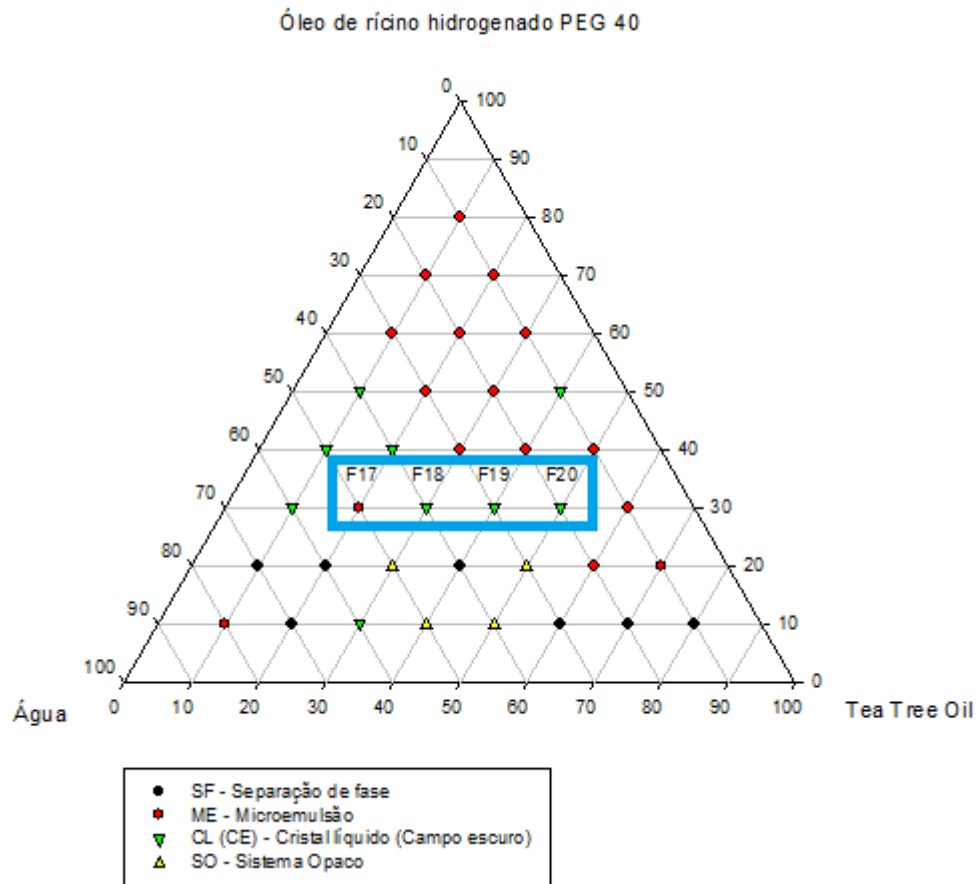


Figura 5 - Diagrama de fases ternário do resultado da análise de MLP e as formulações selecionadas.

Esses sistemas foram escolhidos devido à baixa porcentagem de tensoativo, já que esse componente pode ser irritante para a pele, e também pelo fato desses sistemas serem transparentes ou translúcidos, o que é indicativo de se tratar de microemulsões ou mesofases líquido-cristalinas do tipo cúbica.

A porcentagem de cada componente presente nas formulações escolhidas está detalhada na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição das formulações escolhidas.

Formulações	Água	Tensoativo	Óleo
F17	50%	30%	20%
F18	40%	30%	30%
F19	30%	30%	40%
F20	20%	30%	50%

4.3 Determinação do comportamento reológico

A análise reológica estuda as propriedades de escoamento e deformação da matéria quando submetidos a uma tensão para que sejam avaliadas relações entre tensões e deformações (ISAAC, 2008). A reologia avalia características como viscosidade, fluidez, espalhabilidade e estabilidade físico-química. Essas características podem ser utilizadas como meio de seleção de formulações (MILAN *et al.*, 2007).

A viscosidade é a medida da resistência que o material apresenta para fluir, sendo assim, quanto maior a viscosidade, maior é a resistência para fluir. Baseando-se na viscosidade, pode-se classificar os fluídos em duas classes: newtonianos ou não newtonianos. Fluídos newtonianos possuem taxa de cisalhamento proporcional à tensão de cisalhamento, enquanto os fluídos não newtonianos não obedecem a essa proporcionalidade (LAHOUD *et al.*, 2010).

O comportamento do fluxo do material pode ser analisado por meio da construção de um gráfico que relaciona tensão de cisalhamento com taxa de cisalhamento, formando duas curvas: uma ascendente e outra descendente (ISAAC, 2008). A partir da curva ascendente pode-se classificar o sistema como newtoniano ou não newtoniano, sendo que o fluxo não newtoniano pode ainda ser classificado com plástico, pseudoplástico ou dilatante. A partir da curva descendente o material pode ser classificado em tixotrópico ou reopético (CALIXTO, 2013).

O comportamento pseudoplástico de fluídos não newtonianos apresenta, no gráfico que relaciona a tensão e a taxa de cisalhamento, uma curva que tem origem no zero, não apresenta linearidade e a viscosidade diminui com o aumento do cisalhamento. Já no comportamento plástico há necessidade de uma força prévia

chamada tensão de cedência para que haja um deslocamento das camadas moleculares e após esse ponto, o sistema apresenta comportamento linear ou quase linear. O comportamento dilatante apresenta aumento da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento (LAHOUD *et al.*, 2010).

Analisando a curva descendente, quando esta encontra-se no plano inferior à curva ascendente, ou seja, a viscosidade diminui com o aumento do tempo da força aplicada, o fluido é caracterizado com tixotrópico. Quando ocorre o contrário, ou seja, a curva descendente é superior à curva ascendente e a viscosidade aumenta com o aumento de tempo, o fluido é caracterizado como reopético (LAHOUD *et al.*, 2010).

A análise reológica oscilatória fornece informações sobre a viscoelasticidade da amostra, fornecendo informações sobre a natureza estrutural do sistema (CALIXTO, 2013).

Para a determinação do comportamento dos sistemas foi realizada uma varredura de tensão em cada sistema com o objetivo de determinar a região viscoelástica, que é a região onde a estrutura do sistema é preservada. Nessa região, os módulos elástico (G') e viscoso (G'') são independentes da frequência (HAMINIUK, 2009). O módulo elástico G' ou de armazenagem representa a armazenagem de energia conforme há um aumento da tensão durante a deformação e qual a energia liberada quando a tensão é diminuída. No módulo viscoso (G'') não há armazenamento de energia, pois a tensão aplicada é dissipada, ocasionando uma deformação irreversível (CALIXTO, 2013).

A Figura 6 apresenta os resultados obtidos no ensaio reológico contínuo.

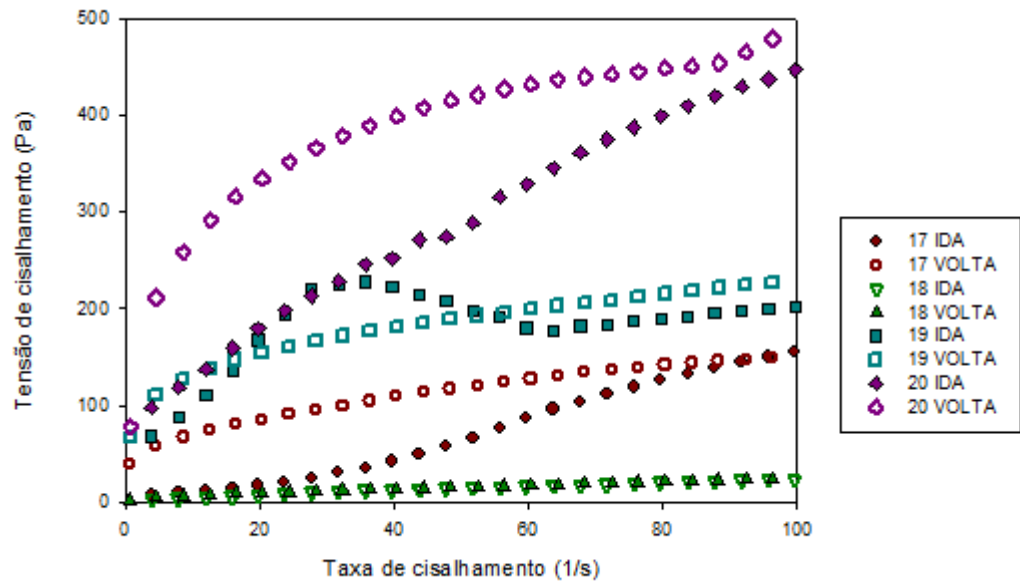


Figura 6 - Reograma das formulações.

Pela Figura 6, observou-se que a viscosidade mostrou-se dependente da taxa de cisalhamento, uma vez que as modificações do material provocadas pelo processo de cisalhamento diminuiu a viscosidade aparente de todos os sistemas. Devido a esta propriedade, todos os sistemas se comportaram como fluídos pseudoplásticos.

Além disso, a estruturação dos sistemas foi gradualmente recuperada quando a tensão foi removida, revelando que, apesar das curvas reológicas mostrarem uma diminuição da viscosidade, um arranjo mais ordenado foi observado após o processo de cisalhamento, comportando-se como sistemas anti-tixotrópicos.

Esta é uma propriedade desejada em dispersões farmacêuticas como as microemulsões e cristais líquidos, devido à diminuição da viscosidade que além de facilitar a administração do fármaco, também facilita a preparação da formulação. Além disso, o sistema mais ordenado formado após o processo de cisalhamento pode ser responsável para prolongar ou modificar o perfil de libertação do princípio ativo (CALIXTO, 2013).

A Figura 7 apresenta os resultados obtidos no ensaio reológico oscilatório.

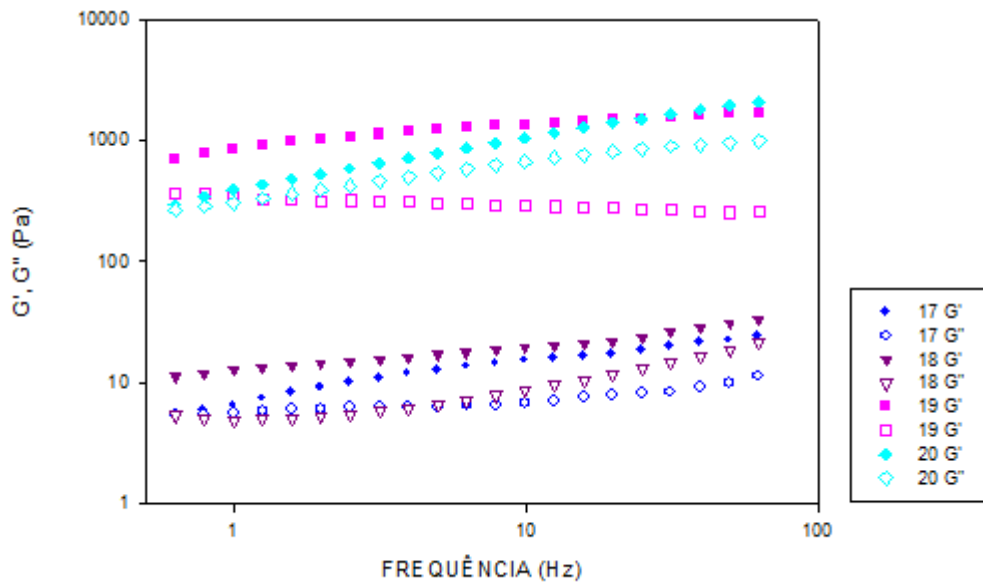


Figura 7 – Análise reológica oscilatória das formulações.

Os módulos G' e G'' podem indicar qualitativamente a estrutura do sistema. Quando $G' \gg G''$, sugere-se que o sistema está interligado quimicamente, ou se $G' > G''$ o sistema está estruturado por ligações secundárias, e se $G' \leq G''$, diz-se que as moléculas do sistema estão ligadas apenas por interações físicas (CALIXTO, 2013).

De acordo com a Figura 7, todas as formulações obtiveram módulos de armazenamento (G') superiores ao módulo de perda (G''), uma característica das formulações elásticas, o que indica que há a formação de uma rede estrutural mais forte (CALIXTO, 2013). Podemos concluir que a diminuição da proporção de fase aquosa das formulações aumentou o caráter elástico das formulações, já que as formulações F19 e F20 apresentaram caráter elástico mais predominante do que F17 e F18.

4.4 Análise do perfil de textura (TPA)

A análise do perfil de textura revela características mecânicas da formulação tais como compressibilidade, dureza, adesão e coesão (CALIXTO, 2013).

A dureza é a avaliação da resistência máxima necessária para haver deformação. A compressibilidade corresponde ao trabalho necessário para deformar a amostra (JONES, 1997). Dessa forma esses dois parâmetros permitem avaliar a

facilidade de aplicação da amostra e do espalhamento na superfície a ser analisada. Já a adesão e coesão estão relacionadas à adesão da formulação à superfície biológica, retratando a retenção da formulação no local de aplicação (CALIXTO, 2013).

A Tabela 2 apresenta as propriedades mecânicas das amostras obtidas a partir da análise de textura das formulações. Na tabela constam os parâmetros compressibilidade, dureza, adesão e coesão. Tais dados foram analisados estatisticamente por ANOVA com pós-teste de Tukey com nível de significância 0,05%.

Tabela 2 – Propriedades mecânicas das amostras obtidas a partir de TPA.

Amostra	Compressibilidade (N.s*)	Dureza (N**)	Adesão (N.s)	Coesão
F18	0,525 ± 0,061	0,038 ± 0,003	19,958 ± 4,381	0,757 ± 0,048
F19	1,514 ± 0,041	0,098 ± 0,002	125,315 ± 9,353	0,881 ± 0,014
F20	0,378 ± 0,017	0,015 ± 0,000	0,244 ± 0,027	0,904 ± 0,031

*N.s – Newton.segundo

**N – Newton

A partir dos dados obtidos na Tabela 2 verificou-se que todos os valores de compressibilidade, dureza e adesão apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) entre si. Os valores de coesão não apresentam diferença significativa entre as formulações F19 e F20, sendo que os valores de coesão obtidos para as demais formulações apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) entre si.

Amostras com baixa viscosidade não podem ser analisadas, pois é necessário que a amostra apresente resistência à entrada da sonda. Por esse motivo a amostra 17 não pôde ser analisada.

Dureza e compressibilidade são parâmetros reológicos que quantificam a deformação de um produto sob compressão (CALIXTO, 2013). Dessa forma a formulação F19 foi a que apresentou maior compressibilidade e dureza quando comparado aos outros sistemas, indicando maior organização desse sistema, como observado nos ensaios viscoelásticos. As formulações F19 e F20 não apresentaram diferença estatística significativa de coesão, sendo assim as formulações mais

coesivas. A formulação F19 apresentou maior adesão em relação às demais formulações.

4.5 Análise de bioadesão *in vitro*

A bioadesão pode ser definida como a capacidade biológica de um material sintético aderir à pele ou substrato biológico (REPKA, 2000).

Os fatores que determinam a bioadesão são diversos e podem ser devido a efeitos da morfologia da superfície, interações químicas, fatores fisiológicos e interações físico-mecânicas. Esses fatores ocorrem em conjunto a fim de resultar na adesão entre duas superfícies (PALACIO, 2012).

O processo de bioadesão ocorre em duas fases: a primeira é a fase de contato e a segunda de consolidação. A primeira fase ocorre com contato íntimo entre o sistema bioadesivo e a membrana biológica, e a segunda ocorre com as interações físico-químicas consolidando a junção adesiva, resultando em um maior tempo de adesão (CALIXTO, 2013).

A principal vantagem da bioadesão é prolongar o contato do fármaco com o substrato biológico, prolongando a ação do mesmo e diminuindo a frequência de aplicação do produto, aumentando assim a adesão do paciente ao tratamento (SMART, 2005).

A Tabela 3 apresenta os resultados do estudo da bioadesão.

Tabela 3 - Resultados do estudo da bioadesão.

Amostra	Trabalho de Adesão (N.s)
F17	20,142 ± 0,196
F18	60,860 ± 2,650
F19	143,688 ± 5,722
F20	94,624 ± 5,071

Os dados da Tabela 3 foram analisados estatisticamente por ANOVA com pós-teste de Tukey com nível de significância 0,05%. A partir dos dados obtidos verificou-se os valores de bioadesão das formulações F17 e F19, F17 e F20, e F18 e F19 apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) entre si. Os valores de bioadesão

não apresentam diferença significativa entre as formulações F17 e F18, F18 e F20, e F19 e F20.

Analisando os resultados, as formulações de fase cúbica, F18, F19 e F20 são as mais bioadesivas, sendo a microemulsão, F17, a menos bioadesiva. As formulações com menor concentração de fase aquosa no sistema (F19 e F20) foram as que apresentam maior adesão na análise de textura e no ensaio de bioadesão *in vitro*. A bioadesão dos sistemas também pode ser explicada por suas propriedades reológicas, ou seja, o aumento da viscosidade e da característica elástica contribuiu para a permanência da formulação na pele. Sendo assim, as formulações mais viscosas e mais elásticas foram as que apresentaram maior bioadesão.

4.6 Determinação da atividade repelente

A determinação da atividade repelente permitiu avaliar a porcentagem de repelência das formulações após um período de tempo, e permitiu ainda comparar a repelência com o produto comercial a base de DEET (OFF®).

As Tabelas 4, 5, 6, 7 e 8 apresentam os resultados dos testes de repelência.

Tabela 4 – Número de tentativas de picadas após período de tempo de aplicação da formulação comercial de DEET.

Tempo de aplicação da formulação	Controle	Formulação Comercial OFF®
0 minutos	21	0
30 minutos	4	0
60 minutos	16	0
90 minutos	19	2

Tabela 5 – Número de tentativas de picadas após período de tempo de aplicação da formulação F17.

Tempo de aplicação da formulação	Controle	Formulação F17
0 minutos	15	0
30 minutos	42	25
60 minutos	30	30

Tabela 6 – Número de tentativas de picadas após período de tempo de aplicação da formulação F18.

Tempo de aplicação da formulação	Controle	Formulação F18
0 minutos	18	0
30 minutos	40	19
60 minutos	13	13

Tabela 7 – Número de tentativas de picadas após período de tempo de aplicação da formulação F19.

Tempo de aplicação da formulação	Controle	Formulação F19
0 minutos	29	0
30 minutos	13	0
60 minutos	8	2
90 minutos	37	9

Tabela 8 – Número de tentativas de picadas após período de tempo de aplicação da formulação F20.

Tempo de aplicação da formulação	Controle	Formulação F20
0 minutos	29	0
30 minutos	12	3
60 minutos	13	13

Para todos os testes, a porcentagem de repelência das formulações foi calculada através da comparação do número de tentativas de picadas no braço controle e no braço em que a formulação foi aplicada, de acordo com a equação 1:

$$\% R = \frac{(TC-TA) \times 100}{TC} \quad (1)$$

em que: R = repelência; TC = Tentativas de picadas controle; TA = Tentativas de picadas amostra.

A Tabela 9 abaixo apresentam a porcentagem de repelência de cada amostra após 0, 30, 60 e 90 minutos de aplicação das formulações.

Tabela 9 – Porcentagem de repelência da formulações após 0, 30, 60 e 90 minutos.

Tempo de aplicação (minutos)	Formulação a base de DEET (OFF®)	F17	F18	F19	F20
0	100%	80%	100%	100%	100%
30	100%	40,47%	52,5%	100%	75%
60	100%	0%	0%	75%	0%
90	89,47%	0%	0%	75,67%	0%

A Figura 8 compara a repelência das formulações conforme o tempo de aplicação das mesmas:

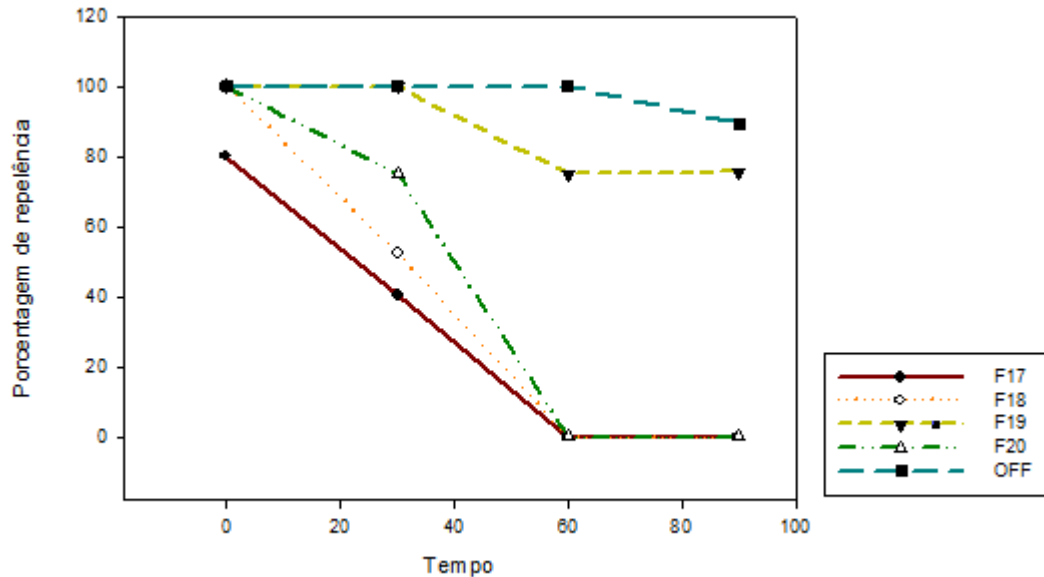


Figura 8 – Porcentagem de repelência das formulações após 0, 30, 60 e 90 minutos de aplicação.

As formulações F18, F19 e F20 podem ser consideradas repelentes, pois apresentaram 100% de repelência no momento de aplicação. Após 30 minutos, das três formulações, somente a F19 manteve o potencial repelente. Após 60 minutos a formulação F19 teve perda da sua capacidade repelente.

A formulação F17 apresentou 80% de repelência no momento de sua aplicação, o que sugere ineficácia na ação repelente.

Por meio dos ensaios realizados pode-se observar que a formulação com maior concentração de óleo essencial de melaleuca não foi a que apresentou resultado mais satisfatório e a formulação com menor concentração desse óleo também não foi a que apresentou menor porcentagem de repelência. Isso indica que os sistemas proporcionaram condições para a eficiência da ação do princípio ativo. As formulações de fase cúbica demonstraram um resultado de repelência mais satisfatório em relação à microemulsão. Esse resultado pode ser devido ao fato de esses sistemas apresentarem maior viscosidade e como consequência maior bioadesão, permitindo que a formulação permaneça mais tempo na pele, resultando

em um efeito prolongado. Embora a formulação comercial a base de DEET tenha apresentado melhor resultado de repelência em relação aos sistemas estudados, as formulações obtidas apresentam potencial de ação repelente e podem ser consideradas alternativas promissoras aos repelentes atualmente empregados no mercado.

5 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

O sistema desenvolvido apresentou regiões de microemulsões e fases líquido-cristalinas do tipo cúbico, o que será confirmado por espalhamento de raios-X de baixo ângulo (SAXS).

As formulações F17, F18, F19 e F20 apresentaram diminuição da viscosidade após o cisalhamento, comportando-se como fluídos pseudoplásticos. Além disso, a estruturação do sistema foi recuperada após o cisalhamento indicando que os sistemas são anti-tixotrópicos. Essas características facilitam o processo de preparação do sistema e podem prolongar ou modificar a liberação do princípio ativo.

A análise de textura evidenciou que a formulação F19 apresentou maior dureza e compressibilidade, evidenciando maior organização do sistema. Além disso, a mesma teve maior adesão e coesão, sendo a coesão semelhante à formulação F20.

A formulação F19 foi a que apresentou maior bioadesão, o que pode aumentar o tempo de permanência da formulação na pele, favorecendo a repelência do produto.

Após a realização da determinação da atividade repelente, pode-se concluir que a formulação F19 foi a que apresentou maior repelência, sendo uma formulação em potencial como alternativa a formulações contendo DEET para a atividade repelente frente ao mosquito *Aedes aegypti*.

6 REFERÊNCIAS

CALIXTO, G. M. F. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados bioadesivos contendo peptídeo análogo à adesina do *Streptococcus mutans***. 2013. 105p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

CHOOCHOTE, W. *et al.* Repellent activity of selected essential oils against *Aedes aegypti*. **Fitoterapia**, v. 78, p. 359-364, 2007.

CHORILLI, M. *et al.* Desenvolvimento de sistemas líquido-cristalinos empregando silicone fluído de co-polímero glicol e poliéter funcional siloxano. **Química Nova**, v.32, n.4, p.1036-1040, 2009.

FORMARIZ, T. P. *et al.* Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 3, p. 301-313, 2005.

GLEISER, R. M.; BONINO, M. A.; ZYGADLO, J. A. Repellence of essential oils of aromatic plants growing in Argentina against *Aedes aegypti*. **Parasitol Res**, v. 108, p. 69-78, 2010.

GREIVE, K .A. *et al.* Development of *Melaleuca* oils as effective natural-based personal insect repellents. **Australian Journal of Entomology**, v. 49, p. 40-48, 2010.

HAMINIUK, G. W. I. *et al.* Comportamento reológico de sistemas pécticos de polpas de frutas vermelhas. **Ciênc. Technol. Aliment.**, v. 29, n. 1, p.225-231, 2009.

ISAAC, V. L. B. *et al.* Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 1, p.81-96, 2008.

JONES, D. S. *et al.* Rheological, mechanical and mucoadhesive properties of thermoresponsive, bioadhesive binary mixtures composed of poloxamer 407 and carbopol 974P designed as platforms for implantable drug delivery systems for use in the oral cavity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 373, p 49-58, 2009.

JONES, D. S.; WOOLFSON, A. D.; BROWN A. F. Textural analysis and flow rheometry of novel , bioadhesive, antimicrobial oral gels. **Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 4, 1997.

KOFFI, A. A.; AGNELY, F.; PONCHEL, G.; GROSSIORD, J.L. Modulation of the rheological and mucoadhesive properties of thermosensitive poloxamer-based hydrogels intended for the rectal administration of quinine. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, p. 328-335, 2006.

KOREN, G.; MATSUI, D.; BAILEY, B. DEET-based insect repellents: safety implications for children and pregnant and lactating women. **Canadian Medical Association Journal**, v. 169, no. 3, p. 209-212, 2003.

LAHOUD, M. H.; CAMPOS, R. Aspectos teóricos relacionados à reologia farmacêutica. **Visão acadêmica**, v. 11, n. 1, 2010.

LEE, J. W.; PARK, J. H.; ROBINSON, J. R. Bioadhesive-Based Dosage Forms: The Next Generation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, n. 7, p. 850-866, 2000.

MAGURANYI, S.K.; WEBB, C.E.; MANSFIELD, S.; RUSSELL, R.C. Are Commercially Available Essential Oils from Australian Native Plants Repellent to Mosquitoes? **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 25, n. 3, p. 292-300, 2009.

MILAN, A. L. K. *et al.* Estudo da hidratação da pele por emulsões cosméticas para xerose e sua estabilidade por reologia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 649-657, 2007.

MÜLLER, C. C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 343-356, 2004.

OBERMAYR, U.; ROSE, A.; GEIER, M. A Novel Test Cage With an Air Ventilation System as an Alternative to Conventional Cages for the Efficacy Testing of Mosquito Repellents. **Journal of Medical Entomology**, v. 46, n. 6, p. 1116-1122, 2010.

OLIVEIRA, B. R. **Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões com óleos de *Carapa guianensis* e *Copaifera sp.* e estudo da ação repelente frente a *Aedes aegypti***. 2008. 108f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

PALACIO, M. L. B.; BHUSHAN, B. Bioadhesion: a review of concepts and applications. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 370, p. 2321-2347, 2012.

REPKA, M. A.; MCGINITY, J. W. Physical-mechanical, moisture absorption and bioadhesive properties of hydroxypropylcellulose hot-melt extruded films. **Biomaterials**, v. 21, n. 2, p. 1509-1517, 2000.

SMART, J. D. *et al.* The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. **Adv. Drug. Del. Rev.**, v. 57, p. 1556-1568, 2005.

WILLE, T.; THIERMANN, H.; WOREK, F. In vitro kinetic interactions of DEET, pyridostigmine and organophosphorus pesticides with human cholinesterases. **Chemical-Biological Interactions**, v. 190, p. 79-83, 2011.