



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO em
Ciências Ambientais

CAMILO ALEJANDRO CALDERÓN GOMAJOA

**DESENVOLVIMENTO DE REPELENTES NANOESTRUTURADOS DE
LIBERAÇÃO SUSTENTADA CONTENDO PROTETOR SOLAR**

Sorocaba

2021

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO em

**ciências
ambientais**

CAMILO ALEJANDRO CALDERÓN GOMAJOA

**DESENVOLVIMENTO DE REPELENTES NANOESTRUTURADOS DE
LIBERAÇÃO SUSTENTADA CONTENDO PROTETOR SOLAR**

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 Tratamento de efluentes, preservação e recuperação ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto

Sorocaba

2021

G631d Gomajoa, Camilo Alejandro Calderón
Desenvolvimento de repelentes nanoestruturados de
liberação sustentada contendo protetor solar / Camilo Alejandro
Calderón Gomajoa. -- , 2021
78 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara,
Orientador: Leonardo Fernandes Fraceto

1. Nanopartículas. 2. Repelentes. 3. Aedes aegypti. 4.
Radiação solar. 5. Protetor solar. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: DESENVOLVIMENTO DE REPELENTES NANOESTRUTURADOS DE LIBERAÇÃO SUSTENTADA CONTENDO PROTETOR SOLAR

AUTOR: CAMILO ALEJANDRO CALDERON GOMAJOA

ORIENTADOR: LEONARDO FERNANDES FRACETO

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

Prof. Dr. LEONARDO FERNANDES FRACETO (Participação Virtual)
Engenharia Ambiental / Unesp - ICT Sorocaba

Profª. Drª. DANIELE RIBEIRO DE ARAUJO (Participação Virtual)
Centro de Ciências Naturais e Humanas / Universidade Federal do ABC

Prof. Dr. LUCAS BRAGANÇA DE CARVALHO (Participação Virtual)
Engenharia Ambiental / Unesp - ICT Sorocaba

Sorocaba, 24 de fevereiro de 2021

À minha mãe, **Edith Sofía Gomajoa Enríquez**, e aos meus avós, **Hugo Gomajoa Burbano** e **María del Socorro Enríquez Medina** que graças ao seu esforço, dedicação e amor, sempre foram um pilar importante para eu conseguir chegar até este ponto.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Ciência e Tecnologia – Câmpus de Sorocaba e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais, pelo espaço e oportunidade para me tornar um melhor profissional.

Ao Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto por toda a orientação concedida, pelas oportunidades e por acreditar em mim, mesmo antes de me conhecer pessoalmente.

Ao apoio financeiro obtido junto ao edital MCTIC-CNPq/MEC-CAPES/MS-Decit/FNDCT Nº 14/2016 – Prevenção e Combate ao vírus Zika.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 - pela concessão de bolsa.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais, pelos conhecimentos brindados.

À MSc. Daniele Carvalho Abrantes por ser minha primeira instrutora dentro do laboratório, transmitindo seu conhecimento com a maior dedicação e paciência.

Ao Dr. Jhones Luiz de Oliveira pelo apoio brindado no desenvolvimento da pesquisa, pela instrução e orientações, especialmente durante este período de pandemia.

Ao Dr. Jérôme Labille do Centro Nacional de Pesquisa Científica da França, pela doação protetores solares.

A toda minha família, por toda educação, esforço, apoio e amor, apesar da distância. Sem a ajuda de cada um deles não estaria aqui.

Aos demais colegas da pós-graduação em Ciências Ambientais, em especial aos meus companheiros (as) do Laboratório de Nanotecnologia Ambiental pelo convívio, conhecimentos intercambiados e boas conversas.

Um agradecimento especial ao meu amigo e companheiro Carlos Augusto Santos Cristóvão Paraíso, por toda amizade e por ser um grande apoio moral neste processo.

Ao Brasil, por se tornar o meu segundo lar e me brindar as melhores experiências de aprendizado da minha vida, o que me tornou uma melhor pessoa e profissional. Por me apresentar o povo mais amável, prestativo e carismático que já conheci

A todos aqueles que de alguma forma torceram e torcem para o meu sucesso.

“No hay sueños, ideas, ni metas que puedas cumplir sin esfuerzo y dedicación”

Francisco Cayol

RESUMO

O *Aedes Aegypti*, é considerado como um vector de importância mundial a causa da sua alta proliferação e por ser um dos principais vectores de arbovírus, sendo o principal transmissor das quatro doenças arbovirais mais importantes conhecidas na atualidade (dengue, Zika, Chikungunya e febre amarela). Da mesma maneira, nas últimas décadas, afecções causadas pela alta nos índices de incidência da radiação ultravioleta, têm sido reconhecidas por organizações médicas e governamentais, especialmente pelo aumento nas estatísticas de câncer de pele (melanoma e não melanoma). Existem produtos comerciais e especializados, que contribuem na prevenção e tratamento destas problemáticas (repelente e protetores solares), inclusive, têm sido fabricadas formulações capazes de mitigar as duas problemáticas, porém, a caracterização das mesmas é limitada, o que traz incerteza em aspectos como a eficiência dos produtos e o tempo de reaplicação destes, com o fim de evitar riscos de toxicidade e permeabilidade. Devido ao anteriormente mencionado, torna-se importante a aplicação de novas tecnologias para o desenvolvimento de formulações como alternativas de maior eficiência e menor impacto. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver uma formulação repelente contendo filtro solar a base de nanotecnologia como uma estratégia de proteção pessoal tanto contra o mosquito *Aedes Aegypti* quanto aos efeitos da radiação ultravioleta. Após a preparação das diferentes formulações de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) a base de icaridina e geraniol, contendo os distintos protetores solares com princípio ativo de dióxido de titânio (TiO_2), foram caracterizadas quanto a suas propriedades físico-químicas (diâmetro médio, polidispersão e potencial zeta), fluxo de calor em função do tempo, morfologia e capacidade de proteção UV. Os CLNs apresentaram diâmetro médio compreendido entre 257 e 551 nm, índice de polidispersão de 0,06 até 0,33 e potencial zeta de até -23,9 mV. A partir disto, e levando em conta a literatura, as emulsões formuladas com o ativo de proteção solar EUSOLEX® T-AVO foram escolhidas como os sistemas mais promissores para a obtenção de uma formulação final com alta estabilidade, pelo qual, unicamente estas foram alvo de estudo nas seguintes etapas da pesquisa. As formulações com ativo UV EUSOLEX® T-AVO, apresentaram morfologia esférica, com nanopartículas que variam entre 177 e 235 nm com pico endotérmico em 59 °C. De igual forma, foi evidente uma tendência de liberação de ativo icaridina de aproximadamente 25%. Finalmente, através de ensaios de fotodegradação, o ativo EUSOLEX® T-AVO, apresentou eficiência enquanto à proteção de ativos frente à incidência da radiação UV, diminuindo a porcentagem de degradação em aproximadamente 22%. Portanto, estes resultados evidenciam que CLNs de icaridina e geraniol com adição de ativo EUSOLEX® T-AVO durante a fase aquosa, apresentam características ideais para a obtenção de sistemas nanoestruturados de liberação sustentada de dupla funcionalidade (repelente e proteção solar) altamente estáveis e com elevada eficiência.

Palavras-chave: *Aedes Aegypti*. Câncer de pele. Repelente. Protetor solar. Carreadores lipídicos nanoestruturados. Liberação sustentada. Nanotecnologia.

ABSTRACT

Aedes Aegypti, is considered as a vector of worldwide importance, because of its high proliferation and for being one of the main vectors of arbovirus, being the main transmitter of the four most important arboviral diseases known today (dengue, Zika, Chikungunya and yellow fever). In the same way, in the last decades, affections caused by the high incidence rates of ultraviolet radiation, have been recognized by medical and governmental organizations, especially by the increase in skin cancer statistics (melanoma and non-melanoma). There are commercial and specialized products that contribute to the prevention and treatment of these problems (repellents and sunscreens), including formulations capable of mitigating both problems, however, their characterization is limited, which brings uncertainty in aspects such as the efficiency of the products and their reapplication time, to avoid risks of toxicity and permeability. Due to the previously mentioned, it is important to apply new technologies for the development of formulations as alternatives of greater efficiency and less impact. The objective of this work was to develop a repellent formulation containing sunscreen based on nanotechnology as a personal protection strategy against both the *Aedes Aegypti* mosquito and the effects of ultraviolet radiation. After the preparation of the different formulations of nanostructured lipid carriers (NLC) based on icaridine and geraniol, containing the different sunscreens with active principle of titanium dioxide (TiO₂), they were characterized in terms of their physical-chemical properties (medium diameter, polydispersion and zeta potential), heat flow as a function of time, morphology, and UV protection capacity. The NLCs had an average diameter between 257 and 551 nm, a polydispersity index of 0.06 to 0.33 and a zeta potential of -23.9 mV. From this, and considering the literature, emulsions formulated with the EUSOLEX® T-AVO sun protection active were chosen as the most promising systems for obtaining a final formulation with high stability, for which, only these were the target of study in the following stages of the research. The formulations with UV active EUSOLEX® T-AVO, presented spherical morphology, with nanoparticles ranging between 177 and 235 nm with an endothermic peak at 59 °C. Likewise, a trend of release of active icaridine of approximately 25% was evident. Finally, through photodegradation tests, the active EUSOLEX® T-AVO, showed efficiency while protecting assets against the incidence of UV radiation, decreasing the percentage of degradation by approximately 22%. Therefore, these results show that CLNs of icaridine and geraniol with the addition of EUSOLEX® T-AVO active during the aqueous phase, present ideal characteristics for obtaining highly stable nanostructured systems with dual functionality (repellent and sun protection) with high stability and high efficiency.

Keywords: *Aedes Aegypti*. Skin cancer. Repellent. Sunscreen. Nanostructured lipidic carriers. Sustained release. Nanotechnology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de ação dos filtros orgânicos (esquerda) e inorgânicos (direita)	30
Figura 2. Esquema de preparo dos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN)	34
Figura 3. Esquema de preparo dos hidrogéis	36
Figura 4. Esquema do ensaio de liberação	38
Figura 5. Esquema de degradação de azul de metileno. Adaptação da metodologia de Frizzo (2016)	39
Figura 6. Esquema de degradação de icaridina. Adaptação da metodologia de Štrbac et al., (2018)	40
Figura 7. Diâmetro médio (nm) das formulações ao longo do tempo (0, 7, 15, 30 e 60 dias). Os valores foram expressos em média e desvio padrão (n=3) para 6 emulsões de CLN carregados com 5% icaridina (ICA), 2% geraniol (GRL) e diversos tipos de ativo de filtro UV	43
Figura 8. Variação da distribuição de diâmetro médio com respeito à intensidade das diferentes formulações com o decorrer dos dias. A) Formulação de CLN sem adição de ativo de proteção solar. B) EUSOLEX® T-2000 adicionado quando o CLN esteve pronto. C) EUSOLEX® T-AVO adicionado quando o CLN esteve pronto. D) EUSOLEX® T-2000 adicionado durante a fase aquosa. E) EUSOLEX® T-AVO adicionado durante a fase aquosa. F) T-LITE™ adicionado durante a fase orgânica	44
Figura 9. Índice de polidispersão das formulações ao longo do tempo (0, 7, 15, 30 e 60 dias). Os valores foram expressos em média e desvio padrão (n=3) para 6 emulsões de CLN carregados com 5% icaridina (ICA), 2% geraniol (GRL) e diversos tipos de ativo de filtro UV	47
Figura 10. Potencial zeta (mV) das formulações ao longo do tempo (0, 7, 15, 30 e 60 dias). Os valores foram expressos em média e desvio padrão (n=3) para 6 emulsões de CLN carregados com 5% icaridina (ICA), 2% geraniol (GRL) e diversos tipos de ativo de filtro UV	51
Figura 11. Dados de diâmetro médio (nm) das formulações ao longo do tempo (0, 7, 15, 30 e 60 dias) obtidos por DLS. Os valores foram expressos em média e desvio padrão (n=3) para 6 emulsões de CLN carregados com 5% icaridina (ICA), 2% geraniol (GRL) e diversos tipos de ativo de filtro UV	54

Figura 12. Distribuição do diâmetro médio das nanopartículas das formulações de CLN com e sem adição de ativo de protetor solar, em relação a concentração (NTA) e a intensidade (DLS). Os valores correspondem a média (n=3). A) Formulação de CLN sem adição de ativo de proteção solar. B) EUSOLEX® T-2000 adicionado quando o CLN esteve pronto. C) EUSOLEX® T-AVO adicionado quando o CLN esteve pronto. D) EUSOLEX® T-2000 adicionado durante a fase aquosa. E) EUSOLEX® T-AVO adicionado durante a fase aquosa. F) T-LITE™ adicionado durante a fase orgânica.....	56
Figura 13. Termogramas de Calorimetria Diferencial Exploratória para: A) Tripalmitina; B) EUSOLEX T-AVO; C) CLN sem ativo de proteção solar; D) CLN com adição de EUSOLEX T-AVO na emulsão final; E) CLN com adição de EUSOLEX T-AVO durante a fase aquosa.	58
Figura 14. Imagens de microscopia de força atômica das nanopartículas de CLNs: A) CLN; B) CLN com adição de EUSOLEX® T-AVO no final da emulsão; C) CLN com adição de EUSOLEX® T-AVO durante a fase aquosa.....	59
Figura 15. Distribuição de tamanho das nanopartículas por MFA: A) CLN; B) CLN com adição de EUSOLEX® T-AVO no final da emulsão; C) CLN com adição de EUSOLEX® T-AVO durante a fase aquosa.	60
Figura 16. Ensaio de liberação de icaridina nos carreadores lipídicos nanoestruturados contendo EUSOLEX® T-AVO em formulação líquida ao longo de 6 horas. Sendo: AVO F Aq, quando adicionado durante a fase aquosa e AVO NP, quando adicionado na emulsão final de CLN. Os valores representam a média e desvio padrão (n=3).	62
Figura 17. Ensaio de degradação de solução de azul de metileno (MB) (20 mg/L) em água destilada. Espectro de UV-Vis a 664 nm. Os valores representam a média e desvio padrão (n=3).	63
Figura 18. Espectro de varredura UV-Vis de degradação de solução azul de metileno (MB) (20 mg/L).	64
Figura 19. Esquema de degradação de azul de metileno. Adaptação da metodologia de Štrbac (2018).....	65
Figura 20. Ensaio de degradação de solução de azul de metileno (MB) (10 mg/L) em água destilada com adição de ativo com concentração de 0,04 mg de TiO ₂ . Espectro de UV-Vis a 664 nm. Os valores representam a média e desvio padrão (n=3).....	66

Figura 21. Espectro de varredura UV-Vis de degradação de azul de metileno (MB) (10 mg/L) com adição de ativo com concentração de 0,04 mg de TiO ₂	67
Figura 22. Ensaio de degradação de solução de icaridina (ICA) ao limite de concentração em água destilada com adição de ativo com concentração de 0,04 mg de TiO ₂ . Os valores representam a porcentagem da média de concentração de icaridina e desvio padrão (n=3).	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Nanopartículas lipídicas solidas e tipos de carreadores lipídicos nanoestruturados.	32
Tabela 2 - Média dos diâmetros médios (nm) e desvio padrão (n=3). Análise de coeficiente de variação (CV).	45
Tabela 3 - Média dos índices de polidispersão e desvio padrão (n=3). Análise de coeficiente de variação (CV).	48
Tabela 4 - Média do Potencial Zeta (mV) e desvio padrão (n=3). Análise de coeficiente de variação (CV).	52
Tabela 5 - Diâmetro médio e desvio padrão (n=3) obtidos por NTA. Análise de coeficiente de variação (CV).	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	= Análise de variância simples
CDC	= Centro para o Controle e Prevenção de Doenças
CLAE	= Cromatografia líquida de alta eficiência
CLN	= Carreadores lipídicos nanoestruturados
CV	= Coeficiente de variação
DEET	= N, N-dietil-3-metilbenzamida
DLS	= Espectroscopia de correlação de fótons
DP	= Desvio padrão
DSC	= Calorimetria diferencial de varredura
EPA	= Agência de Proteção Ambiental
FPS	= Fator de proteção solar
GRL	= Geraniol
HPMC	= Hidroxipropilmetilcelulose
ICA	= Icaridina
MFA	= Microscopia de força atômica
NTA	= Análise de rastreamento de nanopartículas
PDI	= Índice de polidispersão
PVA	= Álcool polivinílico
PZ	= Potencial Zeta
ROS	= Espécies reativas de oxigênio
TiO ₂	= Dióxido de titânio
UV	= Ultravioleta

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivos Específicos	20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
3.1 Arbovírus e <i>Aedes Aegypti</i>.....	21
3.1.1 Febre amarela	22
3.1.2 Dengue.....	22
3.1.3 Zika.....	23
3.1.4 Chikungunya	23
3.2 Repelentes para <i>Aedes aegypti</i>	24
3.2.1 DEET	24
3.2.2 Icaridina.....	25
3.2.3 Geraniol.....	26
3.3 Câncer de pele.....	27
3.3.1 Câncer de pele melanoma	27
3.3.2 Câncer de pele não melanoma	28
3.4 Protetores solares	28
3.4.1 Filtros UV orgânicos	29
3.4.2 Filtros UV inorgânicos	29
3.5 Carreadores lipídicos nanoestruturados	32
4. METODOLOGIA	33
4.1 Preparação da formulação de liberação sustentada.....	33
4.1.1 Carreadores Lipídicos Nanoestruturados	33
4.1.2 Adição de ativos de proteção solar	34
4.2 Caracterizações físico-químicas das formulações	35
4.2.1 Distribuição de tamanho, polidispersão e potencial zeta.....	35

4.2.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	35
4.2.4 Microscopia de força atômica (MFA)	36
4.3 Preparo e caracterização dos hidrogéis.....	36
4.3.1 Preparo dos hidrogéis	36
4.4 Ensaio de liberação.....	37
4.5 Eficiência de proteção solar.....	38
4.5.1 Degradação de Azul de Metileno	38
4.5.2 Degradação de icaridina.....	39
4.6 Forma de análise dos resultados – método estatístico	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 Caracterizações físico-químicas das formulações	41
5.1.1 Distribuição de tamanho, polidispersão e potencial zeta.....	41
5.1.2 Escolha de formulação mais estável	57
5.1.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	57
5.1.4 Microscopia de força atômica (MFA)	59
5.2 Ensaio de liberação.....	61
5.3 Eficiência de proteção solar.....	62
5.3.1 Degradação de Azul de Metileno	62
5.1.2 Degradação de icaridina.....	67
6. CONCLUSÕES.....	70
8. REFERÊNCIAS.....	72
9. ANEXOS	77

1. INTRODUÇÃO

A transmissão de doenças causadas por arbovírus, como dengue, Zika, Chikungunya e febre amarela (doenças reportadas em América Latina), é causada através da picada da fêmea do mosquito *Aedes aegypti* (CORDEIRO; FERNANDES; EIRAS, 2017), o qual, é um vetor considerado de importância mundial a causa da alta proliferação do mesmo. Isto, a causa da capacidade de fácil adaptação e distribuição em novos habitats deste tipo de mosquito, o que tem permitido que tenha sido encontrado em 188 países ao redor do mundo (LETA et al., 2018).

No Brasil, conforme o boletim epidemiológico da secretaria de vigilância em saúde do Ministério de Saúde de janeiro de 2020, em 2019, foram notificados 1.544.987 casos prováveis de dengue, 132.205 casos de Chikungunya e 10.768 casos prováveis de Zika; sendo as regiões Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste as mais afetadas por arboviroses. Estas cifras alarmantes, têm levado o governo a procurar métodos de combate aos vetores e à propagação das doenças (MINISTÉRIO DE SAÚDE, 2020). De acordo a Teich, Arinelli e Fahham (2017), os custos totais para o país com o manejo de arboviroses em 2016, foram aproximadamente de R\$2,6 bilhões, sendo os estados de Minas Gerais, São Paulo, Bahia e Rio de Janeiro os que mais investiram no combate às mesmas.

Dentro das estratégias de prevenção ao contágio que os órgãos do governo utilizam em seus planos de ação, encontram-se as alvitadas pela Sala Nacional de Coordenação e Controle para o combate ao *Aedes aegypti* do Ministério da Saúde (2017), a que propõe ações que podem ser biológicas (uso de predadores), mecânicas (destruição de criadouros), químicas (uso de inseticidas e larvicidas) ou legais (normas direcionadas à obrigação de manutenção de espaços que podem se tornar criadouros). Porém, uma das alternativas normalmente usada pela população, é o repelente de insetos comercial, devido a fatores como o fácil acesso, a praticidade e o baixo custo, onde o objetivo é evitar o contato do inseto com a pessoa, impedindo a picada e a consequente transmissão da doença (ALDILA; SENO, 2019).

Geralmente, os repelentes comumente ofertados, são formulados com N, N-dietil-3-metilbenzamida (DEET), ativo sintético com alta eficiência quanto a repulsão, mas que representa desvantagens como o odor desagradável, sensação gordurosa na pele e altas concentrações nos produtos (20 - 25%), valores diretamente

proporcionais ao nível de penetração na pele, o que causa reações alérgicas e ou tóxicas nas pessoas, tornando-o pouco seguro, especialmente para mulheres grávidas e crianças menores de 6 anos (TAVARES et al., 2018).

Desta forma, ativos sintéticos como a icaridina, e naturais como o geraniol, têm surgido como alternativas ao DEET, apresentando eficácia semelhante e com menores níveis de concentração e toxicidade, o que representa uma redução no impacto sob a saúde humana e o meio ambiente (TAVARES et al., 2018). Além disso, é de destacar que formulações com técnicas de encapsulamento em nanopartículas destes ativos, vem sendo desenvolvidas com o objetivo de prolongar o tempo de liberação destes compostos e consequentemente, diminuir ainda mais a toxicidade sem perder a eficiência dos mesmos (DA SILVA; RICCI-JÚNIOR, 2020).

Por outro lado, a radiação dos raios ultravioleta é reconhecida como outra problemática atual, devido ao dano progressivo da camada de ozônio, o qual, nas últimas décadas fez aumentar consideravelmente os índices de eritema, fotodermatose, queimaduras, fotoenvelhecimento e câncer de pele (LEITER; KEIM; GARBE, 2020). O aumento nos índices destas enfermidades, foram fatos que tornaram fundamental a divulgação da importância do uso de filtro solar para a prevenção de doenças da derme, principalmente para as pessoas que ficam expostas à radiação ultravioleta por longos períodos de tempo (SILVA et al., 2018).

Os protetores solares podem ter um princípio ativo orgânico e/ou inorgânico. Entre os ativos mais usados se encontra o dióxido de titânio (TiO_2) recoberto, que é um composto inorgânico com uma grande capacidade de absorver a radiação UV, o que aumenta a estabilidade e capacidade de proteção do produto. Além disso, sabe-se que a maioria do material que compõe este ativo, é pensado para permanecer na camada superior da pele (epiderme), em contraste com produtos orgânicos que têm maiores probabilidades de serem absorvidos nas camadas inferiores (derme e hipoderme) (MORSELLA et al., 2016).

Embora já existam produtos comerciais de protetor solar com adição de ativos repelentes, de grande marcas como a SunDay, a L'Oréal, entre outras; é de grande importância a caracterização deste tipo de formulações, a causa de fatores como possíveis alterações na eficiência dos ativos e o tempo de reaplicação dos produtos, pois é conhecido que o protetor solar tem que ser reaplicado a cada duas horas,

porém, o repelente não deve ser aplicado novamente antes de seis horas, todo isto pode levar a um aumento nos níveis de permeabilidade e toxicidade, o que pode influenciar diretamente sob a saúde dos usuários (HAMEED et al., 2019).

Levando em conta o anterior, e os riscos que tanto o *Aedes Aegypti* como a radiação ultravioleta representam sob a saúde das pessoas, se evidencia que um produto com dupla funcionalidade (repelente e protetor UV), formulado com técnicas de nanoencapsulação, contribui na liberação sustentada dos ativos, o que ajuda na compatibilidade no tempo de reaplicação do composto, sem ter risco de toxicidade a causa da ação prolongada gerada pelos nanocarreadores, e sem perder eficiência na ação dos ativos.

2. OBJETIVOS

Desenvolver uma formulação repelente contendo filtro solar a base de nanotecnologia como uma estratégia de proteção pessoal tanto contra o mosquito *Aedes Aegypti* quanto aos efeitos da radiação ultravioleta.

2.1 Objetivos Específicos

- Caracterizar as formulações de liberação sustentada de repelentes nanoestruturados contendo os diferentes ativos propostos como princípio de proteção solar;
- Avaliar a estabilidade em função do tempo das formulações de repelentes nanoencapsulados com proteção solar em razão de medidas de tamanho, potencial zeta e índice de polidispersão;
- Determinar a capacidade de proteção solar das formulações a partir de análises de fotodegradação sob radiação UV em presença de indicadores.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Arbovírus e *Aedes Aegypti*

Os arbovírus são vírus transmitidos por artrópodes, principalmente por mosquitos e carrapatos, que são capazes de causar doenças em humanos. Embora o termo de arbovírus não englobe um grupo taxonomicamente distinto, o histórico de vida e padrões de transmissão são similares, que faz com que a informação obtida de um deles, permita a compreensão, prevenção e controle dos outros (JONES et al., 2020)

O mosquito *Aedes Aegypti*, é o principal vetor de transmissão de arbovírus, e embora se saiba que existem aproximadamente 30 vírus deste tipo que ocasionam doenças nos seres humanos, são quatro os que maior impacto têm tido na saúde dos seres humanos, sendo estes, os que causam a febre amarela, a dengue, a Zika e a Chikungunya (SOUZA-NETO; POWELL; BONIZZONI, 2019). Cabe adicionar que esta espécie de mosquito é também um vetor de doenças zoonóticas como a Febre do Vale do Rift, a qual é considerada como uma das zoonoses emergentes mais graves (LETA et al., 2018).

Além da facilidade de adaptação do mosquito a novos habitats e a distribuição global do mesmo, por conta de fatores como as rotas comerciais e turísticas, a construção de vivendas e assentamentos sem planificação urbana e/ou ambiental, somado à ineficiência das campanhas de controle e prevenção da reprodução do vetor, além do fato de que os vírus causantes das doenças são de ARN de fita simples, conhecido pelas altas taxas de mutação; são as principais razões que, muito provavelmente, tem contribuído na rápida evolução e adaptação do *Aedes Aegypti* e proliferação das doenças transmitidas pelo mesmo, a tal ponto de ter sido reportado em 188 países dos diferentes continentes (LETA et al., 2018; MONTES et al., 2019; SOUZA-NETO; POWELL; BONIZZONI, 2019).

A transmissão dos vírus ao ser humano geralmente é horizontal, ou seja, através da picada de um mosquito fêmea infectado, porém, também pode ocorrer de forma vertical, sendo hereditária por parte da mãe ou do pai durante a gestação, o que representa um grande risco para o descendente (FERREIRA-DE-LIMA; LIMA-CAMARA, 2018).

3.1.1 Febre amarela

Antes do desenvolvimento da vacina, a febre amarela ou febre hemorrágica viral original, foi uma das doenças letais mais receadas, por causa da geração de sintomas como sepse viral pansistêmica com viremia, febre, danos ao fígado, rins e miocárdio, hemorragia e icterícia. Na atualidade, nas regiões tropicais da África e da América do Sul ainda se estimam 200.000 casos anuais, dos quais falecem aproximadamente 30.000 por falta de um tratamento etiológico e o tardio reconhecimento do vírus. Cabe resgatar que não se descartam incidências na América do Norte e Central, Caribe e a Ásia, além de ter sido registrada em 43 países ao redor do mundo, pelo qual a doença continua sendo considerada como um perigo para a saúde dos seres humanos (LETA et al., 2018; VALDÉS, 2017).

Recentemente no Brasil, as áreas mais atingidas por reincidência de febre amarela, são as regiões Sul e Sudeste do país, o que incitou a preocupação das autoridades de saúde, devido à proximidade dos focos aos grandes centros urbanos com alta densidade populacional não imunizada. O maior surto de febre amarela no país tem registros desde dezembro de 2016 até março de 2017, onde foram registrados 448 casos confirmados e 144 óbitos, sendo o estado de Minas Gerais o mais afetado com 349 casos e 118 óbitos, se catalogando como área endêmica da doença junto com os estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo (CAVALCANTE; TAUIL, 2017).

3.1.2 Dengue

A dengue é uma doença viral aguda que é reconhecida como uma das arboviroses mais importantes e de alta distribuição nas regiões tropicais e subtropicais, que causa nos humanos extravasamento vascular, hipotensão, choque, trombocitopenia e diátese hemorrágica, sintomas que podem levar a que o caso seja considerado fatal (REAL-COTTO et al., 2017). Casos oriundos de dengue têm sido notificados em 125 países, sendo considerada a doença arboviral com maior distribuição ao redor do mundo, causando cerca de cem milhões de infecções sintomáticas e 10.000 óbitos por ano, cifras que podem ser acrescidas devido ao aumento da temperatura global, fator que pode permitir a propagação do vetor, e portanto da doença, em zonas de baixo risco ou atualmente classificadas como livres de dengue (MESSINA et al., 2019).

A taxa de mortalidade pelo vírus do dengue no Brasil, tem sido maior do que a recomendada pela Organização Mundial de Saúde (CAVALCANTI et al., 2017). Conforme o Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério de Saúde de janeiro de 2020, só no Brasil em 2019, foram notificados 1.544.987 casos prováveis desta doença, com uma taxa de incidência de 735,2 casos a cada 100 mil habitantes, sendo as regiões Centro-Oeste e Sudeste as mais afetadas, destacando os estados de Minas Gerais, São Paulo e Goiás, que representam 67,9% dos casos nacionais (MINISTÉRIO DE SAÚDE, 2020).

3.1.3 Zika

Esta enfermidade tem sido notificada em 85 países, no entanto, segundo estudos realizados por Leta e colaboradores (2018), cerca de 215 países apresentem condições potencialmente adequadas para a proliferação dos vectores transmissores da mesma. Embora tenha sido notificada na África pela primeira vez em 1954 (na Nigéria), nas Américas foi reportada pela primeira vez em 2015 (no Brasil), afetando principalmente a região Norte e Sudeste, em especial ao estado do Rio de Janeiro (BAUD et al., 2017).

Os sintomas da infecção pelo vírus da Zika, geralmente são erupção cutânea macular ou papular, febre, artrite ou artralgia, conjuntivite não purulenta, mialgia, cefaleia, dor retroorbital, edema e vômitos, podendo apresentar também hematospermia, surdez temporária e audição metálica, inchaço das mãos e tornozelos e sangramento subcutâneo. A infecção pelo vírus da Zika pode ser confundida e diagnosticada incorretamente como dengue, o que pode ter interferido nas estatísticas de incidência destes vírus (BAUD et al., 2017; PETERSEN et al., 2016).

Em 2019, no Brasil, foram notificados 10.768 caso prováveis, com uma taxa de incidência de 5,1 casos a cada 100 mil pessoas, sendo a região Nordeste a mais afetada, seguida das regiões Centro-Oeste e Norte (MINISTÉRIO DE SAÚDE, 2020).

3.1.4 Chikungunya

A Chikungunya é a segunda doença arboviral com maior distribuição global, ao ter sido reportada em 106 países de todos os continentes, é considerada como uma enfermidade artrítica debilitante, que além das fortes dores nas articulações, ocasiona febre e erupções cutâneas. Os sintomas podem durar de um a doze dias e são

tratados mediante medicamentos de controle (analgésicos e antipiréticos) (CUNHA et al., 2017; MINSALUD, 2020).

O primeiro contágio reportado nas Américas foi em 2013 na ilha de Saint Martin, e, no Brasil, a primeira notificação foi no ano de 2014 no estado do Amapá, porém o estado que tem sido mais afetado pela esta doença é o da Bahia (CUNHA et al., 2017; LETA et al., 2018).

O Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério de Saúde de Janeiro de 2020 informou 132.205 casos prováveis em 2019 com uma taxa de incidência de 62,9 casos a cada 100 mil habitantes do Brasil. As regiões do Sudeste e Nordeste foram as mais afetadas, principalmente os estados do Rio de Janeiro e Rio Grande do Norte, que concentraram 75,6% dos casos prováveis nacionais (MINISTÉRIO DE SAÚDE, 2020).

3.2 Repelentes para *Aedes aegypti*

3.2.1 DEET

Devido ao grande surto de doenças arbovirais transmitidas por vetores tais como o mosquito *Aedes aegypti*, às que se atribuem mais de 700 milhões de mortes ao ano no mundo (BARTLOW et al., 2019), uma das alternativas comumente utilizadas para evitar o contágio é o uso de repelentes comerciais. Estes produtos, que têm como objetivo impedir o contato do mosquito com as pessoas e prever picadas, são formuladas na maioria dos casos com N, N-diethyl-3-metilbenzamida (DEET) como princípio ativo de primeira linha, em concentrações que variam de 10% a 80%, inclusive é um ativo recomendado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) e os Centros para o Controle e Prevenção de Doenças (CDC) (DA SILVA; RICCI-JÚNIOR, 2020; PATEL et al., 2016; WEBB; HESS, 2016).

O DEET, é um composto sintético preparado por reação de substituição nucleofílica acíclica, o qual, é considerado como um dos ingredientes ativos com maior eficiência, que em concentrações ideais repele os artrópodes interferindo no olfato, no gosto e nas respostas neuronais dos mesmos. No entanto, é conhecido que em altas concentrações, pode chegar a matar os vetores a causa de falhas neurofisiológicas nos organismos, inclusive, tem sido descoberto que pode provocar efeitos adversos

na saúde dos seres humanos quando utilizado incorretamente, especialmente em mulheres gestantes e crianças (SHRESTHA; LEE, 2020; WEBB; HESS, 2016).

Os efeitos secundários que pode provocar a exposição a altas concentrações de DEET, podem ser desde reações dermatológicas até encefalopatias, sendo a dermatite, a afecção mais comum, a qual gera erupções cutâneas, sensação de ardor, eritema, bolhas, prurido e necrose local. Por outra parte, quando se provocam encefalopatias, podem se apresentar tremores, convulsões, hipertonia e coma. Cabe resgatar, que o sistema cardiovascular, pode se ver comprometido da mesma forma, gerando hipotensão e bradicardia (SWALE; BLOOMQUIST, 2019).

Segundo Tavares e colaboradores (2018), uma formulação repelente ideal, além de possuir baixa toxicidade, baixa permeabilidade e não ser irritante para a pele, membranas mucosas e olhos, deve ser inodora, com ação repelente prolongada para evitar reaplicações, com resistência à água ou suor intenso e tem que incluir um amplo espectro de insetos que repele, em especial mosquitos, além disso tem que ser de baixo custo e amigável com o meio ambiente, entre outros.

É por isto que pesquisas, têm resgatado a importância de outros ingredientes ativos, com capacidades de repelência similares às do DEET, porém sem risco de toxicidade e sem características pouco desejadas nos produtos finais, como odor desagradável ou sensação gordurosa na pele, o que melhora a qualidade e eficiência das formulações (ZHU et al., 2018). Estes ativos podem ser sintéticos como a icaridina, ou naturais como o geraniol, ativos propostos para avaliação na presente pesquisa.

3.2.2 Icaridina

A icaridina ($C_{12}H_{23}NO_3$), também conhecida como picaridina ou KBR 023, é um óleo sintético volátil e insolúvel em água, recomendado pela EPA para o uso como ativo em formulações repelentes que apresenta níveis de baixa toxicidade sem risco de irritação de pele e/ou olhos. Geralmente se encontra em concentrações menores a 20% com um tempo de eficiência de aproximadamente 10 horas e com atuação sobre uma grande diversidade de insetos, em especial mosquitos, moscas e carrapatos (TAVARES et al., 2018).

Diferente do DEET, a icaridina é um ativo inodoro, não gorduroso, não degrada o plástico ou acrílico e possui um efeito de repelência maior ao mosquito *Aedes Aegypti*. Ademais, uma das grandes vantagens da icaridina, é que as formulações com concentrações entre 5 e 10% do ativo são recomendadas para aplicação em crianças com mais de 6 meses de idade, devido à baixa toxicidade. Além disso, devido à lenta evaporação após a aplicação sobre a pele, a icaridina dispõe de mais tempo para a reaplicação se comparado com o DEET, o que contribui à atribuição da baixa toxicidade do composto (TAVARES et al., 2018).

A diferencia do DEET, é inodoro, não gorduroso e não degrada o plástico ou acrílico, tem um efeito de repelência maior frente ao mosquito *Aedes Aegypti* e devido à baixa toxicidade, as formulações com concentrações de 5 a 10% do ativo, são recomendadas para aplicação em crianças com mais de 6 meses de idade. O tempo no qual deve ser reaplicado em comparação ao DEET é maior, a causa da lenta evaporação após aplicada sobre a pele, o que contribui à atribuição da baixa toxicidade do composto (TAVARES et al., 2018).

3.2.3 Geraniol

O geraniol ($C_{10}H_{18}O$), é um álcool monoterpênico acíclico derivado do difosfato de geranil, que ao ser um composto natural, geralmente é extraído das flores de várias espécies de plantas e dos tecidos de certas ervas. Apresenta-se como um óleo amarelo claro pouco solúvel em água, de cheiro e gosto agradável (CHEN; VILJOEN, 2010). Além de server como ativo repelente, é sabido que possui propriedades antimicrobianas, antioxidantes, anti-inflamatórias e antitumorais (DE OLIVEIRA et al., 2018).

Este ativo, tem sido reconhecido como um agente potencial frente ao controle de pragas a causa das suas propriedades inseticidas, repelentes e antialimentarias, as que atuam ao provocar um efeito neurofisiológico nos insetos, suprimindo os impulsos espontâneos dos vetores, que são provocados por estímulos registrados extracelularmente no cordão nervoso abdominal (PRICE; BERRY, 2006). Cabe resgatar que o geraniol é conhecido por possuir baixa toxicidade e biodegradabilidade, o que o torna seguro para o uso em mamíferos, e, traz vantagens de eficiência quando usado em produtos repelentes em comparação a outros ativos (CHEN; VILJOEN, 2010).

Em um estudo feito por Omolo e colaboradores (2004), foi concluído que o geraniol exibiu uma repelência relativamente alta frente a mosquitos, inclusive maior à de outros ativos como citronela e linalol. Da mesma forma, Hao et al., (2008), demonstraram durante um teste de braço em gaiola e bioensaio de sangue de um camundongo que foi disposto como isca, que o geraniol foi capaz de que 100% dos mosquitos sometidos a exposição ao ativo, perderam a capacidade de procura de hospedes, assim como alteração nas etapas de ativação e orientação do comportamento de alimentação de sangue.

3.3 Câncer de pele

Junto com afecções na pele como o fotoenvelhecimento, eritemas e queimaduras, o câncer de pele é umas das doenças malignas mais comuns no mundo. Atualmente é considerada de interesse global, pela afecção à saúde das pessoas e o grande aumento nos índices de incidência deste tipo de neoplasia. O câncer de pele pode ser do tipo melanoma ou não melanoma, os quais são as classes de carcinomas malignos que mais afetam à população, especialmente às pessoas de pele branca. Aproximadamente 350.000 casos de melanoma e 13 milhões de casos não melanoma são reportados anualmente no mundo todo, gerando cerca de 81.000 mortes (APALLA et al., 2017; SILVA et al., 2018).

3.3.1 Câncer de pele melanoma

O melanoma, é comumente diagnosticado em pessoas com idade de aproximadamente 60 anos (APALLA et al., 2017). Este tipo de neoplasia, se desenvolve nos melanócitos, que são as células que produzem a melanina (substância que determina a cor da pele), e pode aparecer em qualquer parte do corpo (pele ou mucosas), adquirindo a forma de manchas, pintas ou sinais (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2020a).

Apesar de representar apenas 3% do total de tumores malignos registrados no Brasil, é o tipo mais grave por causa da alta probabilidade de provocar metástase, disseminando o câncer para outros órgãos, porém quando detectado a tempo e fazendo o tratamento com medicamentos imunoterápicos, é possível detê-lo, aumentando as possibilidades de sobrevivência do paciente. Se estima que até agosto do presente ano, surgiram 8.450 novos casos de câncer melanoma no Brasil,

sendo 4.200 homens e 4.250 mulheres. (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2020a).

3.3.2 Câncer de pele não melanoma

A incidência do câncer de pele não melanoma é aproximadamente 20 vezes maior à do melanoma, isto devido à diversidade de neoplasias malignas incluídas dentro deste termo, como o carcinoma basal e espinocelular. No entanto a taxa de mortalidade do mesmo é muito menor, com 0,42 óbitos a cada 100.000 pacientes, porém, isto não tira os tipos de câncer não melanoma das estatísticas de mortalidade notável e custo substancial, ainda mais, ao levar em conta que os índices da doença aumentam de 3% a 10% ao ano (APALLA et al., 2017).

Este, é mais comum em pessoas com mais de 40 anos e corresponde a 30% dos tumores malignos registrados no Brasil, apesar de apresentar altos níveis de cura, os pacientes que não tratam ele precocemente, são propensos a sofrer mutilações das partes do corpo afetadas, devido à apresentação de tumores como o carcinoma basocelular e o carcinoma epidermoide. Cerca de 176.930 casos novos de neoplasias não melanoma foram registradas no ano de 2020 até o mês de agosto, sendo 83.770 homens e 93.160 mulheres (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2020b).

3.4 Protetores solares

O constante aumento da deterioração da camada de ozônio, tem feito aumentar os níveis de incidência da radiação ultravioleta emitida pelo sol sobre a Terra, o que desencadeou uma série de consequências de todo tipo no planeta, entre elas, efeitos secundários sob a saúde dos seres humanos. A causa da alta exposição aos raios UV, as estatísticas de afeções dermatológicas como eritema, queimaduras, fotodermatose, fotoenvelhecimento e câncer de pele tipo melanoma e não melanoma, têm aumentado consideravelmente (LEITER; KEIM; GARBE, 2020).

Da mesma forma, é de resgatar que tem sido descoberto que a radiação UV-A, danifica o DNA através da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), provocando modificações oxidativas da base e rupturas na cadeia do mesmo, gerando mutações nas células dos mamíferos, da mesma forma, a radiação UV-B, incide diretamente sobre o DNA, gerando apoptoses ou erros na replicação, o que leva à mutações ou câncer (NGOC et al., 2019).

Levando em conta o anterior, o uso de protetor solar é considerado como um elemento fundamental dentro do dia a dia das pessoas e é recomendado por várias organizações ao redor do mundo, como por exemplo a Sociedade Brasileira de Dermatologia, sendo indispensável uma formulação com um fator de proteção solar (SPF) superior a 30 e com tempo de reaplicação de duas horas, com o intuito de minimizar os riscos da incidência da radiação UV na pele (BELL, 2016).

Os princípios ativos de proteção solar podem ser orgânicos ou inorgânicos e os produtos comumente comercializados podem incluir um ou mais destes ativos nas suas formulações, o que pode beneficiar na proteção não só frente aos raios UVB, senão também aos UVA (NGOC et al., 2019).

3.4.1 Filtros UV orgânicos

Os agentes orgânicos, como o Octyl Methoxycinnamate (OMC) e o Butilmetoxi Dibenzoil Metano (BMDM), absorvem a radiação UV do sol, convertendo energia em radiação de ondas longas que é inofensivamente dispersa (Figura 1). Estes ativos evidenciam propriedades estéticas e de excelente biossegurança ao apresentar estabilidade e por não serem compostos irritantes, voláteis ou fotossensibilizantes, além disso, não mancham a pele. Porém, existem alguns agentes que podem chegar a incidir na saúde das pessoas, provocando reações indesejadas como dermatite eczematosa, sensação de queimação e aumento do risco de câncer de pele, ademais, é sabido que alguns deles podem influenciar diretamente no ambiente, sobretudo na conservação dos arrecifes de coral, pelo qual, os fabricantes de protetores solares têm preferido a utilização de ativos inorgânicos, que não representam este tipo de riscos (MORSELLA et al., 2016; NGOC et al., 2019).

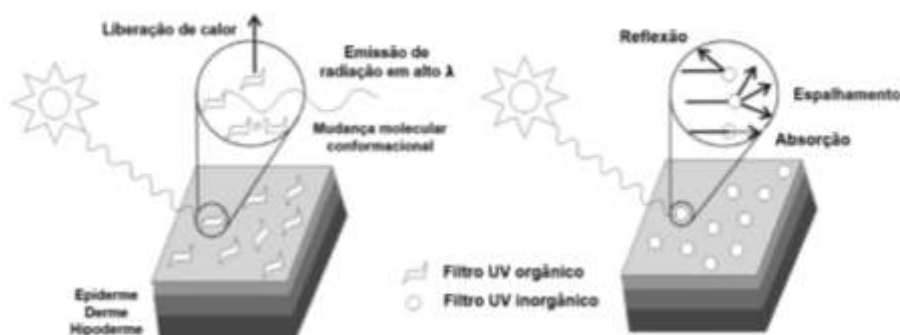
3.4.2 Filtros UV inorgânicos

Por outra parte, os ativos inorgânicos, funcionam refletindo, espalhando e bloqueando a radiação UV, agindo como uma barreira física que não permite a passagem dos raios (Figura 1); um exemplo é o dióxido de titânio (TiO_2), que é o princípio mais comumente utilizados nas formulações de proteção solar (MORSELLA et al., 2016).

Geralmente, os compostos inorgânicos são menos tóxicos, mais estáveis e mais seguros para os humanos e o ambiente, em comparação aos filtros inorgânicos. Porém, os resíduos dos pigmentos brancos destes fazem que sejam reconhecíveis

quando aplicados na pele e podem chegar a manchar as roupas, fato que é reduzido drasticamente quando sintetizados em partículas micro e nanométricas. Além disso, as formulações com nanopartículas recobertas, minimizam a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), o que ajuda a prevenir efeitos negativos sob a saúde, especialmente câncer (NGOC et al., 2019).

Figura 1. Mecanismos de ação dos filtros orgânicos (esquerda) e inorgânicos (direita)



Fonte: (GEOFFREY; MWANGI; MARU, 2019)

3.4.2.1 Dióxido de titânio (TiO_2)

O TiO_2 é um óxido metálico natural do titânio, que tem diferentes aplicações entre as quais está o uso em protetores solares devido a sua grande capacidade de absorver a luz UV e a sua resistência à descoloração sob esta luz, o que aumenta a sua estabilidade e capacidade de proteger a pele dos raios ultravioleta. Além disso, sabe-se que o dióxido de titânio é um refletor UV superior devido ao seu alto índice de refração e que a maioria do material é pensado para estar na epiderme, que é a parte superior da pele, em contraste com produtos químicos orgânicos de proteção solar que são absorvidos nas camadas inferiores (derme e hipoderme) (MORSELLA et al., 2016). As formulações de proteção solar utilizadas no presente estudo, têm como ingrediente ativo principal o dióxido de titânio.

3.4.2.2 Eusolex® T-2000

Eusolex® T-2000, é um protetor solar inorgânico a base de TiO_2 com a superfície modificada com rutilo e formado por partículas de 10 a 15 nm, é um composto anfifílico, ao qual é adicionado nas formulações cosméticas durante a fase aquosa ou oleosa em concentrações de 5%. Geralmente é utilizado como filtro UV-A

em produtos especialmente desenhados para crianças, bebês e pessoas com a pele muito branca ou sensível ao sol, mas também costuma ser adicionado em cosméticos de cuidado diário da pele, cremes e base de maquiagem devido à alta transparência (EMD, 2020; LÍŠKOVÁ et al., 2020).

3.4.2.3 Eusolex® T-AVO

Eusolex® T-AVO é um ativo de proteção solar inorgânico composto por um núcleo de TiO_2 (80%) com modificação de rutilo recoberto de SiO_2 (20%), com a finalidade de evitar os efeitos secundários fotocatalíticos do núcleo (L. SLOMBERG et al., 2020). É um produto anfifílico, o qual deve ser adicionado durante a fase aquosa ou oleosa das formulações, com uma concentração de 5%. Comumente, se usa para elaboração de formulações para o cuidado da pele contra a radiação UV-A e UV-B, sendo apto para uso em bebês e crianças (EMD, 2020).

Os produtos Eusolex® T são fabricados pelas empresas alemãs Merck KGaA, encarregada das análises, distribuição e desenvolvimento das aplicações; e Sachtleben Chemie GmbH, especialista na fabricação de partículas de dióxido de titânio microfino (EMD, 2020).

3.4.2.4 T-Lite™

T-Lite™ é um filtro UV-A e UV-B de amplo espectro baseado em dióxido de titânio microfino, o que segundo o fabricante, facilita a formulação com pigmentos. Este, é um composto que apresenta um ótimo desempenho em termos de dispersibilidade, compatibilidade e transparência, inclusive quando adicionado em concentrações maiores a 8%, porcentagem geralmente recomendada. É um ativo anfipático, pelo qual, deve ser adicionado durante a fase orgânica das formulações (BASF, 2020).

Além de ser utilizado para proteção solar, é recomendado para produtos de cuidado diário e cosméticos decorativos devido a excelente transparência e melhor sensação na pele quando aplicado. Ademais, por não ser um produto irritante, seu nível de toxicidade ser baixo e nenhuma atividade fotocatalítica, é recomendado para aplicação em peles sensíveis e para cuidados infantis. Este protetor solar, é fabricado pela empresa alemã BASF Aktiengesellschaft (BASF, 2020).

3.5 Carreadores lipídicos nanoestruturados

Um carreador lipídico nanoestruturado (CLN), é um sistema coloidal formulado a partir da mistura de lipídios sólidos e líquidos, com o fim de resolver problemas de instabilidade de dispersões aquosas de nanopartículas de lipídios puramente sólidos (SLN), que na maioria dos casos, apresentavam fenômenos de solidificação e posterior cristalização do lipídeo, provocando a expulsão acelerada e total dos ativos encapsulados, fato totalmente indesejado nas formulações de liberação sustentada (GALEANO; HUERTAS, 2018).

A chegada dos CLN melhorou a capacidade de carga da molécula ativa, evitando a expulsão precoce do princípio ativo e aumentando o tempo de eficiência das formulações ao ter um tempo de liberação sustentada maior, além disso, os CLN representam maior estabilidade no diâmetro médio das partículas, evitando cristalização ou formação de agregados. Cabe adicionar que a administração tópica dos CLN, melhora a dispersão das formulações, reduz a possível existência de efeitos secundários e tem um efeito oclusivo, o qual, faz que a formulação seja capaz de criar um filme hidrofóbico, o qual traz vantagens como a baixa absorção do produto na pele e a resistência à água, o que em geral leva a um aumento no tempo de ação dos ativos e redução dos riscos de toxicidade. (GALVÃO, 2015; GORDILLO-GALEANO; MORA-HUERTAS, 2018). Existem três tipos de CLN que se descrevem na Tabela 1.

Tabela 1 - Nanopartículas lipídicas solidas e tipos de carreadores lipídicos nanoestruturados.

(continua)

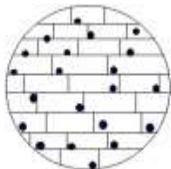
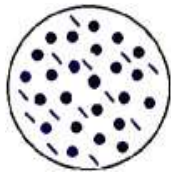
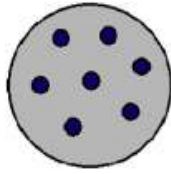
Nanopartículas lipídicas	Ilustração esquemática	Descrição
Nanopartículas de lipídios sólidos (SLN)		Estrutura de rede cristalina perfeita. Tem pouco espaço para a inclusão do ativo dentro do núcleo lipídico, o que interfere na carga do ativo e na pouca e instável liberação do mesmo.

Tabela 1 - Nanopartículas lipídicas solidas e tipos de carreadores lipídicos nanoestruturados.
(conclusão)

Nanopartículas lipídicas	Ilustração esquemática	Descrição
CLN Tipo I		Tem um núcleo de cristal imperfeito no qual existe maior espaço para ocupação do ativo, o que contribui numa maior carga do princípio e reduz a instabilidade da partícula, evitando a expulsão precoce do composto.
CLN Tipo II		É conhecido por não ter estrutura devido aos lipídios sólidos não se cristalizam e sim adquirirem uma forma amorfa.
CLN Tipo III		Modelo múltiplo, também conhecido como modelo O/F/W, onde os ativos com maior solubilidade em lipídios líquidos, podem ser formulados, diluindo o ativo e distribuindo-o uniformemente no núcleo sólido. Pode ser preparado através do método de separação de fases.

Fonte: (SALVI; PAWAR, 2019)

4. METODOLOGIA

4.1 Preparação da formulação de liberação sustentada

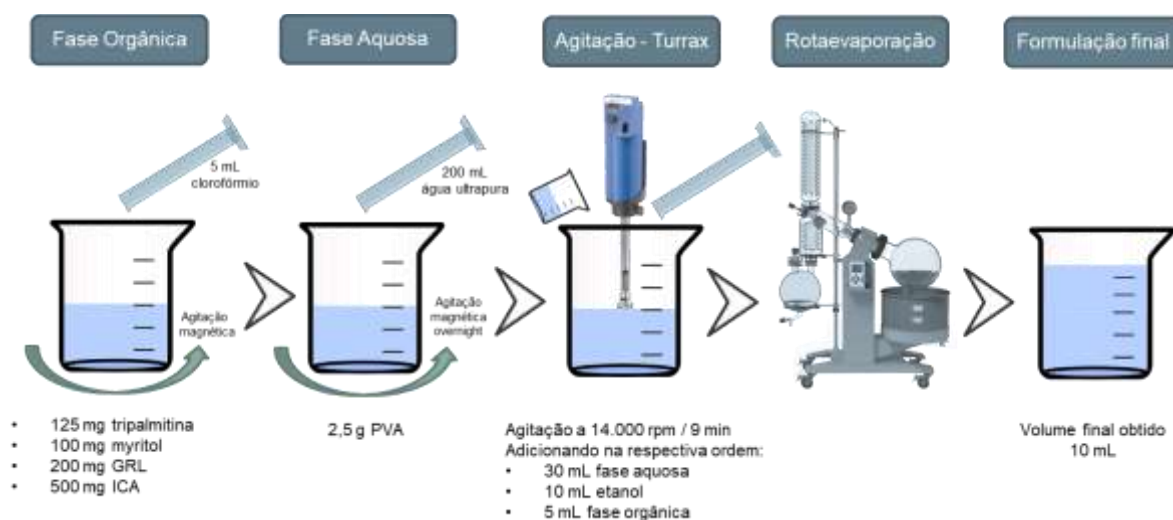
4.1.1 Carreadores Lipídicos Nanoestruturados

Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) foram preparados utilizando o processo de emulsão e evaporação de solvente (VITORINO et al., 2011). Inicialmente, foi preparada sob agitação e temperatura ambiente (overnight), 30 ml de solução de água deionizada com 12,5 mg/mL de álcool polivinílico (PVA).

Posteriormente, foi preparada a fase orgânica, onde 125 mg de tripalmitina e 100 mg de myritol, foram dissolvidos em 5 mL de clorofórmio; nesta mesma fase, foram adicionados 500 mg de icaridina e 200 mg de geraniol, considerados como os ativos de repelência do atual estudo. Em seguida, a fase aquosa foi submetida a agitação por Ultra-Turrax a 14000 rpm por nove minutos, e foram incorporados 10 mL de álcool etílico junto com a fase orgânica.

A pré-emulsão resultante foi levada ao evaporador rotativo para eliminar o solvente orgânico, logo após, o volume da emulsão final (10 mL) foi medido e corrigido, quando necessário (Figura 2).

Figura 2. Esquema de preparo dos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN)



Fonte: Autoria própria

4.1.2 Adição de ativos de proteção solar

Os ingredientes ativos que foram incorporados nas formulações como absorvedores de UV têm como base o Dióxido de Titânio (TiO_2), estes ativos foram o EUSOLEX® T-AVO, EUSOLEX® T-2000 e T-Lite™. Estes ativos foram doados pelo Dr. Jérôme Labille, cientista pesquisador do Centro Nacional de Pesquisa Científica da França.

Considerando as características únicas de cada composto e levando em conta as sugestões dos fabricantes, foram elaboradas cinco diferentes formulações contendo filtro solar. Inicialmente, na primeira emulsão foram adicionadas 800 mg (8%) de T-Lite™ durante a fase orgânica da elaboração do carreador lipídico nanoestruturado.

Por outra parte, o ativo EUSOLEX® T-AVO, foi considerado em duas diferentes fases. Na primeira delas, foram adicionados 500 mg (5%) deste composto durante a preparação da pré-emulsão, ou seja, durante a agitação da fase aquosa por Ultra-Turrax. E na segunda, os 500 mg foram acrescentados à formulação sob agitação após o preparo final da formulação repelente, ou seja, após à evaporação dos solventes orgânicos. Para a obtenção das duas últimas formulações, foram repetidos os procedimentos anteriormente descritos, porém, com a inclusão de EUSOLEX® T-2000 como ingrediente ativo à mesma concentração.

4.2 Caracterizações físico-químicas das formulações

4.2.1 Distribuição de tamanho, polidispersão e potencial zeta

Foram realizadas medidas contínuas do diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e do potencial zeta das nanopartículas com e sem os repelentes e ou os filtros UV. As medidas das amostras diluídas com água ultrapura foram realizadas no equipamento ZetaSizer Nano ZS 90 (Malvern), a um ângulo de 90° e à 25 °C (CEREDA et al., 2013; CLEMENTE et al., 2014).

Também foram efetuadas medidas de rastreamento de nanopartículas para determinar a concentração e a distribuição de tamanho das nanopartículas contendo os ativos (ANDERSON et al., 2013). Para tal análise, as amostras foram diluídas e analisadas em uma célula volumétrica do equipamento NanoSight LM10 (NTA), empregando um laser com comprimento de onda de 532 nm (verde), câmera CMOS e software NanoSight (versão 3.1).

4.2.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Amostras com 5 mg de massa das matérias-primas e das nanopartículas, pesadas em balança analítica, foram analisadas utilizando o equipamento DSC Q20 TA Instruments®. Foram dispostas em cadinhos de alumínio selados com tampa e como referência, foi utilizado um outro cadinho com tampa, porém vazio. Termogramas obtidos em atmosfera de nitrogênio (50 mL/min), foram resultado de um programa térmico que contemplou uma rampa de aquecimento de 0 a 180 °C, com uma taxa de 10 °C por minuto (OLIVEIRA, 2015).

4.2.4 Microscopia de força atômica (MFA)

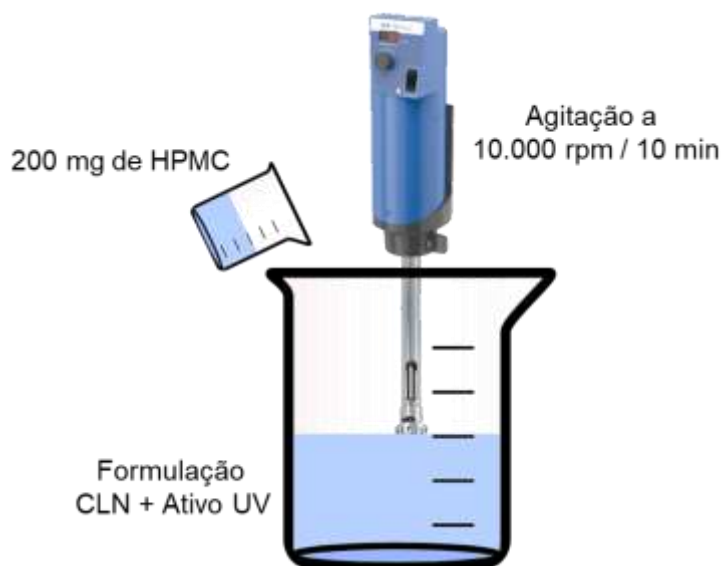
A morfologia das superfícies das nanopartículas foi determinada por meio de Microscopia de Força Atômica (MFA). As suspensões de nanopartículas previamente diluídas (1:20000), foram depositadas sobre placas de silício previamente preparadas com remoção de dióxido de silício para facilitar a interação/adesão da amostra nas placas. As análises foram realizadas em microscópio (BTO2217, Nanosurf) em modo contato intermitente. Se utilizou cantilever comercial TapAL-G (Budgetsensors) e uma taxa de varredura de 90 Hz. As imagens foram analisadas no software Gwyddion (GRILLO et al., 2012).

4.3 Preparo e caracterização dos hidrogéis

4.3.1 Preparo dos hidrogéis

Para a preparação dos hidrogéis foi levado em conta o método de Subrahmanyam (2012), onde a formulação destes teve uma variação de 1,5% a 2% m/v de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), junto com 0,5% m/v de hidroxietilcelulose (HEC). As soluções foram preparadas sob agitação mecânica durante 20 minutos a 10.000 rpm, até que a homogeneização entre o polímero e a solução de nanopartículas estivesse completa (Figura 3).

Figura 3. Esquema de preparo dos hidrogéis.



Fonte: Autoria própria.

4.4 Ensaio de liberação

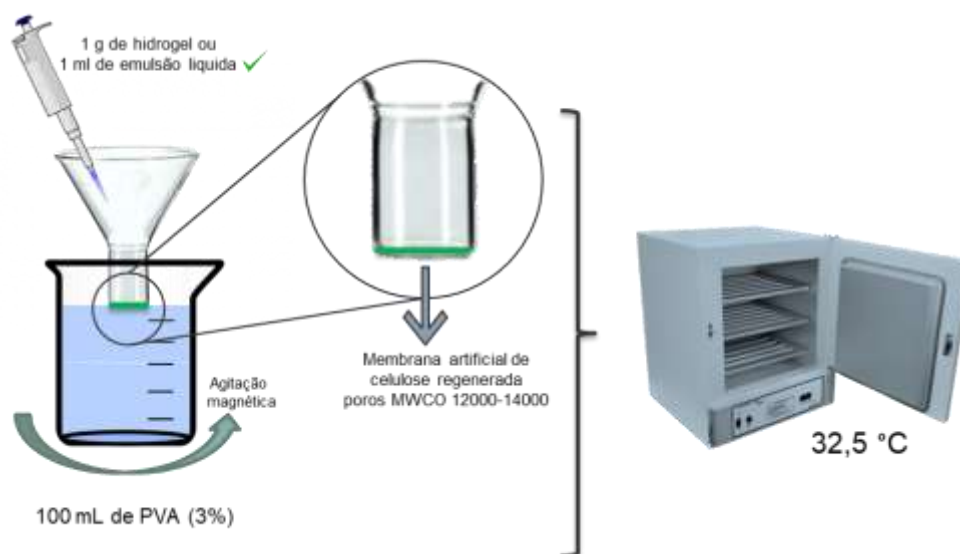
Para observar o grau de liberação dos ativos encapsulados nas nanopartículas de CLN, foi montado um aparato para o ensaio de liberação e estufa a 32,5 °C, no qual o meio acceptor era composto por um béquer contendo 100 mL de co-eluyente (PVA 3%) sob leve agitação. O meio doador foi composto por um dispositivo suspenso contendo uma membrana artificial de celulose regenerada, com poros MWCO 12000-14000 Da, separando os meios doador e acceptor.

No compartimento superior da membrana (doador), foram dispostos 1 mL de emulsão líquida da formulação a ser analisada. Alíquotas de 1 mL do co-eluyente foram coletadas em períodos de 15 minutos durante as primeiras duas horas, a cada 30 minutos durante as seguintes duas horas e a cada hora nas horas 5 e 6. Deve-se levar em consideração que cada vez que uma alíquota era coletada, ao mesmo tempo era substituída por mais 1 mL de co-eluyente.

As alíquotas foram dispostas em vials para posteriormente serem analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), através do equipamento Ultimate 3000 – Thermo Fisher Scientific.

O teste foi feito com as formulações em um único estado (emulsão), em triplicata com o fim de obter maior veracidade nos dados coletados e com leitura para um único ativo (icaridina). Através da área da curva do composto, foi possível obter a concentração do ativo e consequentemente a porcentagem de liberação do mesmo. Para a detecção de icaridina, foi utilizado 35% de água destilada e 65% de metanol como fase móvel, e, para a fase estacionária, foi utilizada a coluna Phenomenex, Gemini 5 µm C₁₈, 150 x 4,60 mm (Figura 4).

Figura 4. Esquema do ensaio de liberação.



Fonte: Autoria própria.

4.5 Eficiência de proteção solar

4.5.1 Degradação de Azul de Metileno

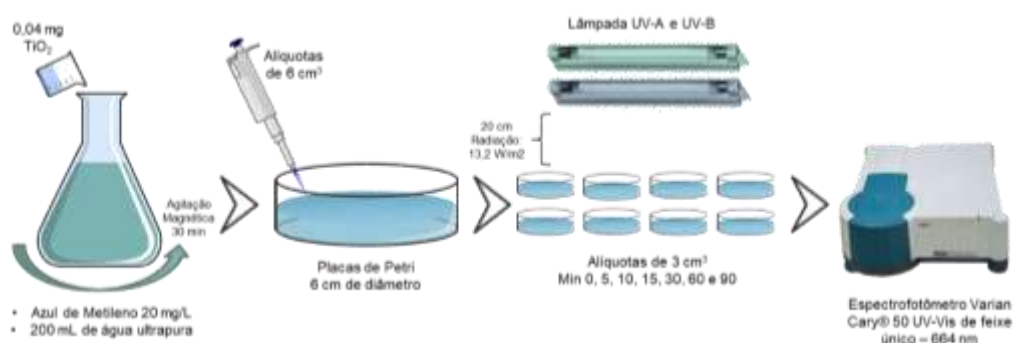
Para determinar a capacidade de proteção contra a radiação UV dos princípios ativos que compõem os protetores solares escolhidos, foi adaptada a metodologia proposta por Frizzo et al., (2016), onde se dissolveram 0,04 mg do ativo de TiO_2 em 100 mL de solução de azul de metileno (20 mg/L) em água ultrapura.

As suspensões foram agitadas durante meia hora a fim de assegurar o equilíbrio de adsorção entre os sólidos e o líquido. Após a agitação, alíquotas de 6 cm^3 foram transferidas para placas de Petri de 6 cm de diâmetro, as quais foram irradiadas sem tampa a uma distância aproximada de 20 cm. A irradiação foi feita utilizando uma lâmpada USHIO G15T8E – 15 W de 450 mm com espectro de emissão no UV-B (306 nm), e, uma lâmpada PHILIPS 15 W de 450 mm com espectro de emissão no UV-A, obtendo uma radiação sobre as placas de 13,2 W/m^2 . Foi feito um controle com azul de metileno sem o ativo do filtro sob irradiação UV, e outro controle de azul de metileno com ativo sem irradiação UV.

Alíquotas de 3 mL foram coletadas no minuto 0, 5, 10, 15, 30, 60 e 90, para posteriormente serem analisadas usando espectrofotômetro Varian Cary® 50 UV-Vis de feixe único, com o objetivo de medir a variação na concentração de azul de

metileno em cada amostra, as leituras foram feitas em comprimento de onda de 664 nm utilizando cubeta de vidro. As flutuações nos níveis de absorbância ao longo do tempo foram relacionadas com a capacidade de proteção dessa amostra em particular frente à irradiação UV (RAMPAUL; PARKIN; CRAMER, 2007) (Figura 5).

Figura 5. Esquema de degradação de azul de metileno. Adaptação da metodologia de Frizzo (2016)



Fonte: Autoria própria

4.5.2 Degradação de icaridina

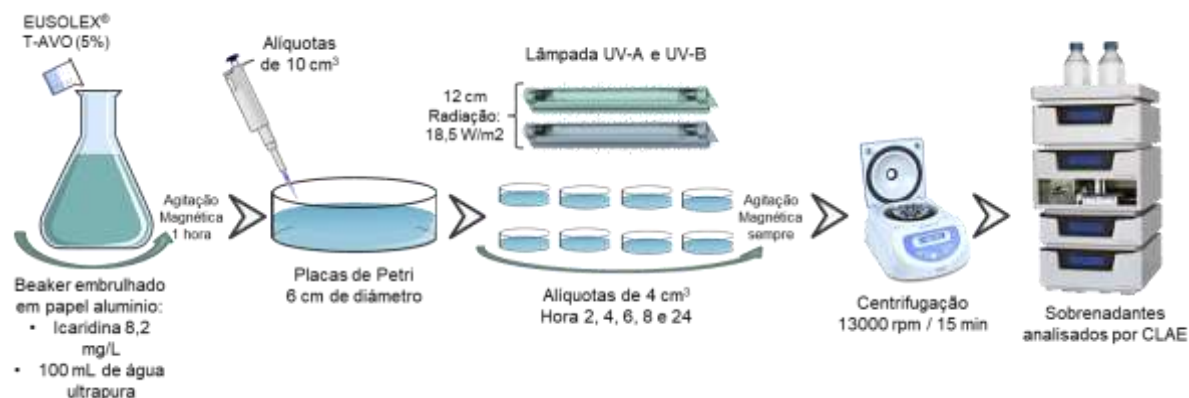
Levando em conta a metodologia proposta por Štrbac et al., (2018) e adaptando-a, foram preparados 100 mL de solução de Icaridina ($\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{NO}_3$) no limite de concentração de solubilidade do ativo (8,2 g/L), em água ultrapura. Posteriormente, foi dissolvido o ativo de proteção solar EUSOLEX® T-AVO, na mesma concentração (5%) utilizada para o preparo das formulações de CLN. A solução foi agitada durante 1 hora em agitador magnético, com o fim de garantir o equilíbrio de adsorção entre os componentes, este processo foi realizado em um beaker embrulhado em papel alumínio e em ambiente com pouca ou nula presença de luz para evitar qualquer degradação previa dos ativos.

Posteriormente, a solução foi distribuída em placas de Petri (10 mL em cada uma), as quais foram irradiadas utilizando uma lâmpada USHIO G15T8E – 15 W de 450 mm com espectro de emissão no UV-B (306 nm), e, uma lâmpada PHILIPS 15 W de 450 mm com espectro de emissão no UV-A. Alíquotas de 4 mL foram coletadas na hora 2, 4, 6, 8 e 24. As placas estiveram sob agitação magnética o tempo todo.

As alíquotas coletadas foram centrifugadas em microtubos tipo Eppendorf com filtro a 13000 rpm durante 15 minutos, posteriormente, os sobrenadantes foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com metodologia para

detecção de icaridina descrita no item 4.4. As alterações nos níveis de concentração de icaridina ao longo do tempo foram relacionadas com a capacidade de proteção da amostra frente à irradiação UV (Figura 6).

Figura 6. Esquema de degradação de icaridina. Adaptação da metodologia de Štrbac et al., (2018).



Fonte: Autoria própria

4.6 Forma de análise dos resultados – método estatístico

Os dados coletados em triplicata foram representados como médias $\pm$ desvio padrão. Os softwares utilizados para representar os dados em gráficos foram GraphPad Prism 8 e OriginPro 2018.

Para determinar se existiam diferenças significativas nas diversas análises, foi utilizado o software estatístico Statgraphics Centurion (v. XVII), no qual os dados foram submetidos a uma análise de variância simples (ANOVA) e de acordo ao tipo de grupo de dados (normal ou não normal), se escolheu uma prova não paramétrica (Kruskal-Wallis) ou uma prova paramétrica (Teste de Fisher), ambas a $p \leq 0,05$ com um nível de confiança de 95%. Com o intuito de conhecer a distribuição dos dados se aplicou a prova de Shapiro-Wilks a $p > 0,05$ (MONTGOMERY, 2017).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterizações físico-químicas das formulações

5.1.1 Distribuição de tamanho, polidispersão e potencial zeta

5.1.1.1 Tamanho das nanopartículas

Os resultados das análises realizadas através da técnica de espectroscopia de correlação de fótons para tamanho das nanopartículas são apresentados na Tabela 2. Podemos observar que a nanopartícula com maior diâmetro médio corresponde à formulação na qual o ativo de proteção solar T-LITE™ esteve presente, tendo um diâmetro médio de 550 ± 138 nm. Por outra parte, a nanopartícula com menor diâmetro médio, sem levar em conta a nanopartícula de CLN sem adição de ativo de filtro UV (257 ± 5 nm), corresponde à formulação na qual o ativo EUSOLEX® T-AVO foi adicionado uma vez a emulsão de CLN esteve pronta, com uma média no diâmetro de 327 ± 87 nm.

Segundo Montgomery (2017), quanto menor seja o coeficiente de variação (CV), maior será a homogeneidade dos valores da variável, representando uma fraca dispersão entre os dados quando o CV é $\leq 15\%$, moderada dispersão quando $15\% < CV \leq 30\%$, e, uma forte dispersão quando $CV > 30\%$. Desta forma podemos dizer que, de acordo a Tabela 2, os dados que representam as formulações de CLN sem adição de ativo de protetor solar e o CLN com adição de EUSOLEX® T-2000 durante a fase aquosa, têm uma fraca dispersão (1,9% e 13,7% respetivamente). A nanopartícula de CLN com agregação de EUSOLEX® T-2000 após a obtenção da emulsão final, representa a maior dispersão nos dados, com um CV de 65,7%. A diferença para essas formulações também fica evidente na alteração no perfil de distribuição de tamanho em função do tempo (Figura 8-B).

Entre as provas estatísticas de correlação de dados enquanto à comparação do tamanho das nanopartículas durante o passar do tempo, a prova de Análise de Variância (ANOVA), indicou que não existem diferenças significativas entre os dados ($p > 0,05$). Devido a que os dados não seguiam uma distribuição normal, foi aplicada a prova de Kruskal-Wallis onde se confirmou que não existe diferença significativa entre as medianas de cada grupo com um nível de 95% de confiança.

Apesar de ter passado cerca de dois meses após a primeira medição de dados e de se evidenciar tanto na Tabela 2, quanto nas Figura 7 e 8 que aos 60 dias houve um aumento notório na média geral do diâmetro médio das nanopartículas (de 351 nm para 417 nm), as análises estatísticas demonstraram que não existe diferença significativa entre os tamanhos no decorrer dos dias. Da mesma forma Wissing e Müller (2001), demonstraram que o tamanho de CLNs com incorporação de ingrediente ativo de proteção solar (Acetato de Tocoferol – $C_{31}H_{52}O_3$), obtiveram um diâmetro médio de 200 nm, valor que permaneceu sem variações e sem diferenças significativas entre os dados durante mais de um ano.

Por outra parte, quando as análises foram feitas para comparar o diâmetro médio entre os diferentes tipos de formulações, a prova ANOVA mostrou que têm diferenças significativas ($p \leq 0,05$). Assim, devido a que os dados não seguiam uma distribuição normal, foi aplicada a prova de Kruskal-Wallis onde se confirmou que existem diferenças significativas entre as medianas de cada grupo com um nível de 95% de confiança.

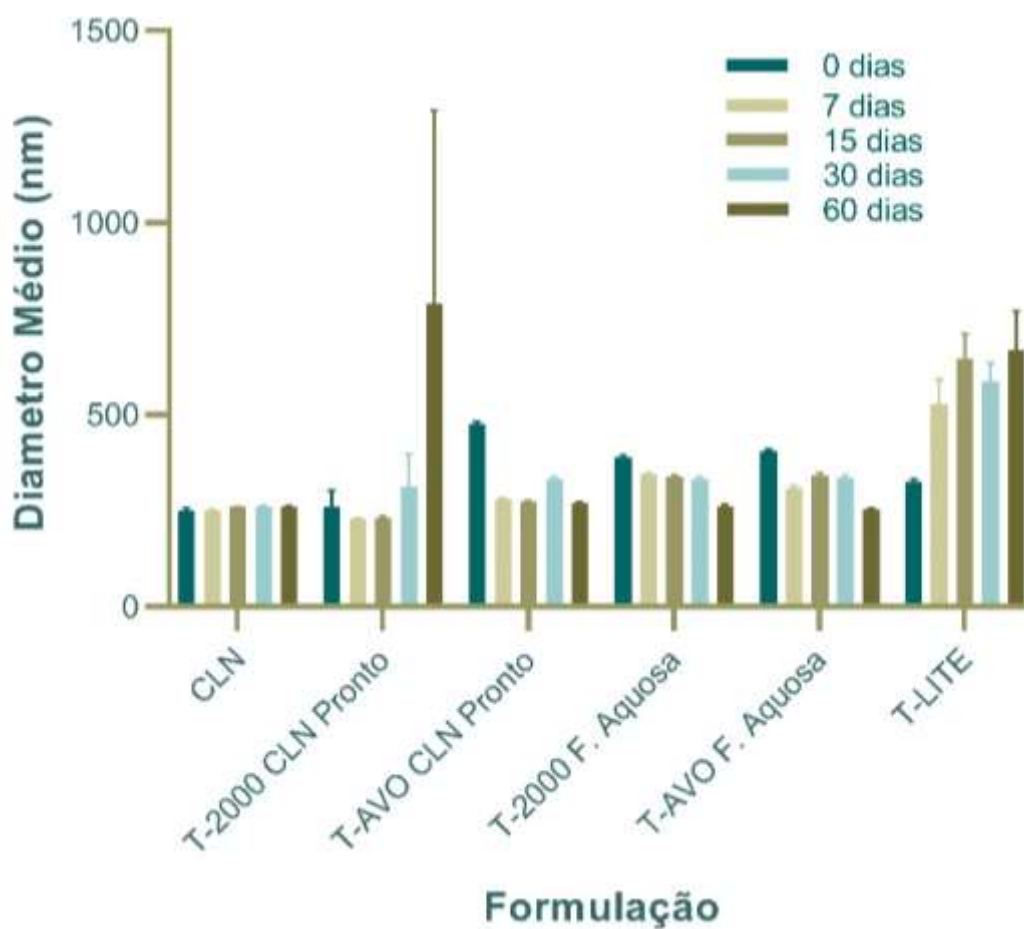
Segundo Kamel e Mostafa, (2015), as divergências observadas no tamanho das partículas, pode ser atribuída à diferença na estrutura química dos ingredientes ativos, os quais podem chegar a formar agregados graças à possível viscosidade dos lipídeos utilizados nos CLN. Desta forma, eles obtiveram nanopartículas de CLN com adição de flavonoide antioxidante rutosídeo, com diâmetros médios entre 200 nm e 400 nm, medidas que se relacionam com este estudo, onde o diâmetro médio das nanopartículas oscilou entre os 253 nm e os 365 nm, a exceção da formulação de T-LITE™.

Ademais, na Figura 7 se pode apreciar que o diâmetro médio das nanopartículas com adição de qualquer tipo de ativo de proteção solar (com base de TiO_2), é distintivamente maior ao da formulação sem adição destes ativos. Abdel-Salam et al. (2017), conseguiu demonstrar que a adição de dióxido de titânio (5%) em formulações de CLNs carregados com valerato de diflucortolona (DFV), fez aumentar significativamente ($p < 0,05$) o tamanho das partículas nas diferentes formulações, o que é devido às possíveis aglomerações de TiO_2 que podem ter sido geradas durante o processamento da formulação e transcurso do tempo de armazenamento. Na Figura 7 se evidencia um aumento considerável no diâmetro médio das nanopartículas da formulação na qual o ativo EUSOLEX® T-2000, foi adicionado na emulsão final de

CLN, o que evidencia uma grande geração de agregados neste produto, quando comparado com os outros, onde os dados de diâmetro são mais estáveis com o decorrer do tempo.

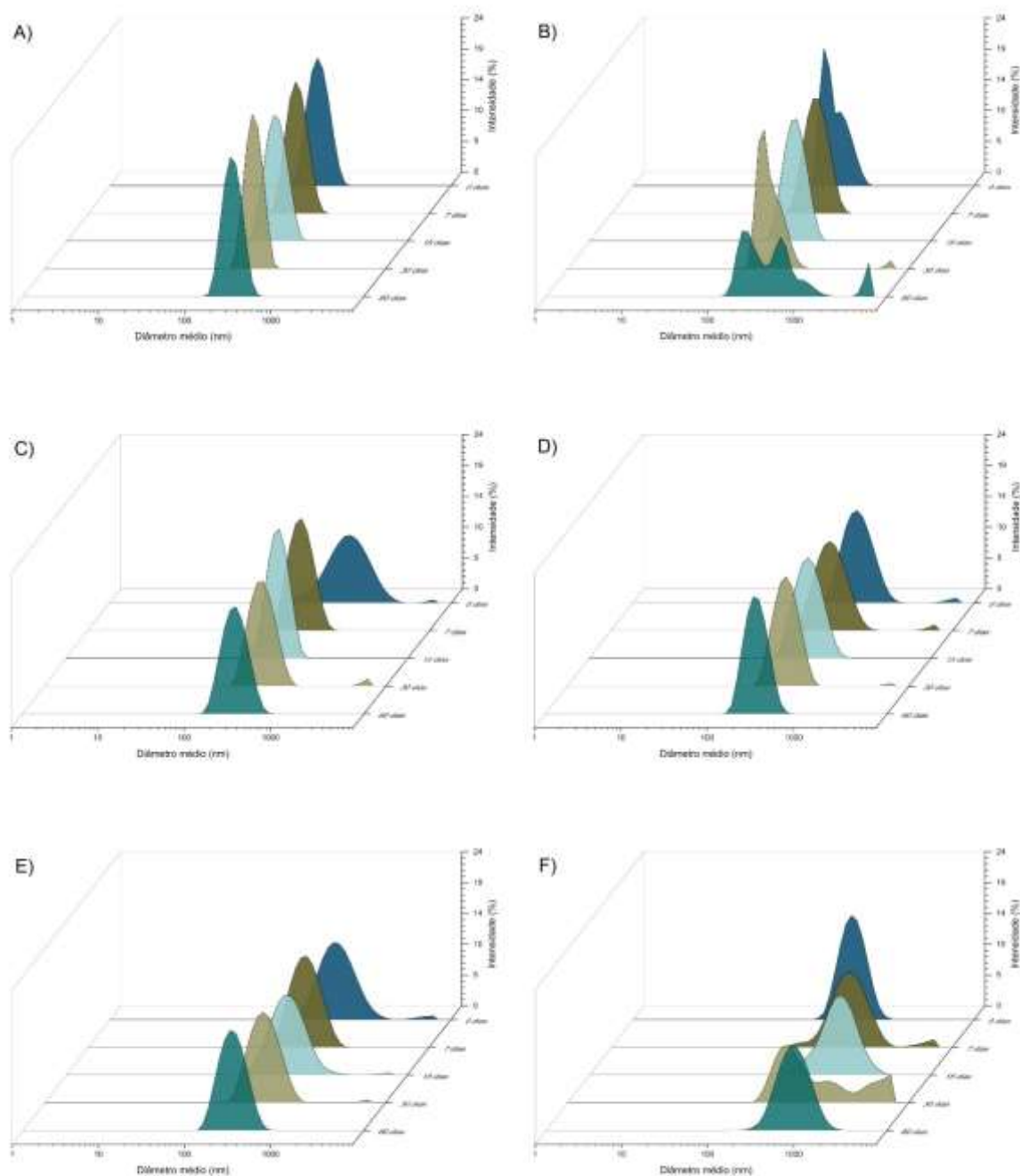
Os dados de diâmetro médio das partículas respeito ao decorrer dos dias em relação à intensidade, são apresentados na Figura 8.

Figura 7. Diâmetro médio (nm) das formulações ao longo do tempo (0, 7, 15, 30 e 60 dias). Os valores foram expressos em média e desvio padrão (n=3) para 6 emulsões de CLN carregados com 5% icaridina (ICA), 2% geraniol (GRL) e diversos tipos de ativo de filtro UV.



Fonte: Autoria própria

Figura 8. Variação da distribuição de diâmetro médio com respeito à intensidade das diferentes formulações com o decorrer dos dias. A) Formulação de CLN sem adição de ativo de proteção solar. B) EUSOLEX® T-2000 adicionado quando o CLN esteve pronto. C) EUSOLEX® T-AVO adicionado quando o CLN esteve pronto. D) EUSOLEX® T-2000 adicionado durante a fase aquosa. E) EUSOLEX® T-AVO adicionado durante a fase aquosa. F) T-LITE™ adicionado durante a fase orgânica.



Fonte: Autoria própria

Tabela 2 - Média dos diâmetros médios (nm) e desvio padrão (n=3). Análise de coeficiente de variação (CV).

Formulação	Média dos diâmetros médios (nm) ± Desvio Padrão					Média ± DP	CV (%)
	0 dias	7 dias	15 dias	30 dias	60 dias		
CLN sem adição de ativo UV	251 ± 6	252 ± 2	259 ± 2	261 ± 2	261 ± 2	257 ± 5	1,9
EUSOLEX T-2000 + CLN Pronto	260 ± 43	229 ± 1	232 ± 4	313 ± 85	788 ± 504	365 ± 239	65,7
EUSOLEX T-AVO + CLN Pronto	476 ± 8	281 ± 2	274 ± 3	334 ± 4	271 ± 3	327 ± 87	26,6
EUSOLEX T-2000 Fase Aquosa	389 ± 6	345 ± 5	338 ± 4	333 ± 6	262 ± 4	334 ± 46	13,7
EUSOLEX T-AVO Fase Aquosa	405 ± 4	308 ± 9	341 ± 8	337 ± 6	253 ± 4	329 ± 55	16,8
T-LITE Fase Orgânica	324 ± 8	527 ± 64	646 ± 65	588 ± 46	668 ± 103	551 ± 138	25,1
Média ± Desvio Padrão (DP)	351 ± 88	324 ± 108	349 ± 152	361 ± 115	417 ± 244		
Coeficiente de Variação (CV) (%)	25,1	33,3	43,7	31,8	58,5		

Fonte: Autoria própria

5.1.1.2 Polidispersão

Os resultados de polidispersão nas nanopartículas das diferentes formulações são apresentados na Tabela 3, na qual pode se observar que o maior dado, corresponde à formulação na qual o ativo EUSOLEX® T-2000 foi adicionado uma vez a emulsão de CLN esteve pronta, com uma média do índice de polidispersão de $0,32 \pm 0,3$. Porém, o menor índice de polidispersão pertence à nanopartícula com adição de ativo EUSOLEX® T-AVO na mesma fase ($0,15 \pm 0,08$). Isto sem levar em consideração a nanopartícula de CLN sem adição de ativo de filtro UV ($0,06 \pm 0,02$).

De acordo ao cálculo de CV nenhuma formulação apresenta fraca dispersão entre os dados e a exceção das formulações nas quais os ingredientes ativos EUSOLEX® foram aderidos durante a fase aquosa, todas indicam uma forte dispersão nos dados de índice de polidispersão ($CV > 30\%$) (MONTGOMERY, 2017).

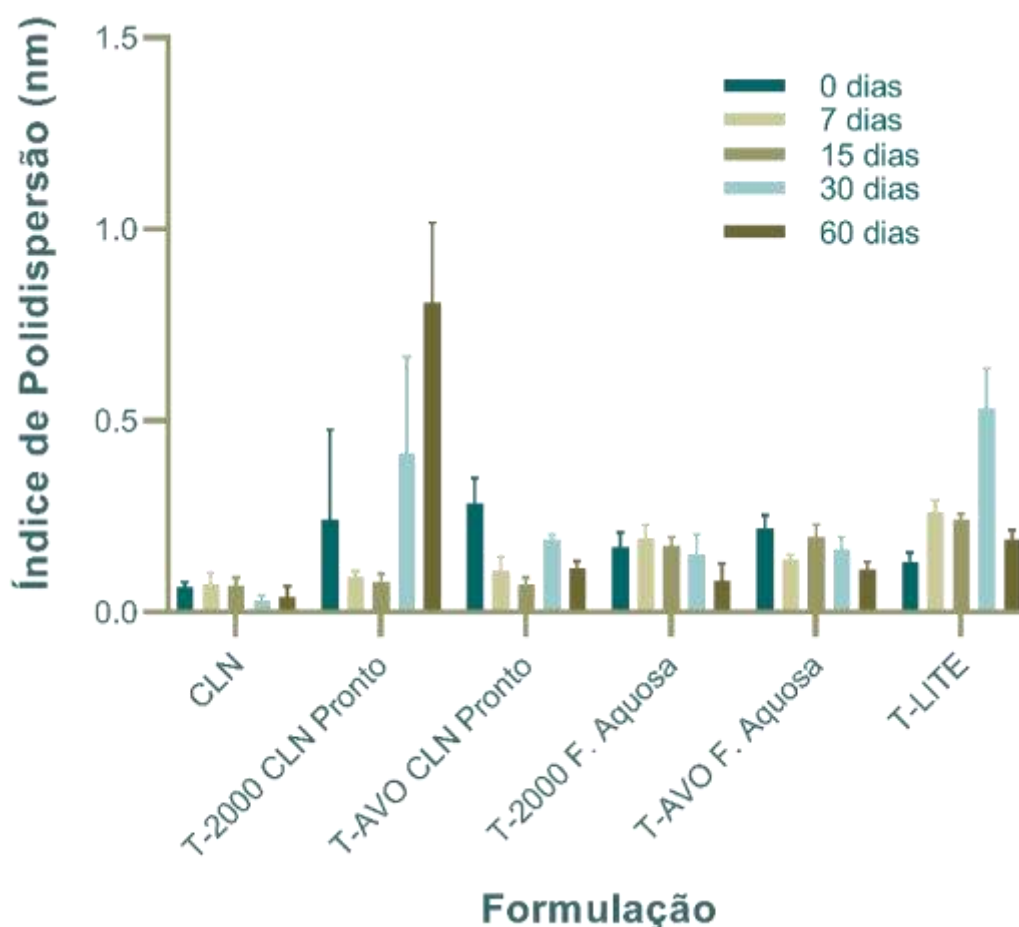
Nas provas estatísticas dos dados de polidispersão das nanopartículas durante o decorrer dos dias, a prova de análise de variância indicou que não há diferenças significativas. Sendo que, os dados não seguiam uma distribuição normal, foi aplicada a prova de Kruskal-Wallis onde se confirmou que não existe diferença significativa entre as medianas de cada grupo com um nível de 95% de confiança.

Conforme Souza et al. (2012), variações nos valores de PDI em função do tempo indicam formação de populações de partículas com diâmetros que não existiam inicialmente, podendo ser decorrente de agregação, quebra ou degradação de partículas. Como no presente estudo não se apresentam diferenças significativas na média dos índices de polidispersão, podemos afirmar que em geral o tempo não foi um fator que influenciou na formação de agregados nas formulações avaliadas.

No entanto, quando as análises estatísticas se efetuaram para comparar o índice de polidispersão entre os diversos tipos de formulações, a prova ANOVA apontou que existem diferenças significativas entre os dados. A causa de que os dados seguiam uma distribuição normal, foi aplicada a prova de Fisher, onde se confirmou que existem diferenças significativas entre as medias de cada grupo com um nível de 95% de confiança.

No estudo efetuado por Abdel-Salam et al. (2017), as formulações de CLN sem TiO_2 mostraram um valor estreito de PDI, no entanto, as nanopartículas com adição de TiO_2 mostraram valores de PDI mais amplos, devido à agregação de partículas deste último composto. Fato que pode ser evidenciado na Figura 9, onde a formulação de CLN sem agregação de ingrediente de proteção solar, tem menores índices de polidispersão em comparação ao resto de nanopartículas que têm TiO_2 nas suas composições.

Figura 9. Índice de polidispersão das formulações ao longo do tempo (0, 7, 15, 30 e 60 dias). Os valores foram expressos em média e desvio padrão (n=3) para 6 emulsões de CLN carregados com 5% icaridina (ICA), 2% geraniol (GRL) e diversos tipos de ativo de filtro UV.



Fonte: Autoria própria

Vale a pena mencionar que, tal e como afirma Moraes (2009), valores altos de índice de polidispersão indicam heterogeneidade do diâmetro das partículas em suspensão. Pelo qual, sem levar em conta a formulação sem filtro UV, de acordo ao Índice de Polidispersão, as formulações elaboradas com o ativo EUSOLEX® T-AVO, apresentaram dados que indicam uma estreita faixa de diâmetros ($PDI < 0,2$), o qual, demonstra a criação de sistemas monodispersos por parte deste produto, é dizer, com homogeneidade na distribuição dos tamanhos das nanopartículas (NEMEN; LEMOS-SENNA, 2011). Neste caso, também é válido resgatar a formulação de EUSOLEX® T-2000 ($PDI 0,15 \pm 0,04$) adicionado durante a fase aquosa, embora que quando foi subministrado à emulsão final de CLN, tenha gerado o sistema mais heterogêneo das partículas analisadas ($PDI 0,33 \pm 0,3$).

Tabela 3 - Média dos índices de polidispersão e desvio padrão (n=3). Análise de coeficiente de variação (CV).

Formulação	Média do índice de polidispersão (nm) ± Desvio Padrão					Média ± DP	CV (%)
	0 dias	7 dias	15 dias	30 dias	60 dias		
CLN sem adição de ativo UV	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,03	0,07 ± 0,02	0,03 ± 0,02	0,04 ± 0,03	0,06 ± 0,02	35,8
EUSOLEX T-2000 + CLN Pronto	0,24 ± 0,24	0,09 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,41 ± 0,25	0,81 ± 0,21	0,33 ± 0,3	92,3
EUSOLEX T-AVO + CLN Pronto	0,28 ± 0,07	0,11 ± 0,04	0,07 ± 0,02	0,19 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,15 ± 0,08	54,7
EUSOLEX T-2000 Fase Aquosa	0,17 ± 0,04	0,19 ± 0,04	0,17 ± 0,02	0,15 ± 0,05	0,08 ± 0,05	0,15 ± 0,04	27,8
EUSOLEX T-AVO Fase Aquosa	0,22 ± 0,04	0,14 ± 0,01	0,2 ± 0,03	0,16 ± 0,03	0,11 ± 0,02	0,17 ± 0,04	26,1
T-LITE Fase Orgânica	0,13 ± 0,03	0,26 ± 0,03	0,24 ± 0,01	0,53 ± 0,1	0,19 ± 0,02	0,27 ± 0,15	56,8
Média ± Desvio Padrão (DP)	0,19 ± 0,08	0,14 ± 0,07	0,14 ± 0,08	0,25 ± 0,19	0,22 ± 0,29		
Coeficiente de Variação (CV) (%)	42,8	49,5	53,7	76,1	129,4		

Fonte: Autoria própria

5.1.1.3 Potencial Zeta

De acordo à Tabela 4, os dados coletados para Potencial Zeta (PZ) das formulações sendo estudadas na presente pesquisa, mostraram que as partículas dos compostos conformados com o produto EUSOLEX® T-AVO, apresentaram os maiores níveis de potencial zeta em mV ($-23,9 \pm 3,7$ mV quando acrescentado no CLN Pronto e $-23,2 \pm 3,8$ mV quando adicionado durante a fase aquosa). No entanto, a partícula formulada com T-LITE™ representa o menor PZ ($-5 \pm 3,5$ mV), inclusive menor ao do CLN puro ($-14,6 \pm 4,6$ mV).

Vale resgatar que as nanopartículas com T-LITE™, além de apresentar o menor valor na média de potencial zeta, representaram também o maior CV (69,28%), insinuando uma alta dispersão nos dados obtidos para esta formulação. Nenhuma formulação obteve um $CV \leq 15\%$, por isto, pode se deduzir que os dados coletados para potencial zeta em todas as nanopartículas, têm moderada ou alta dispersão entre eles (MONTGOMERY, 2017).

Quando se aplicaram as provas estatísticas dos dados coletados de potencial zeta das nanopartículas durante o avanço dos dias, a prova de Análise de Variância assinalou que não existem diferenças significativas. Assim, devido a que os dados seguiam uma distribuição normal, se decidiu aplicar a prova de Fisher onde se confirmou que não existe diferença significativa entre as medias de cada grupo com um nível de 95% de confiança.

O anteriormente mencionado quer dizer que não existiu uma mudança significativa nos dados médios de potencial zeta das amostras após dois meses com respeito à medição feita no dia 0. Isto também foi evidenciado por Song et al. (2016), que concluiu que os dados de potencial zeta de CLN carregadas com furbiprofeno após de 90 dias sendo armazenados a temperatura ambiente (25°C), não tiveram diferenças significativas neste parâmetro com respeito ao dia no qual foram formuladas.

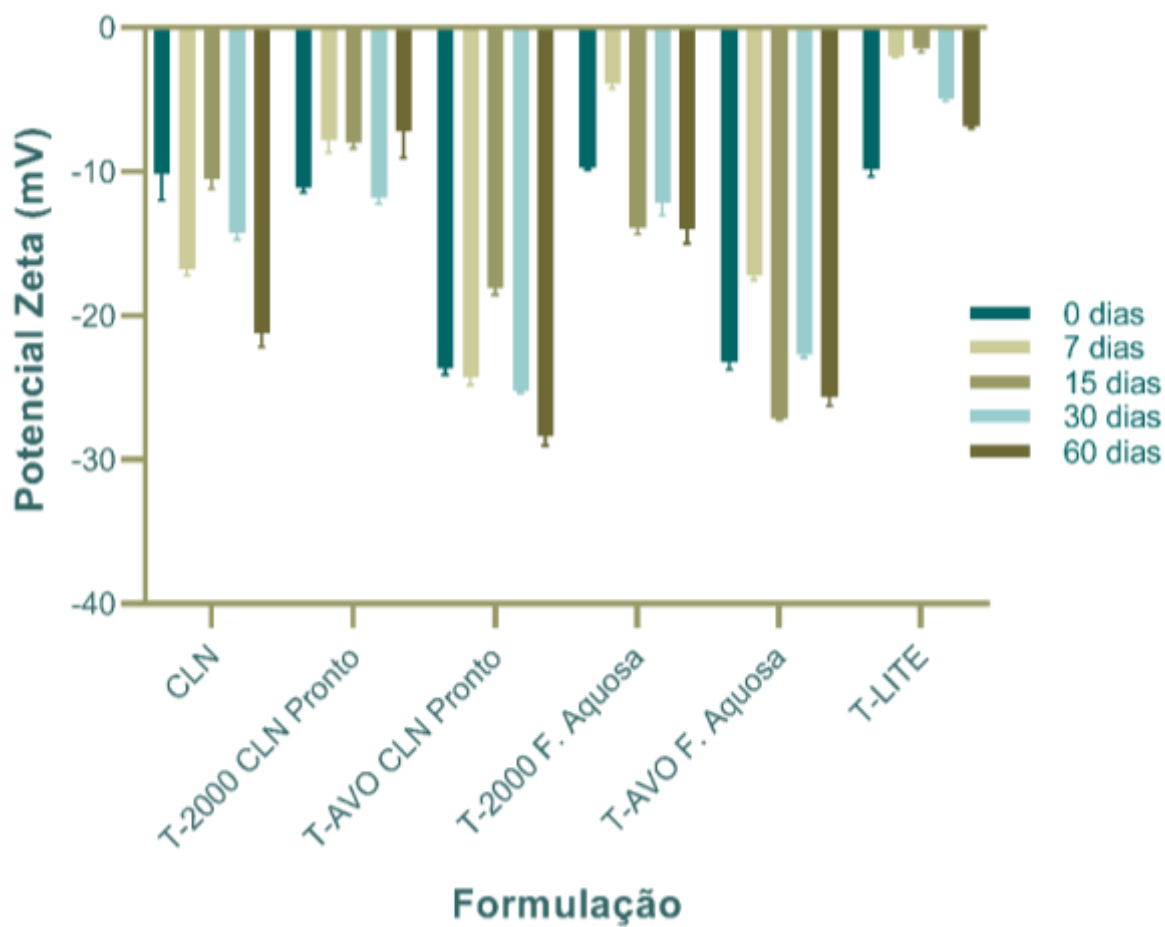
Por outro lado, as análises estatísticas efetuadas comparando o potencial zeta entre os diversos tipos de formulações, a prova ANOVA indicou que existem diferenças significativas. A causa de que os dados seguiam uma distribuição normal, foi aplicada a prova de Fisher, onde se confirmou que sim existe diferença significativa entre as medias de cada grupo com um nível de 95% de confiança.

A diferença entre os dados médios de potencial zeta para cada formulação, evidenciados na Figura 10, tal e como manifestam Görner et al. (1999), pode variar devido à concentração do ativo, em este caso, a formulação com T-LITE™, tem valores mais próximos ao zero já que a concentração do produto era de 8% com respeito aos outros compostos, onde a concentração era de 5%. Vale a pena destacar que o perfil de valores negativos para PZ é devido ao tipo de tensoativo utilizado, neste caso o polivinil álcool – PVA, que é um polímero com propriedades tensoativas. Neste caso o mecanismo de estabilização ocorre através de impedimento estérico e não por eletrostática, portanto, é comum os valores de PZ apresentarem-se numa faixa negativa (RAWAT et al., 2015).

Cabe resgatar que o potencial zeta reflete a carga na superfície das nanopartículas, parâmetro que pode ser influenciado pela composição da formulação e o meio dispersante (SCHAFFAZICK et al., 2003). Isto pode ter influenciado na diferença de dados obtidos para este parâmetro, posto que cada molécula de proteção solar tem uma composição diferente apesar de compartilhar o mesmo ativo base (TiO₂).

Nafee, Makled e Boraie (2018), encontraram que em CLNs formulados com polímero com propriedades tensoativos PVA, os valores de Potencial Zeta oscilavam entre $-12 \pm 1,8$ mV e $-27,7 \pm 1$ mV e determinaram que um potencial zeta mais negativo neste tipo de nanopartículas (aproximadamente -20 mV), pode ser indício da obtenção de sistemas coloidais mais estáveis. No presente estudo, as nanopartículas das emulsões com adição de EUSOLEX® T-AVO apresentaram potenciais zeta de $-23,2 \pm 3,8$ mV para quando adicionado na fase aquosa, e de $-23,9 \pm 3,7$ mV para quando misturado com a emulsão de CLN pronta. Por isto, levando em conta o anteriormente mencionado, vale a pena ressaltar a possível maior estabilidade destas duas formulações.

Figura 10. Potencial zeta (mV) das formulações ao longo do tempo (0, 7, 15, 30 e 60 dias). Os valores foram expressos em média e desvio padrão (n=3) para 6 emulsões de CLN carregados com 5% icaridina (ICA), 2% geraniol (GRL) e diversos tipos de ativo de filtro UV.



Fonte: Autoria própria

Tabela 4 - Média do Potencial Zeta (mV) e desvio padrão (n=3). Análise de coeficiente de variação (CV).

Formulação	Potencial zeta (mV) $\pm$ DP					Média $\pm$ DP	Coeficiente de Variação (%)
	0 dias	7 dias	15 dias	30 dias	60 dias		
CLN sem adição de ativo de filtro solar	-10,2 $\pm$ 1,8	-16,8 $\pm$ 7,8	-10,5 $\pm$ 0,7	-14,3 $\pm$ 0,4	-21,2 $\pm$ 1	-14,6 $\pm$ 4,6	31,5
EUSOLEX T-2000 + CLN Pronto	-11,1 $\pm$ 0,4	-7,8 $\pm$ 0,9	-8 $\pm$ 0,4	-11,8 $\pm$ 0,4	-7,2 $\pm$ 1,8	-9,1 $\pm$ 2,1	22,9
EUSOLEX T-AVO + CLN Pronto	-23,7 $\pm$ 0,4	-24,3 $\pm$ 0,5	-18,1 $\pm$ 0,5	-25,2 $\pm$ 0,2	-28,4 $\pm$ 0,6	-23,9 $\pm$ 3,7	15,6
EUSOLEX T-2000 adicionado durante a Fase Aquosa	-9,7 $\pm$ 0,1	-3,9 $\pm$ 0,3	-13,9 $\pm$ 0,4	-12,2 $\pm$ 0,8	-14 $\pm$ 1	-10,8 $\pm$ 4,2	39,1
EUSOLEX T-AVO adicionado durante a Fase Aquosa	-23,2 $\pm$ 0,6	-17,2 $\pm$ 0,3	-27,1 $\pm$ 0,2	-22,7 $\pm$ 0,2	-25,6 $\pm$ 0,7	-23,1 $\pm$ 3,8	16,3
T-LITE adicionado durante a Fase Orgânica	-9,9 $\pm$ 0,5	-2 $\pm$ 0,1	-1,5 $\pm$ 0,2	-5 $\pm$ 0,1	-6,8 $\pm$ 0,2	-5,0 $\pm$ 3,5	69,3
Média $\pm$ Desvio Padrão (DP)	-14,6 $\pm$ 6,9	-12 $\pm$ 8,8	-13,2 $\pm$ 8,9	-15,2 $\pm$ 7,5	-17,2 $\pm$ 9,3		
Coeficiente de Variação (%)	46,8	73,1	66,9	49,5	53,9		

Fonte: Autoria própria

5.1.1.4 Rastreamento de partículas por NTA

O diâmetro médio das partículas também foi submetido a Análise de Rastreamento de Nanopartículas ou NTA pelas suas siglas em inglês. Os resultados deste método são apresentados na Figura 11 e na Tabela 5, na qual pode se observar que o maior dado, corresponde à formulação na qual o ativo EUSOLEX® T-AVO foi adicionado durante a fase aquosa, com uma média no diâmetro médio de 229 ± 10 nm. Por outra parte, a nanopartícula com adição de ativo EUSOLEX® T-2000 quando a CLN esteve pronta, obteve o menor diâmetro médio (195 ± 4).

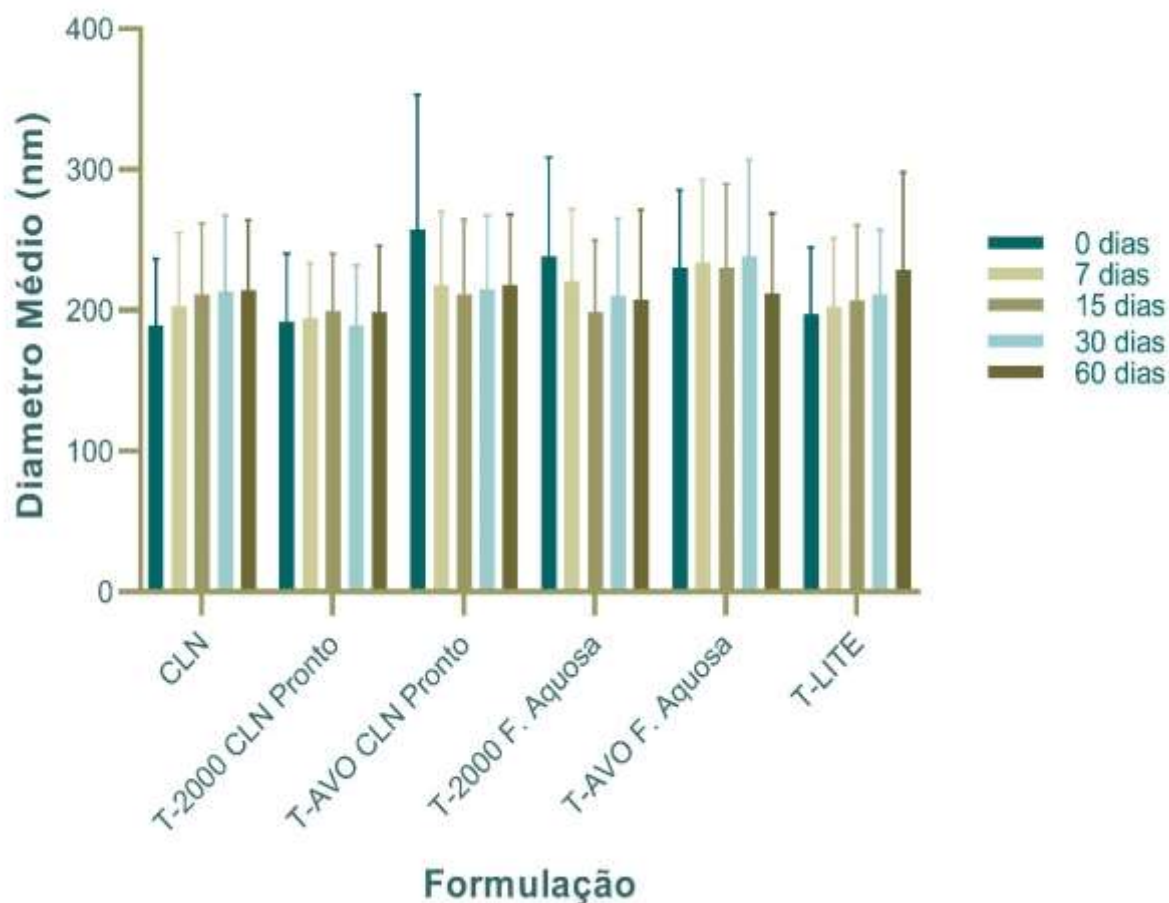
De acordo ao cálculo de CV, todas as formulações apresentaram uma fraca dispersão entre os dados ($CV < 15\%$), o que ao mesmo tempo representa uma alta homogeneidade dos valores dentro desta variável (MONTGOMERY, 2017).

Conforme às provas estatísticas dos dados de diâmetro médio das nanopartículas durante o decorrer dos dias, a prova ANOVA evidenciou que não existem diferenças significativas ($p > 0,05$). Sendo que, os dados não seguiam uma distribuição normal, foi aplicada a prova de Kruskal-Wallis onde se confirmou que não existe diferença significativa entre as medianas de cada grupo com um nível de 95% de confiança.

Estes resultados são semelhantes aos obtidos por DLS, onde também não foram evidenciadas diferenças significativas. Da mesma forma, Cola e colaboradores (2016), demonstraram que CLNs de partículas de ivermectina e metopreno, destinados a combater e controlar efeitos de endo e ectoparasitas em animais, mantinham os valores de diâmetro médio obtidos por NTA constantes por um período de 120 dias.

No entanto, quando as análises estatísticas se efetuaram para comparar o diâmetro médio entre os diversos tipos de formulações, a prova ANOVA mostrou que há diferenças significativas entre os dados ($p < 0,05$). A causa de que os dados não seguiam uma distribuição normal, foi aplicada a prova de Kruskal-Wallis, onde se confirmou que existem diferenças significativas entre as medianas de cada grupo com um nível de 95% de confiança. Resultados que coincidem com os obtidos por espalhamento dinâmico de luz na subseção 5.1.1.

Figura 11. Dados de diâmetro médio (nm) das formulações ao longo do tempo (0, 7, 15, 30 e 60 dias) obtidos por DLS. Os valores foram expressos em média e desvio padrão (n=3) para 6 emulsões de CLN carregados com 5% icaridina (ICA), 2% geraniol (GRL) e diversos tipos de ativo de filtro UV.



Fonte: Autoria própria

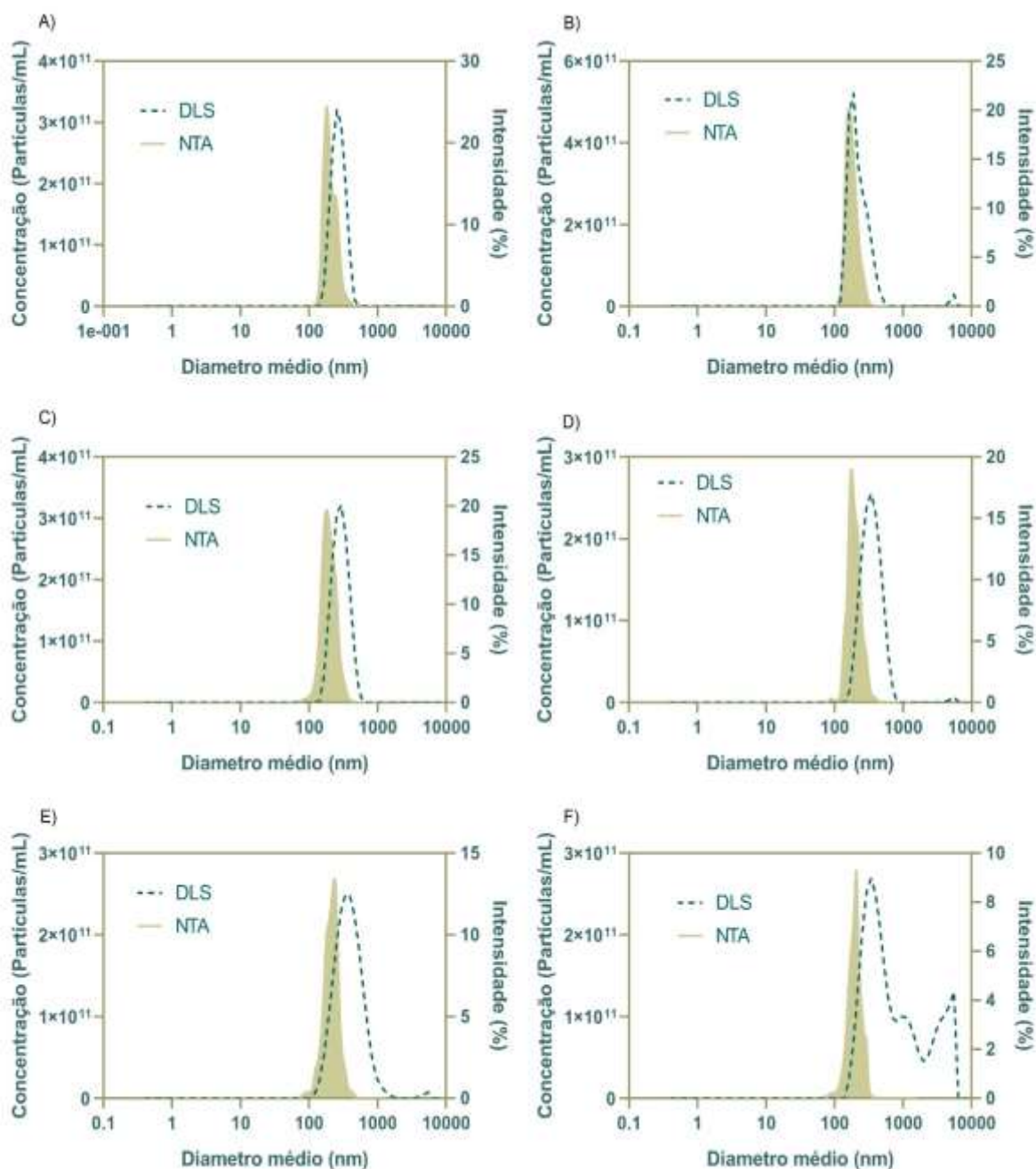
Por outra parte, também foi avaliada a distribuição de tamanho tanto em relação a concentração de nanopartículas (partículas/mL) através do NTA quanto a intensidade (%) por DLS. O rastreamento das partículas das diferentes formulações é apresentado na Figura 12. No geral, as distribuições do diâmetro médio de todas as formulações, apresentaram tendências similares, a exceção da conformada por T-LITE™, a qual evidenciou uma maior dispersão nos dados (Figura 12F).

Tabela 5 - Diâmetro médio e desvio padrão (n=3) obtidos por NTA. Análise de coeficiente de variação (CV).

Formulação	Diâmetro médio (nm) $\pm$ DP					Média $\pm$ DP	Coeficiente de Variação (%)
	0 dias	7 dias	15 dias	30 dias	60 dias		
CLN sem adição de ativo de filtro solar	190 $\pm$ 47	203 $\pm$ 52	212 $\pm$ 50	213 $\pm$ 55	214 $\pm$ 50	206 $\pm$ 10	5
EUSOLEX T-2000 + CLN Pronto	192 $\pm$ 48	194 $\pm$ 40	199 $\pm$ 41	189 $\pm$ 43	198 $\pm$ 47	195 $\pm$ 4	2,2
EUSOLEX T-AVO + CLN Pronto	258 $\pm$ 96	218 $\pm$ 52	211 $\pm$ 54	215 $\pm$ 52	218 $\pm$ 50	224 $\pm$ 19	8,5
EUSOLEX T-2000 adicionado durante a Fase Aquosa	239 $\pm$ 70	221 $\pm$ 51	199 $\pm$ 51	210 $\pm$ 55	208 $\pm$ 64	215 $\pm$ 15	7
EUSOLEX T-AVO adicionado durante a Fase Aquosa	231 $\pm$ 55	234 $\pm$ 59	231 $\pm$ 59	238 $\pm$ 69	212 $\pm$ 57	229 $\pm$ 10	4,4
T-LITE adicionado durante a Fase Orgânica	197 $\pm$ 47	202 $\pm$ 49	207 $\pm$ 54	211 $\pm$ 46	229 $\pm$ 70	209 $\pm$ 12	5,8
Média $\pm$ Desvio Padrão (DP)	218 $\pm$ 29	212 $\pm$ 15	210 $\pm$ 12	213 $\pm$ 16	213 $\pm$ 10		
Coeficiente de Variação (%)	13,1	7	5,6	7,3	4,8		

Fonte: Autoria própria

Figura 12. Distribuição do diâmetro médio das nanopartículas das formulações de CLN com e sem adição de ativo de protetor solar, em relação a concentração (NTA) e a intensidade (DLS). Os valores correspondem a média (n=3). A) Formulação de CLN sem adição de ativo de proteção solar. B) EUSOLEX® T-2000 adicionado quando o CLN esteve pronto. C) EUSOLEX® T-AVO adicionado quando o CLN esteve pronto. D) EUSOLEX® T-2000 adicionado durante a fase aquosa. E) EUSOLEX® T-AVO adicionado durante a fase aquosa. F) T-LITE™ adicionado durante a fase orgânica.



Fonte: Autoria própria

5.1.2 Escolha de formulação mais estável

De acordo à bibliografia, nanopartículas com valores de diâmetro médio sem variações no decorrer do tempo, é dizer sem formação de agregados (KAMEL; MOSTAFA, 2015); índices de polidispersão menores a 0,2 (MORAES, 2009); e, valores de potencial zeta de aproximadamente -20 mV (NAFEE; MAKLED; BORAIE, 2018); representam sistemas monodispersos, mais homogêneos e com maior estabilidade, o que de acordo a Tefas et al. (2015), se reflete em proteção dos ativos encapsulados, baixa degradação enzimática das partículas, aumento no tempo de funcionalidade do ativo, entre outras características que são desejadas dentro destes sistemas.

Tendo em consideração o anterior e devido aos resultados obtidos nos procedimentos do item 5.1.1, as emulsões formuladas com o ativo de proteção solar EUSOLEX® T-AVO, foram escolhidas como os sistemas mais promissores para a obtenção de uma formulação final de dupla funcionalidade com alta estabilidade. É por isto que unicamente as formulações com este ativo, foram alvo de estudo nas seguintes etapas desta pesquisa.

5.1.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Os resultados de DSC são apresentados na Figura 13, onde se representa o fluxo de calor (W/g) em função da temperatura (°C). Foram analisadas amostras de tripalmitina a granel (Fig.8-A), do ativo de proteção solar (EUSOLEX T-AVO) (Fig.8-B), da CLN sem presença do ativo UV (Fig.8-C) e das CLN contendo o ativo de proteção solar, adicionado após a formulação final e adicionado na fase aquosa, respectivamente (Fig.8-D e Fig.8-E).

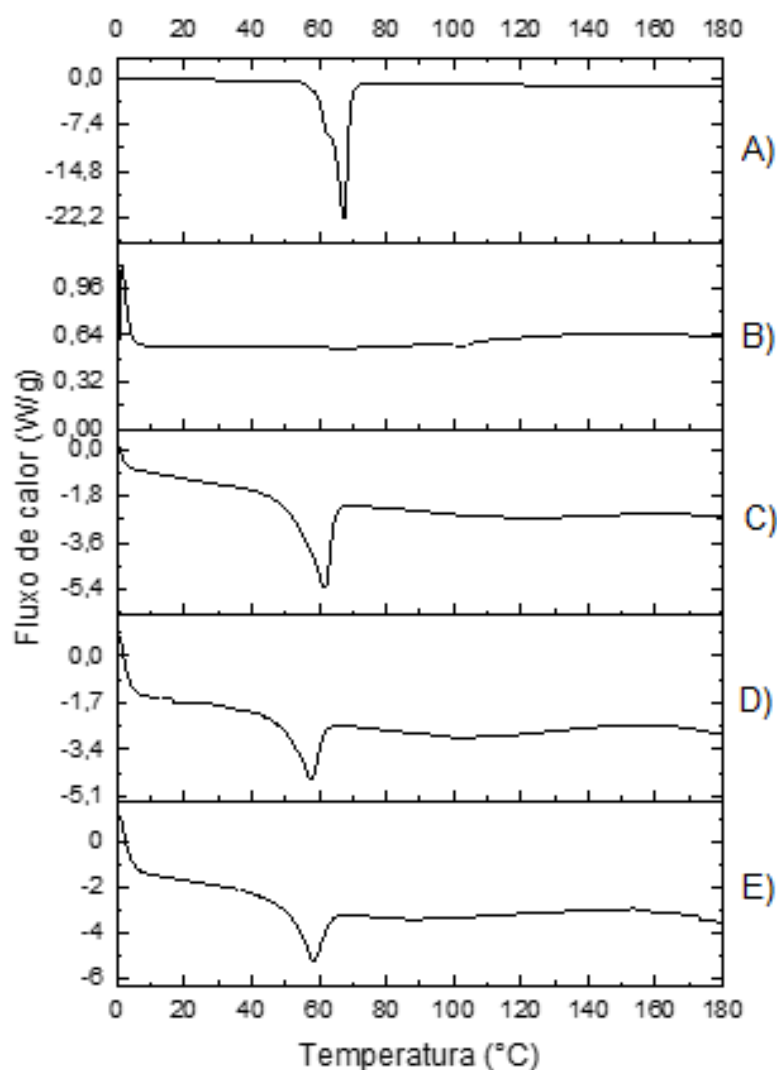
Na Figura 13-A, pode se observar um pico endotérmico em 68 °C, que segundo Awad e colaboradores (2009), corresponde ao ponto de fusão da forma β da tripalmitina. Este pico pode ser observado nas Figuras 13-C, D e E com uma baixa deslocação com respeito à tripalmitina a granel, apresentando para a formulação de CLN um valor de 61 °C, e para as formulações contendo a presença do ativo de proteção solar, valores de 59 °C.

A diminuição no ponto de fusão pode ser atribuída ao efeito Kelvin, que afirma que a presença de tensoativos, diminui a tensão interfacial e a energia livre superficial entre as moléculas dos lipídeos sólidos e a solução do tensoativo, o que leva ao

aumento da área de superfície específica e à redução do tamanho da partícula, o que consequentemente minimiza a quantidade de energia requerida para o rompimento, decomposição da matriz lipídica cristalina. Cabe mencionar que alterações no ponto de fusão, são correlacionadas com mudanças na estrutura da ordem cristalina dos lipídeos sólidos, o que pode ser atribuído ao encapsulamento dos ativos dentro das CLN (ALI et al., 2010).

É de destacar que segundo Ali e colaboradores (2010), os lipídeos são considerados como bons candidatos para formulação de CLN, ao apresentar pontos de fusão superiores a 37 °C, isto devido a que esta propriedade é considerada como essencial para manter a integridade dos ativos durante o armazenamento ou enquanto se efetua a ação da formulação no organismo.

Figura 13. Termogramas de Calorimetria Diferencial Exploratória para: A) Tripalmitina; B) EUSOLEX T-AVO; C) CLN sem ativo de proteção solar; D) CLN com adição de EUSOLEX T-AVO na emulsão final; E) CLN com adição de EUSOLEX T-AVO durante a fase aquosa.

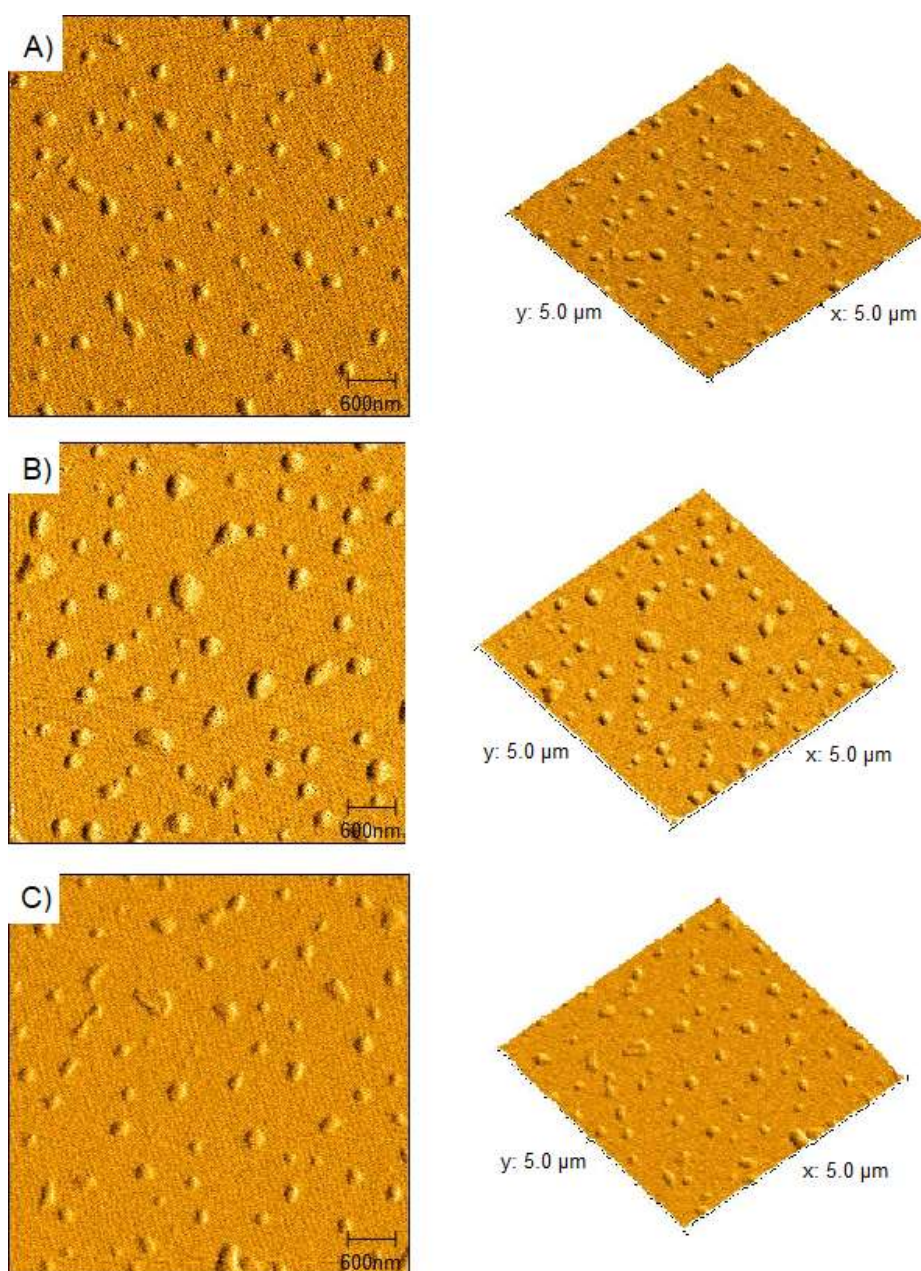


Fonte: Autoria própria

5.1.4 Microscopia de força atômica (MFA)

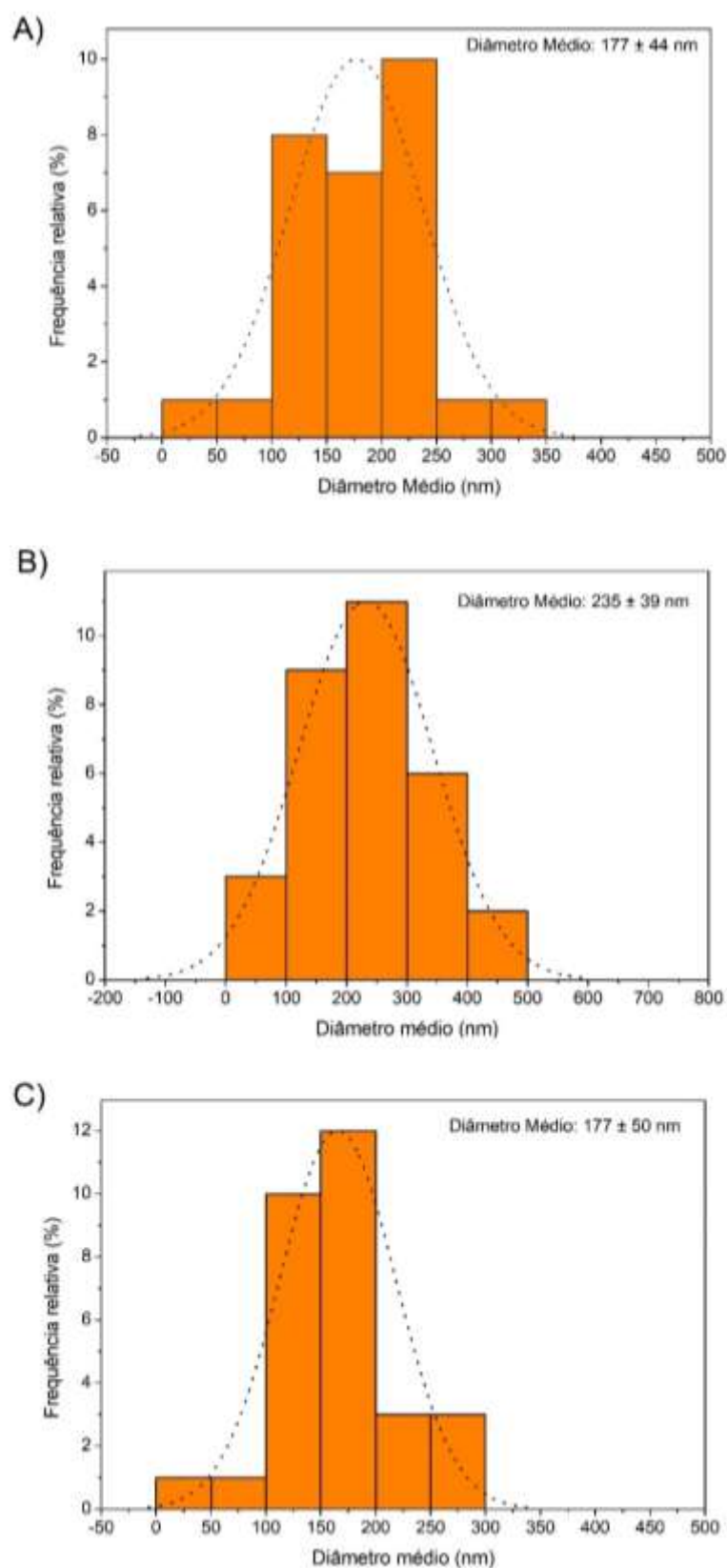
As imagens coletadas para reconhecimento morfológico e das nanocápsulas das CLNs com e sem adição do ativo EUSLEX® T-AVO, nas duas diferentes fases, bem como para a avaliação da distribuição de tamanho dessas partículas, são apresentadas nas Figuras 14 e 15.

Figura 14. Imagens de microscopia de força atômica das nanopartículas de CLNs: A) CLN; B) CLN com adição de EUSOLEX® T-AVO no final da emulsão; C) CLN com adição de EUSOLEX® T-AVO durante a fase aquosa.



Fonte: Autoria própria

Figura 15. Distribuição de tamanho das nanopartículas por MFA: A) CLN; B) CLN com adição de EUSOLEX® T-AVO no final da emulsão; C) CLN com adição de EUSOLEX® T-AVO durante a fase aquosa.



Fonte: Autoria própria

A análise dos resultados das imagens de MFA mostraram que todas as formulações apresentaram partículas com morfologia esférica. As nanopartículas de CLN sem ativo de proteção solar, e das CLN contendo EUSOLEX® T-AVO adicionado durante a fase aquosa, apresentam distribuição de tamanho uniforme, com diâmetro médio de aproximadamente 177 nm. Quando o ativo de proteção solar (EUSOLEX® T-AVO) foi adicionado na emulsão final da CLN, podemos observar um aumento no tamanho médio das partículas, atingindo valores de 235 nm, possivelmente devido à formação de agregados.

Smijs e Pavel (2011), encontraram que nanopartículas TiO_2 com e sem recobrimento, apresentavam formato de disco com um diâmetro médio de 100 nm. Por outra parte, Prado e colaboradores (2020), estudaram formulações de CLNs com adição de ativo de proteção solar (p-metoxicinamato de octilo), onde encontraram que as nanopartículas de uma primeira formulação, apresentaram uma morfologia esférica, com um diâmetro médio de 200 nm e sem formação de agregados. Porém, em uma segunda formulação, com os mesmos ativos e diferente forma de preparo respeito à primeira, os diâmetros das nanocápsulas oscilaram entre 300 a 500 nm, o que foi atribuído à formação de agregados, o que se reflete em estruturas mais amorfas e menos estáveis.

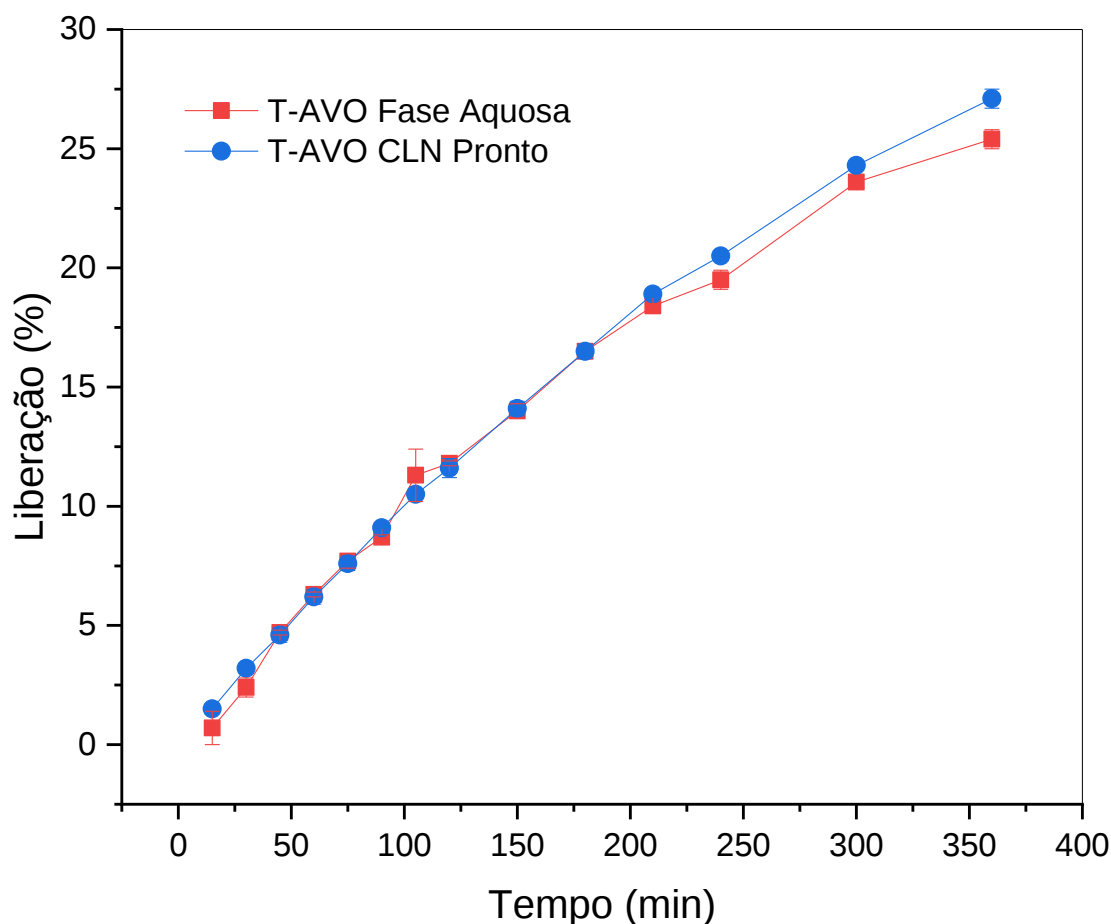
5.2 Ensaio de liberação

As porcentagens de liberação de icaridina (ICA) para cada formulação contendo EUSOLEX® T-AVO nos diferentes tempos, podem se evidenciar na Figura 16. É possível apreciar que as duas formulações seguem a mesma tendência de liberação do ativo, obtendo valores médios de porcentagem de liberação aproximados entre eles. Sendo em média de $12,2 \pm 0,3\%$, e um valor máximo de $25,4\% \pm 0,4\%$ em 6 horas, para quando o ativo de proteção solar foi adicionado durante a fase aquosa (AVO F Aq); e, média de $12,5 \pm 0,2\%$, com máximo de $27,1 \pm 0,4\%$ no mesmo tempo, para quando adicionado no final da preparação do CLN.

Os índices de liberação de ativo foram similares em um estudo *in vitro*, feito por GU e CHEN, (2009), em célula de difusão tipo Franz com membrana de acetato de celulose, onde perceberam que CLN carregados com asiaticoside para o tratamento de esclerodermia, conseguiram porcentagens de liberação do ativo de

aproximadamente 20% nas primeiras horas, formando uma tendência contínua de liberação com esta porcentagem em até 48 horas.

Figura 16. Ensaio de liberação de icaridina nos carreadores lipídicos nanoestruturados contendo EUSOLEX® T-AVO em formulação líquida ao longo de 6 horas. Sendo: AVO F Aq, quando adicionado durante a fase aquosa e AVO NP, quando adicionado na emulsão final de CLN. Os valores representam a média e desvio padrão (n=3).



Fonte: Autoria própria

5.3 Eficiência de proteção solar

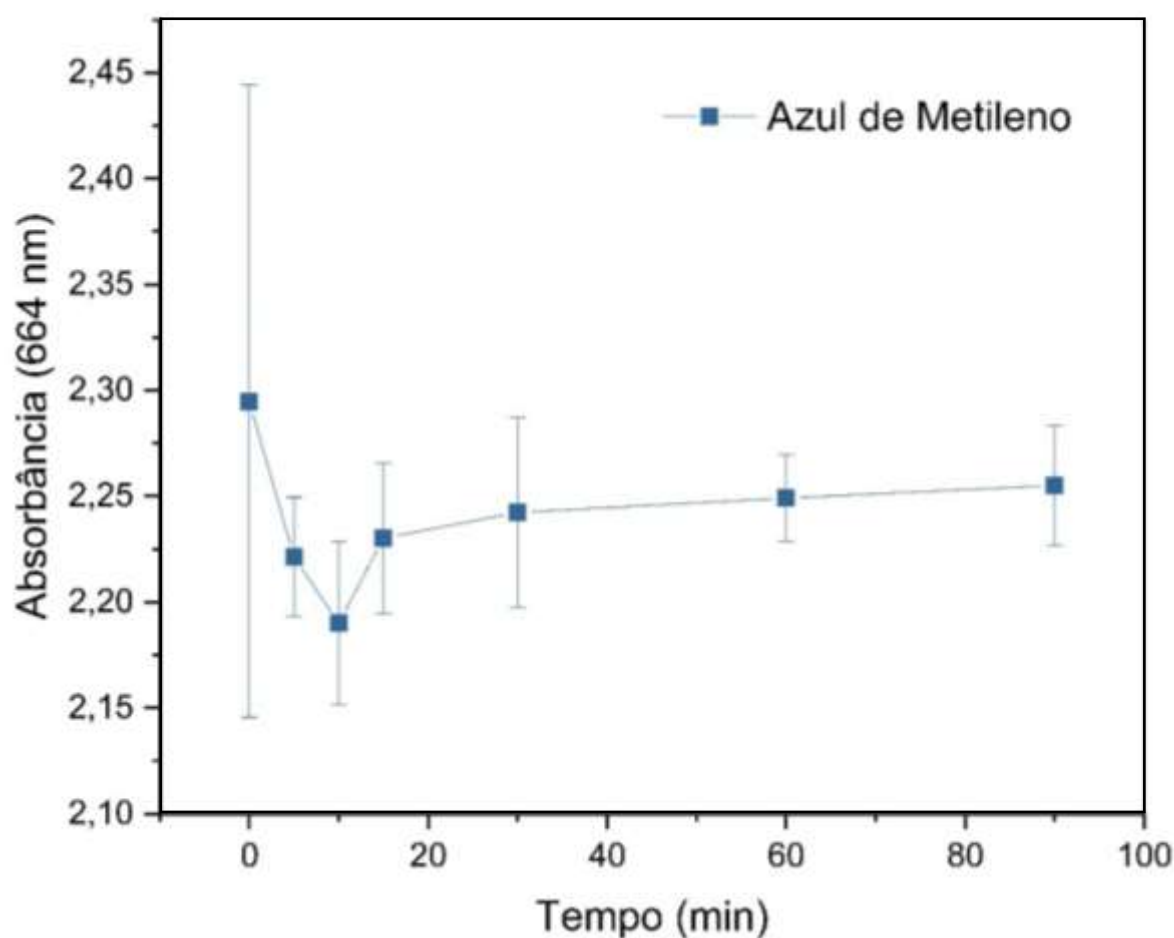
5.3.1 Degradação de Azul de Metileno

Inicialmente, os ensaios de degradação foram feitos unicamente submetendo a solução de azul de metileno (20 mg/L), sem adição de nenhum outro composto, isto com o fim de reconhecer o comportamento deste reagente frente à radiação UV e da mesma forma, com o fim de ser considerado como um controle frente aos testes feitos com a adição das formulações.

Os resultados médios dos ensaios feitos em base à metodologia de Frizzo et al., (2016), representados na Figura 17, não exibiram uma conduta de degradação desejada ao apresentarem oscilações nos níveis de absorbância no decorrer do tempo, e não uma tendência logarítmica decrescente, tal e como Priya e colaboradores, (2020) justificam que deve se esperar na degradação do azul de metileno (MB) com respeito ao tempo pela incidência da radiação ultravioleta, concluindo que os ativos UV conseguem dispersar e refletir a radiação UV incidente.

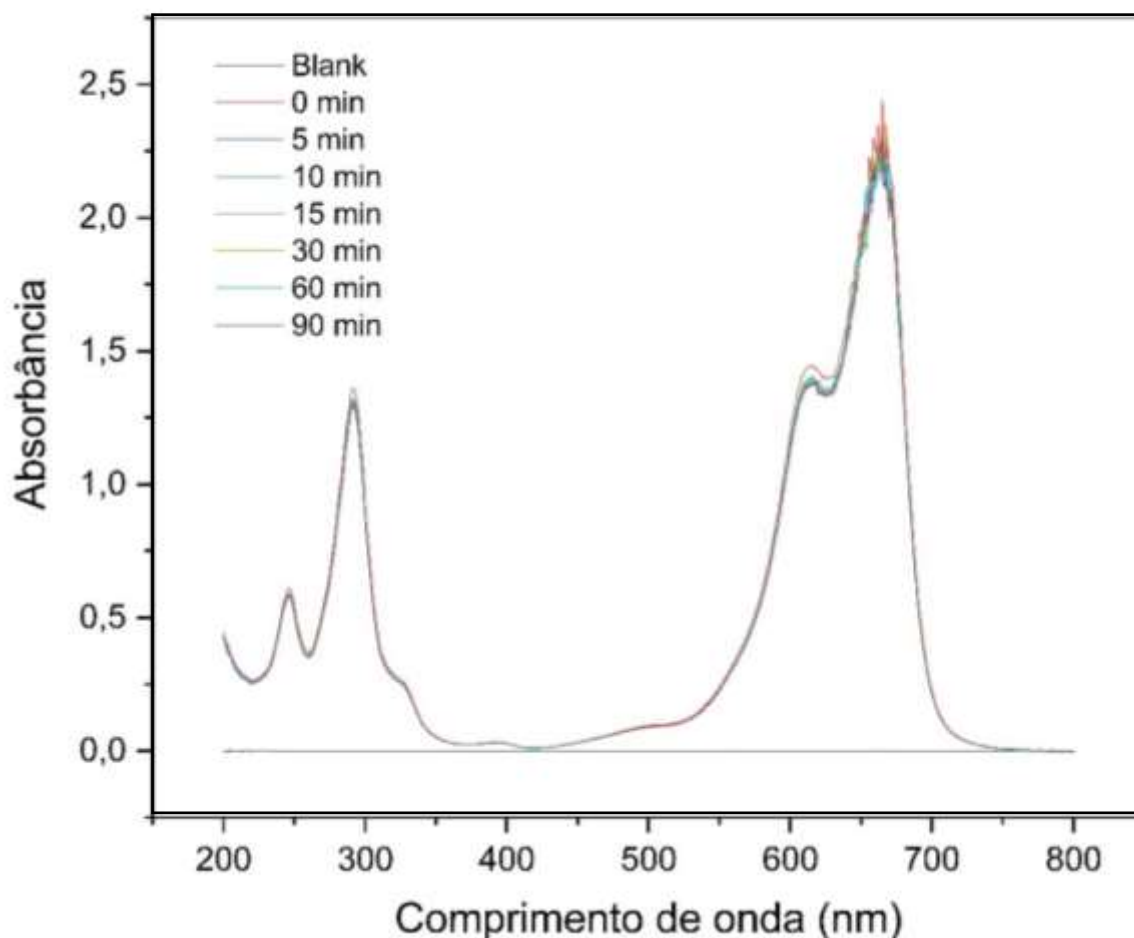
Sendo assim, foi feita uma leitura de varredura do espectro da solução nos mesmos tempos e sob a mesma radiação, com o fim de analisar se durante as leituras estava se apresentando algum tipo de perturbação (Figura 18). Picos de ruído foram evidenciados no comprimento de onda de 664 nm, comprimento recomendado para análises do ativo do presente estudo.

Figura 17. Ensaio de degradação de solução de azul de metileno (MB) (20 mg/L) em água destilada. Espectro de UV-Vis a 664 nm. Os valores representam a média e desvio padrão (n=3).



Fonte: Autoria própria

Figura 18. Espectro de varredura UV-Vis de degradação de solução azul de metileno (MB) (20 mg/L).



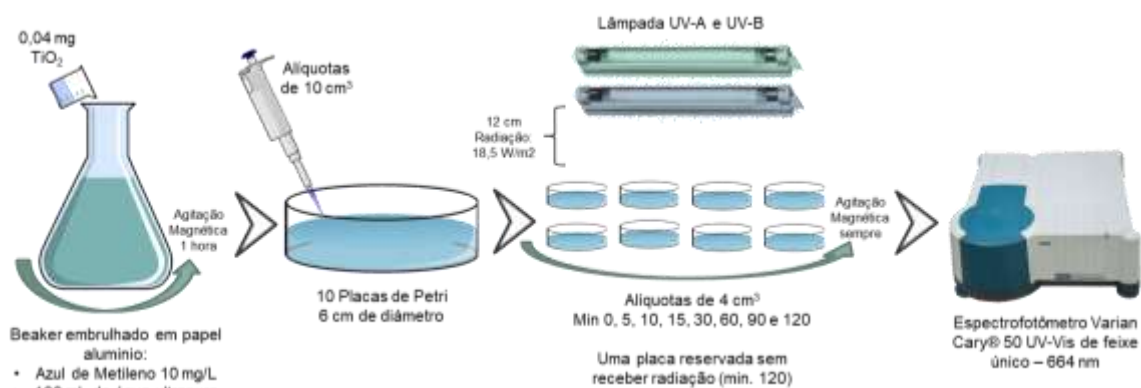
Fonte: Autoria própria

Com base no anteriormente mencionado, a concentração de MB foi diminuída para 10 mg/L e foi adaptada a metodologia de Štrbac et al., (2018), onde 100 mL de solução de MB em água ultrapura foram preparados, reservando 10 mL para serem utilizados como um primeiro controle no final do experimento e nos 90 mL restantes foram dissolvidos 0,04 mg de Dióxido de Titânio (TiO_2), a solução foi agitada durante 1 hora em agitador magnético, com o fim de garantir o equilíbrio de adsorção entre os componentes, este processo foi realizado em um beaker embrulhado em papel alumínio e em ambiente com pouca ou nula presença de luz para evitar qualquer degradação previa dos ativos.

Posteriormente, a solução foi distribuída em nove placas de Petri (10 mL em cada uma), sendo irradiadas utilizando uma lâmpada USHIO G15T8E – 15 W de 450 mm com espectro de emissão no UV-B (306 nm), e, uma lâmpada PHILIPS 15 W de 450 mm com espectro de emissão no UV-A, a uma distância de 12 cm e uma radiação de 18,5 W/m². Alíquotas de 4 mL foram coletadas em função do tempo (0, 5, 10, 15,

30, 60, 90 e 120 minutos). As placas estiveram sob agitação magnética o tempo todo (Figura 19).

Figura 19. Esquema de degradação de azul de metileno. Adaptação da metodologia de Štrbac (2018).



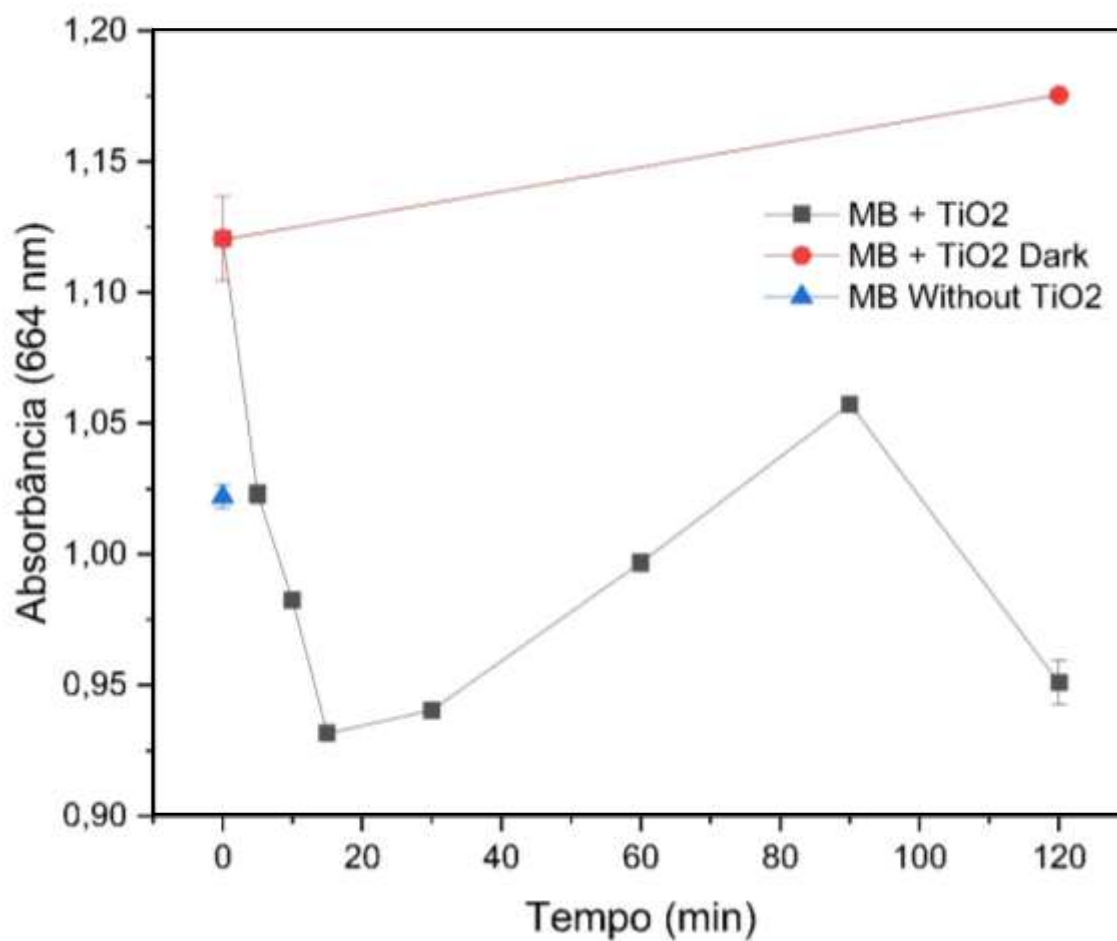
Fonte: Autoria própria

Neste último teste, apesar de obter valores de desvio padrão menores para os dados obtidos, a oscilação dos níveis de absorbância ainda continuava sendo incongruente à tendência de degradação esperada (Figura 20). A leitura de varredura do espectro das novas soluções evidenciou diminuição na interferência no pico de 664 nm com respeito ao teste anteriormente realizado (Figura 21), o que pode ser considerado como um bom indício para a obtenção de dados com pouca dispersão nos próximos ensaios.

Segundo Morlando et al., (2016) antes de submeter a solução de azul de metileno a degradar, é indispensável a presença de um fotocatalisador que fique sob agitação com o MB anteriormente por um período de pelo menos uma hora, com o fim de estabelecer o equilíbrio de absorção-dessorção entre os reagentes.

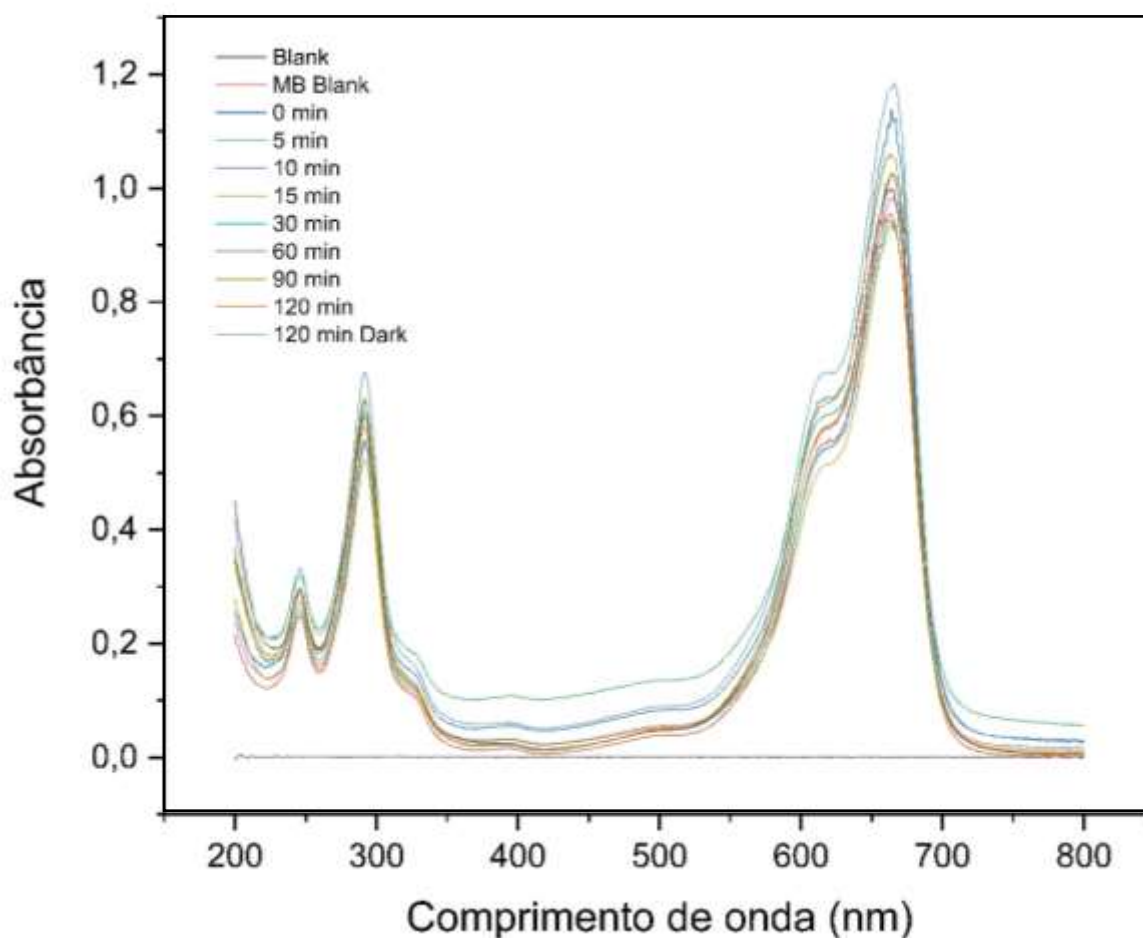
Um exemplo de catalisador, pode ser o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), porém, autores como Liang et al., (2020), afirmam que a presença deste tipo de catalisadores ativam enzimas que são responsáveis pela deterioração química dos ativos, fato que não é desejado no presente estudo pois é necessário que a degradação seja feita unicamente pela radiação UV que incide sobre as formulações. A degradação química também pode gerar quebra de nanopartículas das formulações, reduzindo a capacidade repelente e de proteção solar dos ativos que as conformam.

Figura 20. Ensaio de degradação de solução de azul de metileno (MB) (10 mg/L) em água destilada com adição de ativo com concentração de 0,04 mg de TiO_2 . Espectro de UV-Vis a 664 nm. Os valores representam a média e desvio padrão (n=3).



Fonte: Autoria própria

Figura 21. Espectro de varredura UV-Vis de degradação de azul de metileno (MB) (10 mg/L) com adição de ativo com concentração de 0,04 mg de TiO₂.



Fonte: Autoria própria

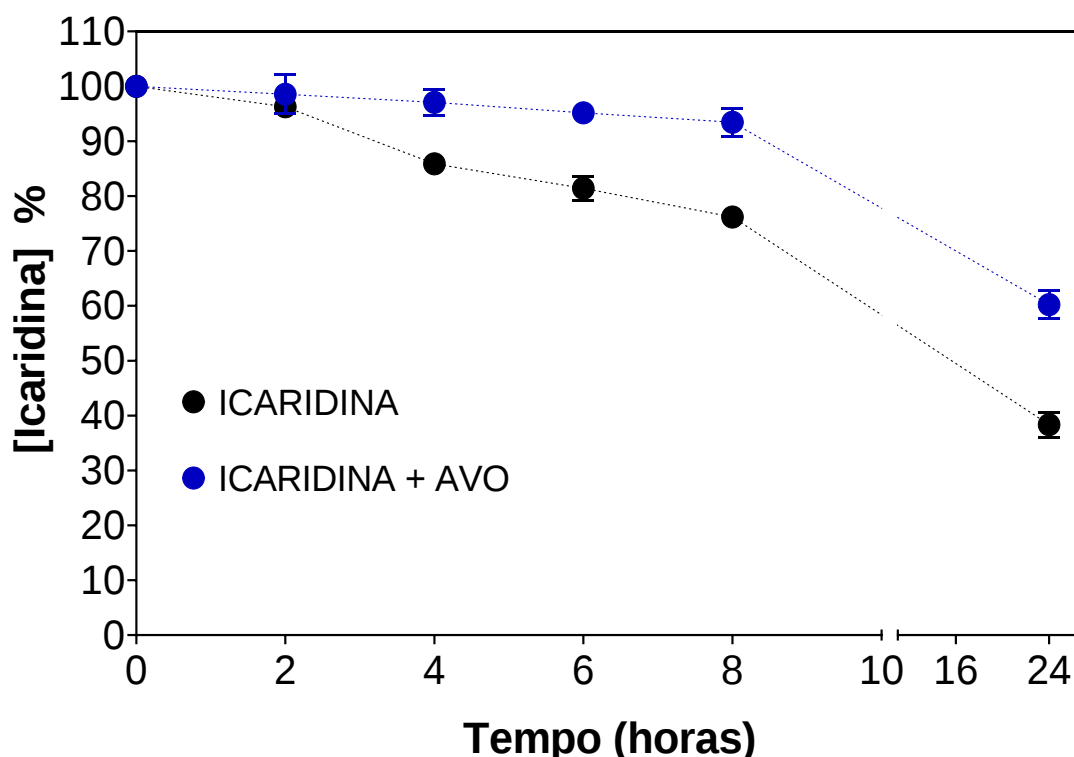
5.1.2 Degradação de icaridina

Frente aos resultados observados para a degradação do azul de metileno, e os problemas com a utilização desta molécula modelo, optou-se por avaliar o poder de proteção solar do composto EUSOLEX® T-AVO sob icaridina, a qual está presente nas formulações de CLN. A Figura 22 apresenta o perfil de degradação da icaridina exposta a radiação UV, durante um período de 24 horas. Pode-se observar uma curva de tendência decrescente, o que indica que a icaridina degradou em função do tempo pela incidência da radiação ultravioleta emitida pelas lâmpadas.

Além disso, é evidente que o ativo EUSOLEX® T-AVO, influenciou significativamente na conservação da icaridina frente aos efeitos de degradação da radiação ultravioleta. A concentração de icaridina final sem presença do ativo de proteção UV foi de $38,3 \pm 2,3\%$, enquanto a formulação com adição de EUSOLEX® T-

AVO, obteve uma concentração de $60,2 \pm 2,5\%$ de icaridina, o que indica a eficiência de proteção do ativo frente à incidência da radiação UV-A e UV-B. Estes dados, podem se interpretar como um efeito de conservação dos ativos repelentes presentes nas formulações a causa da presença do ativo UV, o que ao mesmo tempo, é um aspecto que pode incidir diretamente na eficiência e tempo de ação dos ativos.

Figura 22. Ensaio de degradação de solução de icaridina (ICA) ao limite de concentração em água destilada com adição de ativo com concentração de 0,04 mg de TiO_2 . Os valores representam a porcentagem da média de concentração de icaridina e desvio padrão (n=3).



Fonte: Autoria própria

Em um estudo feito por Chaki Borrás et al. (2020), ressaltam a capacidade do TiO_2 nanopartículado com recobrimento, de reduzir a atividade fotocatalítica dentro das formulações, o que ao mesmo tempo, diminui a incidência da radiação UV e a geração de ROS, o que segundo os autores, aumenta a capacidade de ação do ativo UV e outros ativos que coexistam nas formulações de estudo e, mitiga a toxicidade que as soluções possam provocar nos usuários a causa da geração de ROS.

Da mesma maneira, Popov et al., (2005) demonstraram que nanopartículas de dióxido de titânio, são capazes de reduzir os efeitos da radiação ultravioleta que incide e impacta sobre as células epidérmicas vivas dos seres humanos, diminuindo a

transmissão e maximizando a absorção e dispersão dos raios UV. Além disso, os mesmos autores, resgatam a baixa permeabilidade do TiO_2 , o que se mantém unicamente na camada superior da pele.

Por outra parte, Xia e colaboradores (2007), pesquisaram sobre CLNs carregados com ativos de proteção UV, os quais foram submetidos a radiação UVA e UVB e conseguiram demonstrar que a capacidade de absorção da radiação UV dos CLNs, aumentou em aproximadamente 19% após adição do ativo de filtro UV.

Além disso, em um estudo feito por Nicoara et al., (2020), onde avaliaram a capacidade de proteção de nanopartículas de dióxido de titânio frente à radiação UV, conseguiram demonstrar através do cálculo do fator de proteção solar (FPS), que nanopartículas de TiO_2 , podem ser consideradas como um composto eficaz em protetores solares.

6. CONCLUSÕES

Inicialmente, no presente estudo foram realizadas caracterizações das formulações de CLN contendo icaridina e geraniol, com adição de diferentes ativos de proteção solar. Este “screening” inicial, possibilitou a escolha das formulações com maior estabilidade.

As nanopartículas carregadas com ativos de proteção solar EUSOLEX® T-AVO, foram escolhidas como as formulações com maior estabilidade, obtendo resultados promissores e de acordo com trabalhos encontrados em literatura (nanopartículas com altos níveis de eficiência, liberação sustentada prolongada e baixo risco de permeabilidade e toxicidade.)

Os valores de diâmetro médio por espectroscopia de correlação de fótons, diâmetro médio por rastreamento de partículas, polidispersão e potencial zeta para a formulação com adição de EUSOLEX® T-AVO após o preparo final das CLN, foram de 327 ± 87 nm, 224 ± 19 , $0,33 \pm 0,3$ nm e $-23,9 \pm 3,7$ mV respectivamente. Por outro lado, quando o filtro UV foi formulado junto com a fase aquosa, obtiveram médias de 329 ± 55 para diâmetro médio por DLS, 229 ± 10 para diâmetro médio por NTA, $0,17 \pm 0,04$ nm para polidispersão e $-23,1 \pm 3,8$ mV para potencial zeta.

Os dados adquiridos por DSC, sugerem que as nanopartículas de CLN com e sem adição de ativo UV, apresentam ótimas condições respeito à conservação da integridade dos ativos encapsulados enquanto a formulação está armazenada ou durante a aplicação e ação da mesma.

De acordo aos resultados obtidos por microscopia de força atômica, e comparando-os com o descrito na literatura, a formulação na qual o ativo de proteção solar (EUSOLEX® T-AVO) foi adicionado durante a fase aquosa, apresentou uma distribuição de tamanho uniforme nas nanopartículas (diâmetro médio: 177 nm), com morfologia esférica e sem possível formação de agregados, o que pode ser considerado como um bom indicador na obtenção de uma formulação final com maior estabilidade.

A liberação de icaridina nas formulações de CLN contendo ativo de proteção UV, foi similar em ambas as emulsões, formando uma tendência contínua de

liberação, com um valor médio de $12,2 \pm 0,3\%$, e um máximo de $25,4\% \pm 0,4\%$ em 6 horas, para quando o ativo de proteção solar foi adicionado durante a fase aquosa; e, média de $12,5 \pm 0,2\%$, com máximo de $27,1 \pm 0,4\%$ no mesmo tempo, para quando adicionado no final da preparação do CLN.

As principais dificuldades se apresentaram nas análises de degradação do azul de metileno, onde esta molécula modelo não se mostrou adequada para a avaliação da ação de proteção solar dos ativos EUSOLEX® T-AVO. Neste sentido, optou-se por avaliar o efeito protetor do ativo sob a degradação de icaridina, também presente nas CLNs. Os resultados mostraram um significativo efeito protetor contra a radiação UV.

Portanto, os resultados apresentados neste estudo, evidenciam que carreadores lipídicos nanoestruturados de ativos repelentes (icaridina e geraniol), formulados conjuntamente com ativo de proteção ultravioleta EUSOLEX® T-AVO, em especial quando este último é adicionado durante a fase aquosa, apresentam características acordes à literatura para a obtenção de sistemas nanoestruturados de liberação sustentada de dupla funcionalidade (repelente e proteção solar) altamente estáveis e com elevada eficiência.

Como próximas etapas, é recomendável avaliar em um futuro propriedades das formulações de CLN com adição de ativo UV, como o nível de repelência frente aos vetores, a permeabilidade na pele e a obtenção do fator de proteção solar (FPS). Além disso, cabe mencionar que é importante estudar e caracterizar as formulações em forma de hidrogel.

Do mesmo modo, é preciso aclarar que a análise de liberação de icaridina do presente estudo foi unicamente um teste e não se descarta a necessidade de realizar testes com maior durabilidade (até 72 horas) e a inclusão dos compostos em estado de hidrogel, com o fim de comparar os resultados e possíveis diferentes tendências das formulações no decorrer do tempo com respeito à liberação. Igualmente, se sugere que os ensaios sejam aplicados com o fim de estudar a tendência de liberação de geraniol.

8. REFERÊNCIAS

- ABDEL-SALAM, F. S. et al. Anti-inflammatory sunscreen nanostructured lipid carrier formulations. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 37, p. 13–19, 1 fev. 2017.
- ALDILA, D.; SENO, H. A Population Dynamics Model of Mosquito-Borne Disease Transmission, Focusing on Mosquitoes' Biased Distribution and Mosquito Repellent Use. **Bulletin of Mathematical Biology**, v. 81, n. 12, p. 4977–5008, 1 dez. 2019.
- ALI, H. et al. Molecular interaction and localization of tocotrienol-rich fraction (TRF) within the matrices of lipid nanoparticles: Evidence studies by Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Proton Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (^1H NMR). **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 77, n. 2, p. 286–297, 1 jun. 2010.
- APALLA, Z. et al. Epidemiological trends in skin cancer. **Dermatology Practical & Conceptual**, v. 7, n. 2, p. 1–6, 30 abr. 2017.
- BARTLOW, A. W. et al. Forecasting Zoonotic Infectious Disease Response to Climate Change: Mosquito Vectors and a Changing Environment. **Veterinary Sciences**, v. 6, n. 2, p. 40, jun. 2019.
- BAUD, D. et al. An update on Zika virus infection. **The Lancet**, v. 390, n. 10107, p. 2099–2109, 4 nov. 2017.
- BELL, E. **Sunscreen decoded: Myths about SPF, labels, recommendations - ProQuest**. Disponível em: <<https://search.proquest.com/openview/55b972ee9c6c607365c8de557db2eb4f/1?cbl=29327&pq-origsite=gscholar>>. Acesso em: 14 out. 2020.
- CAVALCANTE, K. R. L. J.; TAUIL, P. L. Risco de reintrodução da febre amarela urbana no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 26, p. 617–620, set. 2017.
- CAVALCANTI, L. P. DE G. et al. Surveillance of deaths caused by arboviruses in Brazil: from dengue to chikungunya. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 8, p. 583–585, ago. 2017.
- CHAKI BORRÁS, M. et al. Y2O3 decorated TiO2 nanoparticles: Enhanced UV attenuation and suppressed photocatalytic activity with promise for cosmetic and sunscreen applications. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 207, p. 111883, 1 jun. 2020.
- CHEN, W.; VILJOEN, A. M. Geraniol — A review of a commercially important fragrance material. **South African Journal of Botany**, Chemical diversity and biological functions of plant volatiles. v. 76, n. 4, p. 643–651, 1 out. 2010.
- COLA, D. F. et al. SISTEMAS CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS PARA IVERMECTINA E METOPRENO VISANDO CONTROLE DE PARASITAS. **Química Nova**, v. 39, n. 9, p. 1034–1043, nov. 2016.
- CORDEIRO, F. DA S.; FERNANDES, J. L. A.; EIRAS, Á. E. Análise da Relação Causal entre Variáveis Meteorológicas (Pluviosidade e Temperatura) e População de Fêmeas Aedes aegypti em Lavras, MG - Brasil. **Proceeding Series of the Brazilian Society of Computational and Applied Mathematics**, v. 5, n. 1, 14 abr. 2017.
- CUNHA, R. V. DA et al. Chikungunya virus: clinical aspects and treatment - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 8, p. 523–531, ago. 2017.

DA SILVA, M. R. M.; RICCI-JÚNIOR, E. An approach to natural insect repellent formulations: from basic research to technological development. **Acta Tropica**, v. 212, p. 105419, 1 dez. 2020.

DE OLIVEIRA, J. L. et al. Geraniol Encapsulated in Chitosan/Gum Arabic Nanoparticles: A Promising System for Pest Management in Sustainable Agriculture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 21, p. 5325–5334, 30 maio 2018.

EMD. **Inorganic UV Filters | Merck Global**. Disponível em: <<https://www.merckgroup.com/en/expertise/cosmetics/care-solutions/sun-care/uv-filters-inorganic.html>>. Acesso em: 14 out. 2020.

FERREIRA-DE-LIMA, V. H.; LIMA-CAMARA, T. N. Natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: a systematic review. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 77, 1 fev. 2018.

FRIZZO, M. S. et al. Encapsulação de Nanopartículas de Óxido de Zinco via Polimerização em Miniemulsão para Aplicação em Protetores Solares. p. 118, 2016.

GALVÃO, J. G. Desenvolvimento de formulação cosmética contendo carreadores lipídicos nanoestruturados à base de manteiga de Ourateasp. : uma estratégia nanotecnológica para o aumento da hidratação cutânea. 20 fev. 2015.

GEOFFREY, K.; MWANGI, A. N.; MARU, S. M. Sunscreen products: Rationale for use, formulation development and regulatory considerations. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, n. 7, p. 1009–1018, 1 nov. 2019.

GORDILLO-GALEANO, A.; MORA-HUERTAS, C. E. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: A review emphasizing on particle structure and drug release. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 133, p. 285–308, 1 dez. 2018.

GÖRNER, T. et al. Lidocaine-loaded biodegradable nanospheres. I. Optimization Of the drug incorporation into the polymer matrix. **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**, v. 57, n. 3, p. 259–268, 22 fev. 1999.

GU, X.; CHEN, T. In vitro permeation characterization of repellent picaridin and sunscreen oxybenzone. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 14, n. 3, p. 332–340, 1 jun. 2009.

HAMEED, A. et al. Scope of Nanotechnology in Cosmetics: Dermatology and Skin Care Products. **Journal of Medicinal and Chemical Sciences**, v. 2, n. 1, p. 9–16, 1 jan. 2019.

HAO, H. et al. Host-Seeking and Blood-Feeding Behavior of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Exposed to Vapors of Geraniol, Citral, Citronellal, Eugenol, or Anisaldehyde. **Journal of Medical Entomology**, v. 45, n. 3, p. 533–539, 1 maio 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Câncer de pele melanoma**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-melanoma>>. Acesso em: 14 out. 2020a.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Câncer de pele não melanoma**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-nao-melanoma>>. Acesso em: 14 out. 2020b.

JONES, R. et al. Arbovirus vectors of epidemiological concern in the Americas: A scoping review of entomological studies on Zika, dengue and chikungunya virus vectors. **PLOS ONE**, v. 15, n. 2, p. e0220753, 6 fev. 2020.

- KAMEL, R.; MOSTAFA, D. M. Rutin nanostructured lipid cosmeceutical preparation with sun protective potential. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 153, p. 59–66, 1 dez. 2015.
- LEITER, U.; KEIM, U.; GARBE, C. Epidemiology of Skin Cancer: Update 2019. In: REICHRATH, J. (Ed.). **Sunlight, Vitamin D and Skin Cancer**. Advances in Experimental Medicine and Biology. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 123–139.
- LETA, S. et al. Global risk mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 67, p. 25–35, 1 fev. 2018.
- LIANG, S. et al. Rapid destruction of triclosan by Iron(III)-Tetraamidomacrocyclic ligand/hydrogen peroxide system. **Chemosphere**, v. 261, p. 127704, 1 dez. 2020.
- LÍŠKOVÁ, A. et al. Evaluation of phototoxic and cytotoxic potential of TiO₂ nanosheets in a 3D reconstructed human skin model. **ALTEX - Alternatives to animal experimentation**, v. 37, n. 3, p. 441–450, 15 jul. 2020.
- L. SLOMBERG, D. et al. Aqueous aging of a silica coated TiO₂ UV filter used in sunscreens: investigations at the molecular scale with dynamic nuclear polarization NMR. **RSC Advances**, v. 10, n. 14, p. 8266–8274, 2020.
- MESSINA, J. P. et al. The current and future global distribution and population at risk of dengue. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 9, p. 1508–1515, set. 2019.
- MINSALUD. **Fiebre chikunguña virus chikungunya**. Disponível em: <<https://www.minsalud.gov.co/salud/publica/PET/Paginas/chikunguna.aspx>>. Acesso em: 18 dez. 2020.
- MONTES, DE O. et al. **Simulación de altas prestaciones (GPU) para la reproducción del mosquito *Aedes aegypti* en el cementerio de Santo Tomé, Corrientes**. . In: XXV CONGRESO ARGENTINO DE CIENCIAS DE LA COMPUTACIÓN (CACIC) (UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO, CÓRDOBA, 14 AL 18 DE OCTUBRE DE 2019). 2019Disponível em: <<http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/90910>>. Acesso em: 9 out. 2020
- MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2017.
- MORAES, C. M. Preparo, caracterização físico-química e avaliação da estabilidade de nanopartículas poliméricas contendo anestésicos locais. 2009.
- MORLANDO, A. et al. Titanium doped tin dioxide as potential UV filter with low photocatalytic activity for sunscreen products. **Materials Letters**, v. 171, p. 289–292, 15 maio 2016.
- MORSELLA, M. et al. Improving the Sunscreen Properties of TiO₂ through an Understanding of Its Catalytic Properties. **ACS Omega**, v. 1, n. 3, p. 464–469, 30 set. 2016.
- NAFEE, N.; MAKLED, S.; BORAIE, N. Nanostructured lipid carriers versus solid lipid nanoparticles for the potential treatment of pulmonary hypertension via nebulization. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 125, p. 151–162, 1 dez. 2018.
- NEMEN, D.; LEMOS-SENNA, E. Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 408–413, 2011.

- NGOC, L. T. N. et al. Recent Trends of Sunscreen Cosmetic: An Update Review. **Cosmetics**, v. 6, n. 4, p. 64, dez. 2019.
- NICOARA, A. I. et al. Biocompatible Ag/Fe-Enhanced TiO₂ Nanoparticles as an Effective Compound in Sunscreens. **Nanomaterials**, v. 10, n. 3, p. 570, mar. 2020.
- OMOLO, M. O. et al. Repellency of essential oils of some Kenyan plants against *Anopheles gambiae*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 20, p. 2797–2802, 1 out. 2004.
- PATEL, R. V. et al. EPA-Registered Repellents for Mosquitoes Transmitting Emerging Viral Disease. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 36, n. 12, p. 1272–1280, 2016.
- PETERSEN, L. R. et al. Zika Virus. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 16, p. 1552–1563, 21 abr. 2016.
- POPOV, A. P. et al. Effect of size of TiO₂ nanoparticles embedded into stratum corneum on ultraviolet-A and ultraviolet-B sun-blocking properties of the skin. **Journal of Biomedical Optics**, v. 10, n. 6, p. 064037, dez. 2005.
- PRICE, D. N.; BERRY, M. S. Comparison of effects of octopamine and insecticidal essential oils on activity in the nerve cord, foregut, and dorsal unpaired median neurons of cockroaches. **Journal of Insect Physiology**, v. 52, n. 3, p. 309–319, 1 mar. 2006.
- PRIYA, R. et al. Highly effective photocatalytic degradation of methylene blue using PrO₂–MgO nanocomposites under UV light. **Optik**, v. 206, p. 164318, 1 mar. 2020.
- RAMPAUL, A.; PARKIN, I. P.; CRAMER, L. P. Damaging and protective properties of inorganic components of sunscreens applied to cultured human skin cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 191, n. 2–3, p. 138–148, 2007.
- RAWAT, S. et al. Molecular Mechanism of Poly(vinyl alcohol) Mediated Prevention of Aggregation and Stabilization of Insulin in Nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, v. 12, n. 4, p. 1018–1030, 6 abr. 2015.
- REAL-COTTO, J. J. et al. Evolución del virus dengue en el Ecuador: Período 2000 a 2015. **Anales de la Facultad de Medicina**, v. 78, n. 1, p. 29–35, jan. 2017.
- SALVI, V. R.; PAWAR, P. Nanostructured lipid carriers (NLC) system: A novel drug targeting carrier. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 51, p. 255–267, 1 jun. 2019.
- SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, out. 2003.
- SHRESTHA, B.; LEE, Y. Cellular and molecular mechanisms of DEET toxicity and disease-carrying insect vectors: a review. **Genes & Genomics**, v. 42, n. 10, p. 1131–1144, 1 out. 2020.
- SILVA, E. SAES DA et al. Use of sunscreen and risk of melanoma and non-melanoma skin cancer: a systematic review and meta-analysis. **European Journal of Dermatology**, v. 28, n. 2, p. 186–201, mar. 2018.

- SONG, A. et al. Effect of liquid-to-solid lipid ratio on characterizations of flurbiprofen-loaded solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carriers (NLCs) for transdermal administration. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 42, n. 8, p. 1308–1314, ago. 2016.
- SOUZA, P. M. S. et al. Desenvolvimento de nanocápsulas de poli- ϵ -caprolactona contendo o herbicida atrazina. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 132–137, 2012.
- SOUZA-NETO, J. A.; POWELL, J. R.; BONIZZONI, M. Aedes aegypti vector competence studies: A review. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 67, p. 191–209, 1 jan. 2019.
- ŠTRBAC, D. et al. Photocatalytic degradation of Naproxen and methylene blue: Comparison between ZnO, TiO₂ and their mixture. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 113, p. 174–183, 2018.
- SWALE, D. R.; BLOOMQUIST, J. R. Is DEET a dangerous neurotoxicant? **Pest Management Science**, v. 75, n. 8, p. 2068–2070, 2019.
- TAVARES, M. et al. Trends in insect repellent formulations: A review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 539, n. 1, p. 190–209, 25 mar. 2018.
- TEFAS, L. R. et al. Development and optimization of quercetin-loaded PLGA nanoparticles by experimental design. **Clujul Medical**, v. 88, n. 2, p. 214–223, 2015.
- TEICH, V.; ARINELLI, R.; FAHHAM, L. Aedes aegypti e sociedade: o impacto econômico das arboviroses no Brasil. **Jornal Brasileiro de Economia da Saúde**, v. 9, n. 3, p. 267–276, dez. 2017.
- VALDÉS, M. Á. S. Yellow fever: it worth a review in the current epidemiological context. **MediSur**, v. 15, n. 1, p. 63–70, 6 mar. 2017.
- VITORINO, C. et al. The size of solid lipid nanoparticles: An interpretation from experimental design. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, n. 1, p. 117–130, 1 maio 2011.
- WEBB, C. E.; HESS, I. M. A review of recommendations on the safe and effective use of topical mosquito repellents. **Public Health Research & Practice**, v. 26, n. 5, 14 dez. 2016.
- WISSING, S. A.; MÜLLER, R. H. A novel sunscreen system based on tocopherol acetate incorporated into solid lipid nanoparticles. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 23, n. 4, p. 233–243, 2001.
- XIA, Q. et al. Nanostructured lipid carriers as novel carrier for sunscreen formulations. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 29, n. 6, p. 473–482, 2007.
- ZHU, J. J. et al. Better than DEET Repellent Compounds Derived from Coconut Oil. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 14053, 19 set. 2018.

9. ANEXOS

Os resultados das análises realizadas mediante o software estatístico Statgraphics Centurion (v. XVII), com o fim de comprovar se existiam diferenças significativas nos resultados obtidos para os parâmetros físico-químicos de diâmetro médio (por DLS e NTA), polidispersão e potencial zeta, estão disponíveis no seguinte link: <https://drive.google.com/drive/folders/1WE2UmxpwJmDYdmQgKftk7RocNbDfppEm?usp=sharing>